

A ENZIMA DELTA-AMINOLEVULINATO DESIDRATASE

Tatiana Emanuelli

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos - CCR

UFSM - Santa Maria, RS

ABSTRACT

Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) is a sulfhydryl-containing enzyme that asymmetrically condenses two molecules of delta-aminolevulinic acid (ALA), catalyzing the formation of porphobilinogen, the monopyrrole precursor of all biological tetrapyrroles (corrins, porphyrins, chlorins). The two ALA molecules have been termed A-side ALA and P-side ALA in reference to their fates as the acetyl and propionyl halves of the product. P-side ALA binds first and forms a Schiff-base with an active-site lysine. ALA-D is a cytosolic enzyme present in mammals, plants, fungi and bacteria. Bovine enzyme has a molecular mass of 280 000 Da and is composed of eight similar subunits of 35 000 Da, but only four of the subunits form a Schiff-base with the substrate (half-site reactivity). ALA-D from all organisms requires a bivalent metal ion for activity. Although the considerable sequence conservation among ALA-D enzyme from various organisms, there are species-dependent differences in metal ion requirements for enzyme activity. ALA-D is a zinc-dependent enzyme in animals, yeast and some bacteria. Mammalian enzyme bounds 8 zinc ions/octamer. Bovine ALA-D contains two types of Zn²⁺ binding sites (A and B), each at a stoichiometry of four per octamer. A-metal-ion-binding sites, with a single cysteine residue among its ligands, bind the four zinc ions essential for ALA-D activity (catalytic zinc), which plays a role in A-side ALA binding, in

inter-ALA bond formation and in product binding. B-metal-ion-binding sites, with four cysteine residues among its ligands, bind zinc ions referred to as structural, which seems to be involved in the protection of sulfhydryl groups from oxidation. An A-zinc-ion-binding site has been proposed to be present at a number of four per octamer on the enzyme from plants, but has not been demonstrated yet. ALA-D from plants contains two types of magnesium-binding sites: four B-metal-ion-binding sites (bind magnesium essential for ALA-D activity) and eight C-metal-ion-binding sites (bind magnesium that activates the enzyme but is not essential for activity). The cysteine-rich sequence of mammalian ALA-D that presumably corresponds to the B-metal-ion-binding site is replaced by an aspartate-rich sequence in plant ALA-D, probably accounting for the difference on metal-ion requirement (Mg^{2+} instead of Zn^{2+} on B-metal-ion-binding site from plant ALA-D). *E. coli* ALA-D binds eight Zn^{2+} (presumably four at A-metal-ion-binding site and four at B-metal-ion-binding site) and eight Mg^{2+} (presumably at C-metal-ion-binding site) per octamer. Due to its sulfuric nature ALA-D is inhibited by heavy metals such as lead and mercury, serving as a measure of metal intoxication. In addition the inhibition of this enzyme has been implicated with pathological changes observed in some types of porphyrias, hepatorenal tyrosinemia and after lead or mercury exposure. ALA-D inhibition may impair haeme biosynthesis and leads to ALA accumulation, which besides being a potent agonist of γ -aminobutyric acid autoreceptors may act as a prooxidant.

RESUMO

A delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D, E.C. 4.2.1.24) é uma enzima citosólica encontrada em bactérias, vegetais e animais. A reação catalisada pela ALA-D faz parte da rota de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes). Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ALA), formando porfobilinogênio. Um grupo ϵ -amino de um

resíduo de lisina presente no sítio ativo da enzima forma uma base de Schiff com a primeira molécula de substrato, a qual origina a cadeia lateral P (ácido propiônico) da molécula de porfobilinogênio. A segunda molécula de ALA originará a cadeia lateral A (ácido acético). A enzima de fígado bovino apresenta um peso molecular de 280 000 Da, sendo composta por 8 subunidades iguais, de 35 000 Da cada uma, no entanto apenas metade das subunidades parece estar envolvida na catálise. Independente da fonte, todas as enzimas ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico divalente para estar ativas. Apesar do grande grau de similaridade existente entre os genes da ALA-D provenientes de diferentes organismos, a enzima requer metais diferentes para ativação, de acordo com a sua fonte (zinco para a enzima de animais, leveduras e algumas bactérias, e magnésio para a enzima de plantas). A enzima de mamíferos liga 8 íons zinco por octâmero. Foi detectada a existência de 2 sítios estruturalmente distintos para ligação do zinco na ALA-D bovina (sítios A e B). Os sítios A seriam compostos por 5 ligantes, entre eles um -SH de um resíduo de cisteína, e estariam envolvidos na ligação das 4 moléculas de zinco essenciais para a completa ativação da ALA-D (referidas como catalíticas), as quais parecem ser importantes para a união da segunda molécula de substrato, formação da primeira ligação entre as duas moléculas de ALA e união do produto. Os sítios B seriam compostos por 4 resíduos de cisteína e estariam envolvidos na união dos 4 íons zinco não essenciais (referidos como estruturais), os quais teriam a função de manter grupos -SH da enzima no estado reduzido. Tem sido proposto que o sítio A estaria presente também na ALA-D de vegetais, num número de 4 por octâmero, no entanto isto ainda não foi demonstrado. Cada octâmero da ALA-D de plantas apresentaria, ainda, 4 sítios B para união de íons magnésio essenciais e 8 sítios C para união de íons magnésio não essenciais, cuja função é ativar a enzima. Na enzima de plantas a região que corresponde ao sítio B de união do íon metálico parece conter resíduos de aspartato ao invés dos resíduos de cisteína presentes na enzima de origem animal. Isto explicaria porque o sítio B da ALA-D de plantas liga Mg^{2+} ao invés de Zn^{2+} . A ALA-D de *E. Coli* possui, aparentemente, 8 sítios para

união de zinco (4 sítios A ou α e 4 sítios B ou β) e 8 sítios para união de magnésio (supostamente sítio C) por octâmero. Devido a sua natureza sulfidrídica a ALA-D é inibida por metais pesados, como chumbo e mercúrio, servindo como um índice para avaliar a intoxicação pelo metal. Além disso, as alterações patológicas observadas em alguns tipos de porfiria, na tirosinemia hepatorenal e após exposição a chumbo e mercúrio parecem estar relacionadas à inibição desta enzima. A inibição da ALA-D prejudica a biossíntese do heme e paralelamente provoca um acúmulo de ácido 5-aminolevulínico (seu substrato), que pode atuar como um prooxidante, além ser um potente agonista dos autoreceptores gabaérgicos.

HISTÓRICO E FUNÇÃO

A enzima citosólica delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D, E.C. 4.2.1.24), também conhecida como porfobilinogênio sintetase ou 5-aminolevulinato hidrolase foi isolada na década de 50 (DRESEL & FALK, 1953; GIBSON et al., 1955). Esta enzima catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido delta-aminolevulínico (ácido 5-aminolevulínico, ALA), com perda de 2 moléculas de água, para formar o composto monopirrólico porfobilinogênio (PBG) (Figura 1).

A reação catalisada pela ALA-D faz parte da rota biossintética dos compostos tetrapirrólicos (corrinas, bilinas, clorofilas e hemes) (Figura 2). A grande importância destes compostos reside na sua função como grupos prostéticos de proteínas. O heme (ferroprotoporfirina) faz parte da estrutura de proteínas que participam do transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transporte de elétrons (citocromos a, b e c), reações de transformação de xenobióticos (citocromo P₄₅₀) e do sistema de proteção contra peróxidos (catalases e peroxidases). Existem evidências de que a reação catalisada pela ALA-D poderia ser uma das etapas limitantes na via de biossíntese do heme em leveduras (BORRALHO et al., 1989;

BORRALHO, 1990). A ALA-D também parece estar relacionada com a regulação da

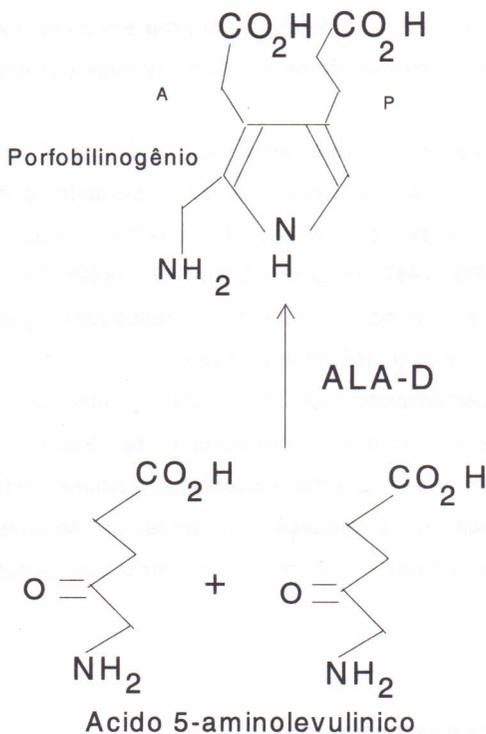


Figura 1 - Reação catalisada pela enzima delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D). A: cadeia lateral ácido acético (-CH₂CO₂H) originária da segunda molécula de substrato, a qual se liga ao sítio A de união do substrato. P: cadeia lateral ácido propiônico (-CH₂CH₂CO₂H), originária da primeira molécula de substrato, a qual forma uma base de Schiff com um resíduo lisil no sítio P de união do substrato.

biossíntese do heme em outros organismos, tais como: *Propionibacterium shermanii* (MENON & SHEMIN, 1967), *Spirillum itersonii* (LASCELLES, 1975), *Rhodopseudomonas spheroides* (YUBISUI & YONEYAMA, 1972;

NANDI et al., 1968), *Neurospora crassa* (MUTHUKRISHNAN et al., 1972) e *Chlamydomonas reinhardtii* (MATTERS & BEALE, 1995), no entanto não existem evidências de que esta enzima esteja envolvida na regulação da biossíntese do heme em mamíferos. A enzima envolvida na regulação da biossíntese do heme em mamíferos é a ALA-sintetase (GRANICK & BEALE, 1978).

A via para biossíntese das porfirinas é semelhante em bactérias, vegetais e animais, encontrando-se portanto, a enzima ALA-D, amplamente distribuída na natureza (BELLINASSO, 1985; AMAZARRAY, 1986; RODRIGUES, 1987, RODRIGUES et al., 1989). Em mamíferos, os tecidos que apresentam maior atividade enzimática são hepático, renal e os tecidos hematopoiéticos (GIBSON et al, 1955).

Recentemente, GUO et al. (1994) relataram que a enzima ALA-D é idêntica ao inibidor de proteosoma de 240-kDa (CF-2). Estes achados conferem a ALA-D uma importância adicional, uma vez que os proteosomas atuam na degradação de proteínas anormais, fatores de transcrição, oncoproteínas, ciclinas, bem como no processamento de antígenos.

ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS

Existe uma grande similaridade entre as sequências do gene da ALA-D isolado de diversas fontes (humano, WETMUR et al., 1986; *Escherichia coli*, ECHELARD et al., 1988; LI et al., 1989; camundongo, BISHOP et al., 1989; ervilha, BOESE et al., 1991; espinafre, SCHAUMBURG et al., 1991), sugerindo que a enzima apresenta estrutura e mecanismo de ação similares em diferentes organismos.

A ALA-D de fígado bovino possui peso molecular de 280 000 Da (TIGIER et al, 1970; WU et al, 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al, 1981), sendo composta por 8 subunidades iguais de 35 000 Da cada uma (WILSON

et al, 1972; WU et al, 1974; SHEMIN, 1976; FUJITA et al, 1981), arrançadas em uma estrutura cúbica octamérica, com simetria diédrica (WU et al, 1974).

Todas as enzimas ALA-D isoladas até o momento requerem um íon metálico divalente para estarem ativas, sendo em sua maioria inibidas por EDTA. Apesar do alto grau de similaridade existente entre os genes da ALA-D provenientes de diversos organismos, a enzima requer metais diferentes para sua ativação, de acordo com a sua fonte. A ALA-D proveniente de animais, leveduras e de algumas bactérias é uma enzima zinco dependente (CHEH & NEILANDS, 1973; FINELLI et al., 1974), tendo sido demonstrado o envolvimento de resíduos de cisteína na união deste metal (DENT et al., 1990; MITCHELL & JAFFE, 1993; SPENCER & JORDAN, 1994). A enzima proveniente de vegetais, apesar de possuir uma similaridade de 35-50% (BOESE et al., 1991; SCHAUMBURG et al., 1991) com a ALA-D de outras fontes, requer magnésio ao invés de zinco (SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979). A região rica em cisteínas presente na enzima de origem animal, e que corresponde a região que supostamente liga zinco, é substituída na enzima de plantas por uma região rica em aspartato a qual supostamente seria o sítio para união do magnésio (BOESE et al., 1991; SCHAUMBURG et al., 1991; CHAUHAN & O'BRIAN, 1995) (Figura 3).

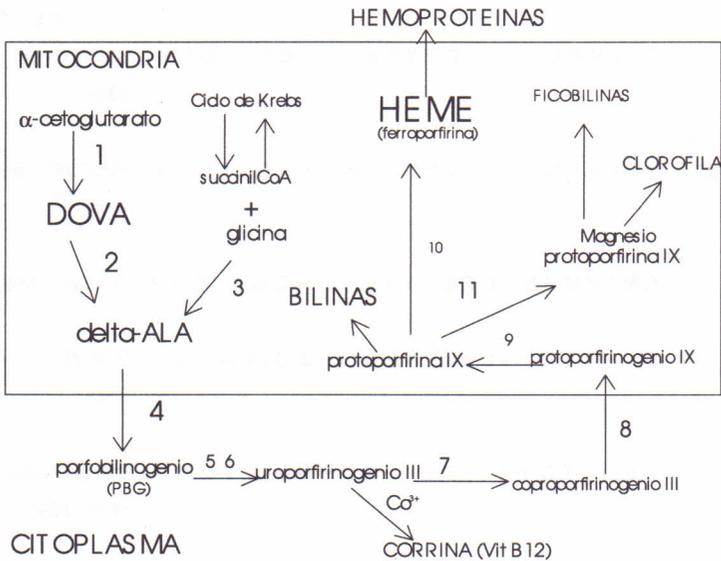
A ALA-D, independente da sua fonte, é uma enzima de natureza sulfidrílica (SHEMIN, 1976; TSUKAMOTO et al, 1979; BEVAN et al, 1980), sendo, portanto inibida por agentes bloqueadores de grupos tiólicos, tais como N-etilmaleimida, iodoacetato (BATLLE et al, 1967; CHAUDHRY et al, 1976; JORDAN et al, 1976; BARNARD et al, 1977), paracloromercuriobenzoato, monoiodoacetamida e ácido 5-5' ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) (BARREIRO, 1967; BATLLE et al, 1967; TIGIER et al., 1970; WILSON et al, 1972; BARNARD et al, 1977; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979; RODRIGUES, 1987); e por metais pesados que possuem elevada afinidade por grupamentos sulfidrílicos, tais como chumbo, cobre e mercúrio (GIBSON et al, 1955; WILSON et al, 1972; FINELLI et al, 1975; SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979; NELSON et al., 1981; GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; RODRIGUES et

al., 1989, 1996; BORRALHO et al., 1990; ROCHA et al, 1993; ROCHA et al, 1995; EMANUELLI et al., 1996). A clonagem e sequenciamento do cDNA da ALA-D de eritrócitos de camundongos revelou a presença de 8 cisteínas e 9 histidinas por subunidade (BISHOP et al., 1989).

A enzima é facilmente inativada durante a purificação e a perda de atividade está diretamente relacionada à perda de 2 grupos sulfidrila/subunidade. Para obtenção da atividade catalítica máxima geralmente é necessária a adição de ativadores tiólicos, como por exemplo: DL-ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, cisteína e glutatona. Entretanto, quando a enzima é isolada na presença de zinco (TSUKAMOTO et al, 1979) e de um agente redutor (GIBSON et al, 1955; TSUKAMOTO et al, 1979; BEVAN et al, 1980), ela apresenta atividade máxima mesmo sem a adição de um ativador tiólico no meio de incubação (TSUKAMOTO et al, 1979).

O pH ótimo para determinação da atividade da ALA-D varia de 6.2 até 9.5, de acordo com a sua fonte (HODSON et al, 1977; BARREIRO, 1967). A enzima de origem animal apresenta valores mais baixos de pH ótimo (GRANICK & MAUZERALL, 1958; GIBSON et al, 1955) que a de origem vegetal (SHIBATA & OCHIAI, 1977; TAMAI et al., 1979). A atividade máxima da enzima geralmente é observada com temperaturas de incubação entre 55 e 65 °C (TIGIER et al, 1968; WILSON et al, 1972; BELLINASSO, 1985). Os valores de Km (constante de Michaelis-Menten) variam de 0,14 mM para a enzima de fígado bovino (GIBSON et al, 1955) a 6.6 mM para folhas de *Ricinus communis* ("mamona") (AMAZARRAY, 1986). Recentemente foi observado que Mg^{2+} reduz o Km da ALA-D de *E. coli* (Jaffe et al., 1995). Assim, não se pode descartar a possibilidade de que o alto valor de Km observado para a enzima de *Ricinus communis* pode ter sido devido a ausência de Mg^{2+} no meio de incubação.

A curva de velocidade da reação em função da concentração de substrato, para a ALA-D de origem animal, apresenta um perfil sigmóide, indicando um caráter alostérico da enzima (VERGNANO et al., 1968;



- 1.Redutase
- 2.DOVA-transaminase
3. δ -ALA sintetase
4. δ -ALA desidratase
5. Uroporfirinogênio I sintetase
6. Uroporfirinogênio III cossintase
7. Uroporfirinogênio descarboxilase
8. Coproporfirinogênio oxidase
9. Protoporfirinogênio oxidase
10. Ferro-quelatase
11. Magnésio-quelatase

Figura 2- Via de biossíntese dos compostos tetrapirrólicos. Obs: A compartimentalização mitocôndria e citoplasma referem-se à biossíntese do heme.

		referência
humano	NLLVACDVCLCPYTSHGHCGLLSEN	WETMUR et al., 1986
rato	TLLVACDVCLCPYTSHGHCGLLSEN	DENT et al., 1990 BISHOP et al., 1986
camundongo	SLLVACDVCLCPYTSHGHCGLLSEN	BISHOP et al., 1989
E. coli	EMIVMSDTCFCEYTSHGHCGLLSEN	LI et al., 1989
ervilha	DLIIYTDVALDPYSSDGHGDGIVRED	BOESE et al., 1991
espinafre	DLIIYTDVALDPYYYDGHGDGIVTQH	SCHAUMBURG et al., 1991

Figura 3 - Comparação da sequência de aminoácidos da região proposta como sítio B para união de íon metálico divalente na ALA-D humana, de rato, de camundongo, de *E. coli*, de ervilha e de espinafre.

CHINARRO et al. 1983), enquanto que a ALA-D de *Saccharomyces cerevisiae* exibe uma cinética tipicamente michaeliana (BORRALHO et al., 1990).

O gene estrutural para ALA-D humana está localizado na região cromossômica 9q13--->qter (WETMUR et al., 1986). Até o momento foram identificadas 3 isoenzimas diferentes em humanos, designadas ALA-D 1-1, ALA-D 1-2 e ALA-D 2-2 (BATTISTUZZI et al., 1981; PETRUCCI et al.; 1982), resultantes da expressão de 2 alelos comuns ALAD¹ e ALAD². Recentemente foi observado que indivíduos portadores do alelo ALAD² apresentam um maior conteúdo de chumbo no organismo e maior risco de

intoxicação por chumbo, possivelmente devido à uma maior afinidade da enzima pelo chumbo, determinada por este alelo (WETMUR, 1994).

AÇÃO CATALÍTICA

O sítio ativo da enzima parece ser composto por resíduos de cisteína, dois átomos de zinco, um resíduo de histidina, um resíduo de lisina e resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (TSUKAMOTO et al, 1979; CHINARRO et al, 1983; JAFFE et al., 1994).

Estudos utilizando substrato marcado ([5-¹³C]ALA, JORDAN & SEEHRA, 1980; [5-¹⁴C]ALA, JORDAN & GIBBS, 1985) demonstraram que o grupo ε-amino de um resíduo de lisina (lisina-252 na ALA-D humana, GIBBS & JORDAN, 1986) presente no sítio ativo forma uma base de Schiff com o C₄ da primeira molécula de substrato, a qual origina a cadeia lateral P (ácido propiônico) da molécula de porfobilinogênio (figura 1). A união desta primeira molécula de substrato não requer zinco ou grupamentos sulfidrílicos reduzidos. No entanto, para a união da segunda molécula de ALA, a qual originará a cadeia lateral A (ácido acético) do porfobilinogênio (figura 1) são necessários zinco e/ou grupamentos sulfidrílicos (JAFFE & MARKHAM, 1987). As duas moléculas de substrato interagem no sítio ativo da enzima aparentemente através de uma ligação carbono-nitrogênio (base de Schiff) (JAFFE et al., 1990). A ALA-D possui 8 subunidades, no entanto, apenas metade das subunidades parece estar envolvida na catálise (SHEMIN, 1976; JAFFE & HANES, 1986), ocorrendo o fenômeno de "half-site reactivity" (SEYDOUX et al, 1974).

Atualmente sabe-se que 3 tipos diferentes de aminoácidos são essenciais para a atividade da ALA-D:

- a- um resíduo de lisina ao qual se liga a primeira molécula de substrato, através de uma base de Schiff (NANDI, 1978; GIBBS & JORDAN, 1986);
- b- um resíduo de histidina, o qual pode sofrer fotooxidação, reduzindo tanto a atividade enzimática quanto a ligação ao zinco (TSUKAMOTO et al., 1979).

Este resíduo poderia participar no mecanismo de transferências de prótons do meio aquoso ao sítio ativo hidrofóbico (BATLLE & STELLA, 1978); c- dois resíduos de cisteína, os quais devem estar reduzidos para que a enzima apresente atividade (CHEH & NEILANDS, 1976). Estes resíduos são altamente reativos (GIBBS et al, 1985), podendo formar uma ponte dissulfeto em presença de ar, formar mercaptídeos por reação com metais pesados ou ser modificados por agentes químicos. A oxidação desses resíduos leva à inativação da enzima com concomitante perda do zinco ligado (TSUKAMOTO et al., 1979).

O PAPEL DO ZINCO E DO MAGNÉSIO NA ALA-D

A atividade da ALA-D de mamíferos é inibida por quelantes como EDTA (ácido etileno-diaminotetracético) e 1,10-fenantrolina (CHEH & NEILANDS, 1976; SOMMER & BEYERSMANN, 1984). Esta inibição pode ser revertida pela adição de zinco (BEVAN et al, 1980), demonstrando que o zinco faz parte da estrutura da enzima. A ALA-D de mamíferos requer zinco para estar ativa. Quando isolada, esta enzima liga 8 Zn^{2+} /octâmero (TSUKAMOTO et al, 1979; BEVAN et al, 1980; SOMMER & BEYERSMANN, 1984), no entanto existe controvérsia quanto ao número de átomos de zinco que seria necessário para a atividade máxima da enzima, com este número variando entre 4 e 8 (SHEMIN, 1976; BEVAN et al, 1980; TSUKAMOTO et al, 1980; JAFFE et al, 1984). Aparentemente, quando ensaiada na presença de altas concentrações de um agente redutor, a enzima requer apenas 4 íons zinco por octâmero para apresentar atividade máxima (BEVAN et al., 1980; JAFFE et al., 1984). Estes quatro íons zinco foram denominados catalíticos. Os resultados contraditórios de TSUKAMOTO et al. (1979) demonstrando que o zinco não é essencial para a atividade catalítica da enzima, uma vez que a apoenzima de fígado bovino preparada e mantida sob condições estritamente anaeróbicas apresenta atividade máxima, podem ser devido a

presença de uma concentração de zinco contaminante (1-2 μM) maior que a concentração da enzima (0,5 μM) no ensaio (SPENCER & JORDAN, 1993).

A ALA-D é uma metaloenzima um pouco atípica, pois o Zn^{2+} frequentemente é perdido durante a sua purificação. Após a remoção do zinco por EDTA, os grupos -SH da enzima são facilmente oxidados, com perda da atividade enzimática. A apoenzima oxidada obtida então, não incorpora zinco na ausência de um ativador tiólico (TSUKAMOTO et al, 1979; BEVAN et al, 1980). Entretanto, isto não é obrigatoriamente uma evidência de que o zinco está ligado a grupamentos sulfidríla, uma vez que a redução de uma ponte dissulfeto poderia estar abrindo um canal através do qual o Zn^{2+} poderia entrar e se ligar a outros grupamentos.

O papel do zinco na atividade da ALA-D ainda não está completamente elucidado. Algumas evidências sugerem uma função catalítica direta, enquanto outras apontam para uma função estrutural do zinco na ALA-D (BORDER et al., 1976; TSUKAMOTO et al., 1979; BEVAN et al., 1980; SOMMER & BEYERSMANN, 1984; BEYERSMANN & COX, 1984; GIBBS et al., 1985; HASNIAN et al., 1985; BLOCK et al, 1990; DENT et al, 1990; SPENCER & JORDAN, 1995).

Em 1990, DENT et al. verificaram a existência de 2 sítios estruturalmente distintos para ligação do zinco na ALA-D bovina. Um deles seria composto por 5 ligantes: 2 ou 3 histidinas, 1 ou nenhum oxigênio de um grupo como tirosina ou uma molécula de solvente, 1 tirosina ou aspartato e 1 -SH de cisteína. Este tipo de sítio estaria envolvido na ligação dos 4 íons zinco essenciais para a completa ativação da ALA-D, os quais têm sido referidos como catalíticos. O zinco catalítico parece ser importante para a união da segunda molécula de substrato, para a formação da primeira ligação entre as duas moléculas de ALA (ligação carbono-nitrogênio) e para a união do produto (JAFFE et al., 1992; SPENCER & JORDAN, 1994). O segundo sítio seria composto por 4 resíduos de cisteína e estaria envolvido na ligação dos outros 4 átomos de zinco não essenciais, os quais tem sido

referidos como estruturais. O primeiro sítio tem sido designado sítio A (Zn_A) e o segundo sítio B (Zn_B).

JAFFE et al. (1995) propuseram que o sítio A, responsável pela união do zinco essencial para a atividade catalítica da ALA-D de mamíferos, estaria presente também na ALA-D de plantas num número de 4 por octâmero (JAFFE et al., 1995). No entanto, até o momento ainda não foi demonstrada a existência de zinco ligado à enzima de plantas, sugerindo-se que a afinidade da enzima por este metal seja bastante elevada, o que dificultaria a sua remoção por quelantes, bem como a sua perda durante a purificação da enzima. Recentemente PETROVICH et al. (1996) demonstraram pela primeira vez a existência de uma enzima ALA-D que não apresenta zinco com ação catalítica (ligado ao sítio A). Esta enzima foi isolada da bactéria fotossintetizante *Bradyrhizobium japonicum*, e conforme previsto por JAFFE et al. (1995), na presença de altas concentrações de zinco (superiores a faixa de concentração fisiológica) é capaz de unir o metal ($K_d=200 \mu M$), presumivelmente ao sítio A. Além disso, a ALA-D de plantas apresentaria ainda 4 sítios B para união de magnésio (os quais corresponderiam aos sítios B para união de zinco na ALA-D de mamíferos), possivelmente essenciais para a atividade da enzima (JAFFE et al., 1994), e 8 sítios C para união de íons magnésio (ativam a enzima, mas não são essenciais para a atividade) por octâmero (MITCHELL & JAFFE, 1993; JAFFE et al., 1995).

A ALA-D de *E. coli* possui as sequências que supostamente correspondem aos sítios A e B para união de zinco, encontrados na ALA-D de mamíferos (JAFFE, 1993). Esta enzima apresenta 2 mol Zn^{2+} /mol de subunidade, possuindo dois sítios diferentes de ligação para o metal, sítios alfa ou A e os sítios beta ou B (SPENCER & JORDAN, 1995). A presença de dois sítios diferentes para ligação do metal (Zn^{2+} , na enzima de origem animal e Mg^{2+} na enzima de origem vegetal) pode indicar mais de uma função para os íons metálicos, possivelmente catalítica e estrutural (SPENCER & JORDAN, 1993). Assim como a ALA-D proveniente de plantas, a ALA-D de *E. coli* é ativada por magnésio, o qual participa na manutenção da estrutura

octamérica da enzima (JAFJE et al., 1995). O magnésio que ativa a enzima (Mg_C) não é necessário para a atividade da mesma (MITCHELL & JAFJE, 1993; SPENCER & JORDAN, 1993) e se une a um sítio distinto dos sítios para Zn_A e Zn_B , presentes na ALA-D de *E. coli* e de mamíferos. A ALA-D de *E. coli* aparentemente possui 8 sítios para união de zinco (4 sítios A e 4 sítios B) e 8 sítios para união de magnésio (supostamente sítio C) por octâmero. O zinco parece ser capaz de se ligar ao sítio C de união para magnésio quando este íon está ausente (SPENCER & JORDAN, 1993; MITCHELL & JAFJE, 1993), sem ocorrer, no entanto, uma ativação da enzima. JAFJE et al. (1994) obtiveram evidências de que o sítio B para união de zinco na enzima de mamíferos e de *E. coli* estaria localizado no sítio ativo da enzima, mas não possuiria função catalítica, tendo sido especulado que o zinco ligado a este sítio poderia ter a função de manter grupos -SH no estado reduzido. Recentemente obtivemos evidências experimentais, que confirmam a hipótese de que o zinco ligado ao sítio B na ALA-D de mamíferos possui um papel antioxidante (EMANUELLI et al., 1997). Observamos que a inibição da ALA-D de fígado e rim de camundongos por 2,3-dimercaptopropanol (BAL) até 1mM e por EDTA até 25 μ M é completamente revertida pela adição de zinco (25 μ M) ou de DTT (10mM), indicando que nestas concentrações BAL e EDTA inibem a ALA-D por remover íons zinco envolvidos na manutenção de grupos -SH da enzima no seu estado reduzido (provavelmente zinco unido ao sítio B). Por outro lado, a inibição da ALA-D por concentrações maiores de EDTA (33-100 μ M) não foi revertida por DTT (10 mM), indicando que nestas concentrações o EDTA estaria removendo íons zinco mais firmemente ligados a enzima. Estes íons zinco não parecem estar envolvidos na estabilização do estado reduzido da enzima, mas são essenciais para a atividade catalítica (provavelmente zinco ligado ao sítio A) (EMANUELLI et al., 1997). Assim sendo, a presença de zinco ligado ao sítio B também é necessária para a atividade máxima da enzima, isto provavelmente não havia sido observado até o momento, pois a maioria dos ensaios para determinação da atividade da ALA-D eram realizados na presença de altas

concentrações de agentes redutores, tais como glutathione, ditioneitol ou β -mercaptoetanol (BEVAN et al., 1980; JAFFE et al., 1984). Segundo MITCHELL & JAFFE (1993), a ocupação dos sítios catalítico e estrutural do zinco na ALA-D de mamíferos seria mutuamente excludente, o que explicaria a presença de 4 sítios A e 4 sítios B para união de zinco por octâmero.

IMPORTÂNCIA BIOMÉDICA DA ALA-D

Devido a sua natureza sulfidrídica, a enzima ALA-D é inibida por metais pesados, tais como chumbo e mercúrio tanto *in vivo* quanto *in vitro* (GOERING & FOWLER, 1984, 1985; GOERING et al., 1986; RODRIGUES et al., 1989, 1996; ROCHA et al., 1995; EMANUELLI et al., 1996). Existem evidências de que a inibição dessa enzima possui um papel na toxicidade destes metais. A inibição da ALA-D pode prejudicar a rota de biossíntese do heme, o que por sua vez pode ter consequências patológicas (FISCHBEIN et al., 1982; SASSA et al., 1989; GOERING, 1993). O acúmulo do substrato da ALA-D, ALA, pode estar implicado na superprodução de espécies ativas de oxigênio (MONTEIRO et al., 1989; PEREIRA et al., 1992; BECHARA et al., 1993). Foi demonstrado também, que o ALA é um potente agonista dos receptores gabaérgicos pré-sinápticos, podendo contribuir para um efeito neurotóxico desta substância (BRENNAN & CANTRILL, 1979; KAPPAS et al., 1995). Por outro lado, mesmo que a ALA-D não participe dos mecanismos primários de toxicidade de metais pesados a sua avaliação pode servir como parâmetro para verificar o estado geral de intoxicação (BONSIGNORE, 1966; NAKAO et al., 1968; HERNEBERG et al., 1970; MITCHELL et al., 1977; MEREDITH et al., 1979).

Além disso, as alterações patológicas observadas em alguns tipos de porfíria e na tirosinemia hepatorenal parecem estar relacionadas a toxicidade do ALA, o qual se acumula devido a inibição da ALA-D (KAPPAS et al., 1995; MITCHELL et al., 1995). Recentemente foi demonstrado que a administração sistêmica de ALA pode provocar danos oxidativos no sistema

nervoso central, além de aumentar o K_d para a união de muscimol (agonista dos receptores gabaérgicos do tipo A) a sítios de alta afinidade (DEMASI et al., 1996).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAZARRAY, M.T.R. Efeito de metais pesados em plantas: delta-aminolevulinato desidratase em *Ricinus communis*. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Ecologia, UFRGS, 1986. Dissertação de Mestrado.
- BARNARD, G.F.; ITOH, R.; HOHBERGER, L.H. and SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase - Possible role of essential thiol groups. J. Biol. Chem. 252:8965-8974 (1977).
- BARREIRO, O.L.C. 5-Aminolevulinato hidrolase de levedura. Isolamento e purificação. Biochim. Biophys. Acta 139:479-486 (1967).
- BATLLE, A.M. del C.; FERRAMOLA, A.M.; GRINSTEN, M. Purificação e propriedades gerais de delta-aminolevulinato desidratase de fígado de vaca. Biochem. J. 104:244-249 (1967).
- BATLLE, A.M. del C. & STELLA, A.M. Delta aminolevulinato desidratase: seu mecanismo de ação. Int. J. Biochem. 9:861- 864 (1978).
- BATTISTUZZI, G.; PETRUCCI, R.; SILVAGNI, L.; URBANI, F.R.; CAIOLA, S. Delta-aminolevulinato desidratase: um novo polimorfismo genético em humanos. Ann. Hum. Genet. 45:223-229 (1981).
- BECHARA, E.J.H.; MEDEIROS, M.H.G.; MONTEIRO, H.P.; HERMES-LIMA, M.; PEREIRA, B.; DEMASI, M.; COSTA, C.A.; ADBALLA, D.S.P.; ONUKI, J.; WENDEL, C.M.A. & MASCI, P.D. A hipótese de radicais livres na intoxicação por chumbo e porfirias associadas com 5-aminolevulinato desidratase. Química Nova. 16: 385-392 (1993).
- BELLINASSO, M.L. Estudo comparativo da delta-aminolevulinato desidratase em eritrócito humano e fígado de peixes (*Pimelodus maculatus*) e o efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-graduação em Bioquímica, UFRGS, 1985. Dissertação de Mestrado.
- BEVAN, D.R.; BODLAENDER, P.; SHEMIN, D. Mechanism of porphobilinogen synthase. Requirement of Zn^{2+} for enzyme activity. J. Biol. Chem. 255(5):2030-2035 (1980).
- BEYERSMANN, D. & COX, M. Afinidade de rotulagem de 5-aminolevulinato desidratase com 2-bromo-3-(5-imidazolil)propionato. Biochim. Biophys. Acta 788:162-168 (1984).
- BISHOP, T.R.; FRELIN, L.P. AND BOYER, S.M. Isolamento de ratão fígado δ -aminolevulinato desidratase (ALAD) cDNA clone: evidência para desigual ALAD gene dosagem entre linhagens de camundão. Nucleic Acid Res. 14: 10115 (1986).

- BISHOP, T.R.; HODES, Z.I.; FRELIN, L.P. & BOYER, S.H. Cloning and sequence of mouse erythroid delta-aminolevulinic acid dehydratase cDNA. Nucleic Acid Res. 17(4):1775 (1989).
- BLOCK, C.; LOHMANN, R.D. and BEYERSMANN, D. Probing of active site residues of the zinc enzyme 5-aminolevulinic acid dehydratase by spin and fluorescence labels. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371:1145-1152 (1990).
- BOESE, Q.F.; SPANO, A.J.; LI, J. & TIMKO, M.P. δ -Aminolevulinic acid dehydratase in pea (*Pisum sativum* L.). Identification of an unusual metal-binding domain in the plant enzyme. J. Biol. Chem. 266: 17060-17066 (1991).
- BONSIGNORE, D. L'attività ALA-deidratasica eritrocitaria quale test diagnostico nel saturnismo professionale. Med. Lav. 57:647-654 (1966).
- BORDER, E.A.; CANTRELL, A.C.; KILROE-SMITH, T.A. The in vitro effect of zinc and other metal ions on the activity of human erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase. Environ. Res. 11:319-325 (1976).
- BORRALHO, L.M. Ácido delta-aminolevulinico desidratase de *Saccharomyces cerevisiae*: tópicos sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e regulatórias. Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRJ, 1990. Tese de Doutorado.
- BORRALHO, L.M.; MALAMUD, D.R.; PANEK, A.D.; TENAN, M.N.; OLIVEIRA, D.E. & MATTOON, J.R. Parallel changes in catabolite repression of hem biosynthesis and cytochromes in repression-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 135:1217-1227 (1989).
- BORRALHO, L.M.; ORTIZ, C.H.D.; PANEK, A.D. & MATTOON, J.R. Purification of delta-aminolevulinic acid dehydratase from genetically engineered yeast. Yeast 6:319-330 (1990).
- BRENNAN, M.J.W. & CANTRILL, R.C. δ -Aminolevulinic acid is a potent agonist for GABA autoreceptors. Nature (London) 280: 514-515 (1979).
- CHAUDHRY, A.G.; GORE, M.G. and JORDAN, P.M. Studies on the inactivation of 5-aminolevulinic acid dehydratase by alkylation. Biochem. Soc. Trans. 4:301-303 (1976).
- CHAUHAN, S. & O'BRIAN, M.R. A mutant *Bradyrhizobium japonicum* delta-aminolevulinic acid dehydratase with an altered metal requirement functions in situ for tetrapyrrole synthesis in soybean root nodules. J. Biol. Chem. 270(34):19823-19827 (1995).
- CHEH, A. & NEILANDS, J.B. Zinc, an essential metal ion for beef liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55:1060-1063 (1973).
- CHEH, A. & NEILANDS, J.L. The delta-aminolevulinic acid dehydratases: molecular and environmental properties. Struct. Bonding (Berlin) 29:123-169 (1976).
- CHINARRO, S.; STELLA, A.M.; BERGES, L.; SALAMANCA, R.E.; BATLLE, A.M. del C. Aminolevulinato desidratasa: propiedades y mecanismo de acción. N. Arch. Fac. Med. 41:61-70 (1983).

- DEMASI, M.; PENATTI, C.A.; DELUCIA, R. & BECHARA, E.J.H. The prooxidant effect of 5-aminolevulinic acid in the brain tissue of rats: implications in neuropsychiatric manifestations in porphyrias. Free Radic. Biol. Med. 20:291-299 (1996).
- DENT, A.J.; BEYERSMANN, D.; BLOCK, C. and HASNAIN, S.S. Two different zinc sites in bovine 5-aminolevulinic acid dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. Biochemistry 29:7822-7828 (1990).
- DRESEL, E.I.B. & FALK, J.E. Conversion of delta-aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. Nature 172:1185 (1953).
- ECHELARD, Y. ; DYMETRYZYN, J.; DROLET, M. & SASARMAN, A. Nucleotide sequence of the hemB gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 214: 503-508 (1988).
- EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; PORCIUNCULA, L.O.; MORSCH, V.M.; MARTINS, A.F. & SOUZA, D.O.G. Effect of mercuric chloride intoxication and dimercaprol treatment on delta-aminolevulinic acid dehydratase from brain, liver and kidney of adult mice. Pharmacol. Toxicol. 79:136-143 (1996a).
- EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; NASCIMENTO, P.C.; BEBER, F.A. & SOUZA, D.O.G. Delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. (Submetido para publicação).1996b.
- FINELLI, V.N.; KLAUDER, D.S.; KARAFFA, M.A. and PETERING, H.G. Interaction of zinc and lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 65:303-311 (1975).
- FINELLI, V.N.; MURHTY, L.; PEIRANO, W.B.; PETERING, H.G. Delta-aminolevulinic acid dehydratase, a zinc dependent enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:1418-1424 (1974).
- FISCHBEIN, A.; WALLACE, J.; ANDERSON, K.E.; SASSA, S.; KON, S.; RHOL, A.N. & KAPPAS, A. Lead poisoning in an art conservator. J. Am. Med. Assoc. 247:2007-2009 (1982).
- FUJITA, H.; ORIL, Y.; SAND, S. Evidence of increased synthesis of delta-aminolevulinic acid dehydratase in experimental lead-poisoned rats. Biochim. Biophys. Acta 678:39-50 (1981).
- GIBBS, P.N.B.; GORE, M.G. & JORDAN, P.M. Investigation of the effect of metal ions on the reactivity of thiol groups in human 5-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 225:573-580 (1985).
- GIBBS, P.N.B. & JORDAN, P.M. Identification of lysine at the active site of human delta-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 236:447-451 (1986).
- GIBSON, K.D.; NEUBERGER, A.; SCOTT, J.J. The purification and properties of delta-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 61:618-629 (1955).
- GOERING, P.L. Lead protein interactions as a basis for lead toxicity. Neurotoxicology. 14:45-60 (1993).
- GOERING, P.L. & FOWLER, B.A. Regulation of lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase by a low molecular weight, high affinity

- renal lead-binding protein. J. Pharmacol. Exp. Therap. 231:66-71 (1984).
- GOERING, P.L. & FOWLER, B.A. Mechanism of renal lead-binding protein reversal of delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by lead. J. Pharmacol. Exp. Therap. 234: 365-371 (1985).
- GOERING, P.L.; MISTRY, P. & FOWLER, B.A. A low molecular weight lead-binding protein in brain attenuates lead inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase: comparison with a renal lead-binding protein. J. Pharmacol. Exp. Therap. 237:220-225 (1986).
- GRANICK, S. & BEALE, S.I. Hemes, chlorophylls and related compounds: Biosynthesis. Adv. Enzymol. 46:33-203 (1978).
- GRANICK, S. & MAUZERALL, D. Porphyrin biosynthesis in erythrocytes. II. Enzymes converting delta-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. J. Biol. Chem. 232:1119-1140 (1958).
- GUO, G.G.; GU, M. & ETLINGER, J.D. 24--kDa proteasome inhibitor (CF-2) is identical to delta-aminolevulinic acid dehydratase. The Journal of Biological Chemistry 269(17):12399-12402 (1994).
- HASNIAN, S.S.; WARDELL, E.M.; GARNER, C.D.; SCHLOSSER, M. & BEYERSMANN, D. Extended-X-ray-absorption-fine-structure investigations of zinc in 5-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. J. 230:625-633 (1985).
- HERNEBERG, S.; NIKKANEN, J.; MELLIN, G.; LILIUS, H. Delta-aminolevulinic acid dehydratase as a measure of lead exposure. Arch. Environ. Health 21:140-145 (1970).
- HODSON, P.V.; BLUNT, B.R.; SPRY, D.J.; AUSTEN, K. Evaluation of erythrocyte delta-amino levulinic acid dehydratase activity as a short-term indicator in fish of a harmful exposure to lead. J. Fish. Res. Board Can. 33:501-508 (1977).
- JAFFE, E.K. Predicting the Zn(II) ligands in metalloproteins: case study, porphobilinogen synthase. Comm. Inorg. Chem. 15:67-93 (1993).
- JAFFE, E.K.; ABRAMS, W.R.; KAEMPFEN, H.X. & HARRIS, Jr. K.A. 5-Chlorolevulinic acid modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. Biochem. 31: 2113-2123 (1992).
- JAFFE, E.K.; ALI, S.; MITCHELL, L.W.; TAYLOR, K.M.; VOLIN, M. & MARKHAM, G.D. Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* porphobilinogen synthase. Biochem. 34:244-251 (1995).
- JAFFE, E.K. & HANES, D. Dissection of the early steps in the porphobilinogen synthase catalysed reaction - Requirement for Schiff's base formation. J. Biol. Chem. 261:9348-9353 (1986).
- JAFFE, E.K. & MARKHAM, G.D. Carbon-13 NMR studies of porphobilinogen synthase: observation of intermediates bound to a 280,000-dalton protein. Biochem. 26:4258-4264 (1987).
- JAFFE, E.K.; MARKHAM, G.D. & RAJAGOPALAN, J.S. ¹⁵N and ¹³C NMR studies of ligands bound to the 280 000-dalton protein porphobilinogen synthase elucidate the structures of enzyme-bound product and a schiff base intermediate. Biochem. 29:8345-8350 (1990).

- JAFFE, E.K.; SALOWE, S.P.; CHEN, N.T. & DE HAVEN, P.A. Porphobilinogen synthase modification with methylmethanethiosulfonate-A protocol for the investigation of metalloproteins. J. Biol. Chem. 259:5032-5036 (1984).
- JAFFE, E.K.; VOLIN, M. & MYERS, C.B. 5-Chloro[1,4-¹³C]levulinic acid modification of mammalian and bacterial porphobilinogen synthase suggests an active site containing two Zn(II). Biochem. 33:11554-11562 (1994).
- JORDAN, P.M. & GIBBS, P.N.B. Mechanism of action of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from human erythrocytes. Biochem. J. 227: 1015-1020 (1985).
- JORDAN, P.M.; GORE, M.G. & CHAUDHRY, A.G. Subunit modification of 5-aminolevulinic acid dehydratase involving cysteine residues. Biochem. Soc. Trans. 4:762-763 (1976).
- JORDAN, P.M. & SEEHRA, J.S. Carbon-13 NMR as a probe for the study of enzyme-catalyzed reactions. Mechanism of action of 5-aminolevulinic acid dehydratase. FEBS Lett. 114: 283-286 (1980).
- KAPPAS, A.; SASSA, S.; GALBRAITH, R.A.; NORDMANN, Y. The Porphyrins. In: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (McGraw Hill, New York), pp. 2103-2160 (1995).
- LASCELLES, J. The regulation of heme and chlorophyll synthesis in bacteria. Ann. New York Acad. Sci. 244: 334-347 (1975).
- LI, J.M.; RUSSELL, C.S.; COSLOY, S.D. & SHARON, D. The structure of the *Escherichia coli* hemB gene. Gene 75: 177-184 (1989).
- MATTERS, G.L. & BEALE, S.I. Structure and expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* *alad* gene encoding the chlorophyll biosynthetic enzyme, delta-aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase). Plant. Mol. Biol. 27(3): 607-617 (1995).
- MENON, I.A. & SHEMIN, D. Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B₁₂ and of propionic acid in Propionibacteria. Arch. Biochem. Biophys. 121: 304-310 (1967).
- MEREDITH, P.A.; MOORE, M.R.; GOLDBERG, A. Erythrocyte ALA dehydratase activity and blood protoporphyrin concentrations as indices of lead exposure and altered haem biosynthesis. Clin. Sci. Mol. Med. 56:61-69 (1979).
- MITCHELL, L.W. & JAFFE, E.K. Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II). Arch. Biochem. Biophys. 300:169-177 (1993).
- MITCHELL, R.A.; DRAKE, J.E.; WITTLIN, L.A.; REJENT, T.A. Erythrocyte porphobilinogen synthase (Delta-aminolaevulinic acid dehydratase) activity: a reliable and quantitative indicator of lead exposure in humans. Clin. Chem. 23:105-111 (1977).
- MITCHELL, G.A.; LAMBERT, M.; TANGUAY, R.M. Hypertyrosinemia In: *The Metabolic Bases of Inherited Disease*, eds. Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. (McGraw Hill, New York), pp. 1077-1106 (1995).
- MONTEIRO, H.P.; ABDALLA, D.S.P.; AUGUSTO, O. & BECHARA, E.J.H. Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation:

- induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. Arch. Biochem. Biophys. 271(1):206-216 (1989).
- MUTHUKRISHNAN, S.; MALATHI, K. & PADMANABAN, G. δ -Aminolaevulinic acid dehydratase, the regulatory enzyme of the haem-biosynthetic pathway in *Neurospora crassa* Biochem. J. 129:31-37 (1972).
- NAKAO, K.; WADA, O.; YANO, Y. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in erythrocytes for the evaluation of lead poisoning. Clin. Chim. Acta 19:319-325 (1968).
- NANDI, D.L. δ -Aminolevulinic acid synthase of *Rhodopseudomonas spheroides*. Binding of pyridoxal phosphate to the enzyme. Z.Naturforsch. 33C:799-800 (1978).
- NANDI, D.L.; BAKER-COHEN, K.F. & SHEMIN, D. δ -Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*: I. Isolation and properties. J. Biol. Chem. 243: 1224-1230 (1968).
- NELSON, H.M.; UGHES, M.A.; MEREDITH, P.A. Zinc, copper and delta-aminolevulinic acid dehydratase *in vitro* and *in vivo*. Toxicology 21:261-266 (1981).
- PEREIRA, B.; CURI, R.; KOKUBUN, E. & BECHARA, J.H. 5-Aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. J. Appl. Physiol. 72(1): 226-230 (1992).
- PETROVICH, R.M.; LITWIN, S. & JAFFE, E.K. *Bradyrhizobium japonicum* porphobilinogen synthase uses two Mg(II) and monovalent cations. J. Biol. Chem. 271(15): 8692-8699 (1996).
- PETRUCCI, R.; LEONARDI, A.; BATTISTUZZI, G. The genetic polymorphism of human delta-aminolevulinic acid dehydratase in Italy. Hum. Genet. 60:289-290 (1982).
- ROCHA, J.B.T.; FREITAS, A.J.; MARQUES, M.B.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O. Effects of methylmercury exposure during the second stage of rapid postnatal brain growth on negative geotaxis and on delta-aminolevulinic acid dehydratase of suckling rats. Brazilian J. Med. Biol. Res. 26:1077-1083 (1993).
- ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E.; EMANUELLI, T.; CHRISTOFARI, R.S.; SOUZA, D.O. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. Toxicology 100:27-37 (1995).
- RODRIGUES, A.L.S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (E.C.: 4.2.1.24) em sangue de *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae): características bioquímicas e efeito de metais pesados. Porto Alegre, Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, UFRGS, 1987. Dissertação de Mestrado.
- RODRIGUES, A.L., BELLINASSO, M.L. & DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). Comp. Biochem. Physiol. 94B:65-69 (1989).
- RODRIGUES, A.L.S.; ROCHA, J.B.T.; PEREIRA, M.E. & SOUZA, D.O. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats

- exposed to lead acetate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 57:47-53 (1996).
- SASSA, S.; FUJITA, H. & KAPPAS, A. Genetic and chemical influences on heme biosynthesis. In: A. Kotyk, J. Skoda; V. Paces and V. Kostka (Eds.), Highlights of Modern Biochemistry, VSP, Utrecht, Vol. 1, pp. 329-338 (1989).
- SCHAUMBURG, A.; SCHNEIDER-POETSH, A.A.W. & ECKERSKORN, C. Characterization of plastid 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D, EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non plant ALA-D enzymes. Z. Naturforsch. 47C: 77-84 (1991).
- SEYDOUX, F.; MALHOTRA, P.O. & BERNHARD, S.A. Half-site reactivity. Crit. Rev. Biochem. 2:227-257 (1974).
- SHEMIN, D. 5-Aminolaevulinic acid dehydratase: structure, function, and mechanism. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 273B:109- 115 (1976).
- SHIBATA, H. & OCHIAI, H. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid dehydratase from radish cotyledons. Plant & Cell Physiol., 18: 421-429 (1977).
- SPENCER, P. & JORDAN, P. M. Purification and characterization of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli* and a study of the reactive thiols at the metal-binding domain. Biochem. J. 290:279-287 (1993).
- SPENCER, P. & JORDAN, P.M. Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 300:373-381 (1994).
- SPENCER, P. & JORDAN, P.M. Characterization of the two 5-aminolaevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. Biochem. J. 305:151-158 (1995).
- SOMMER, R. & BEYERSMANN, D. Zinc and cadmium in 5-aminolevulinic acid dehydratase. Equilibrium, kinetic, and ^{113}Cd -nmr-studies. J. Inorg. Biochem. 20:131-145 (1984).
- TAMAI, H.; SHIOI, Y. & SASA, T. Purification and characterization of delta-aminolevulinic acid dehydratase from *Chlorella regularis*. Plant & Cell Physiol. 20(2): 435-444 (1979).
- TIGIER, H.A.; BATLLE, A.M. del C.; LOCASCIO, G.A. Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system. Isolation, purification and general properties of delta-aminolaevulinic acid dehydratase. Biochem. Biophys. Acta 151:300-302 (1968).
- TIGIER, H.A.; BATLLE, A.M. del C.; LOCASCIO, G.A. Porphyrin biosynthesis in the soybean callus tissue system. II. Improved purification and some properties delta-aminolaevulinic acid dehydratase. Enzymologia 38:43-56 (1970).
- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; and SANO, S. The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in delta-aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. Biochim. Biophys. Acta 570:167-178 (1979).

- TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T.; SANO, S. Zinc and cysteine residues in the active site of bovine liver delta-aminolevulinic acid dehydratase. Int. J. Biochem. 12:751-756 (1980).
- VERGNANO, C.; CARTASEGNA, C. & BONSIGNORE, D. Regolazione allosterica della attività delta-amino-levulinico-deidratasi eritrocitaria. - Nota I. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 64(7): 692-695 (1968).
- WETMUR, J.G. Influence of the common human delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism on lead body burden. Environmental Health Perspectives 102, sup. 3:215-219 (1994).
- WETMUR, J.G.; BISHOP, D.F.; CANTELMO, C. & DESNICK, R.J. Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7703-7707 (1986).
- WILSON, E.L.; BURGER, P.E.; DOWDLE, E.B. Beef-liver 5-aminolevulinic acid dehydratase - Purification and properties. Eur. J. Biochem. 29:563-571 (1972).
- WU, W.; SHEMIN, D.; RICHARDS, K.E.; WILLIAMS, R.C. The quaternary structure of delta-aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:1767-1770 (1974).
- YUBISUI, T. & YONEYAMA, Y. δ -Aminolevulinic acid synthetase of *Rhodospseudomonas spheroides*: purification and properties of the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 150: 77-85 (1972).