

NEUZA MARIA BARBOSA

PROPRIEDADES CINÉTICAS DA TREONIL -
tRNA SINTETASE DE FIGADO BOVINO.
REAÇÕES DE INTERCÂMBIO ATP - PPi E
DE AMINOACILAÇÃO.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do
grau de Mestre em Biologia

Campinas

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que embora sejam leigos no assunto, sempre compreenderam e respeitaram os meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, orientador da presente tese, por ter-me propiciado as condições para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aldo Focesi, Chefe do Departamento de Bioquímica, pelo incentivo nesse início de carreira universitária, nosso especial agradecimento.

A todos os componentes do Departamento de Bioquímica, que me apoiaram durante este trabalho.

A FAPESP, pelo auxílio financeiro prestado a este projeto.

Ao Prof. Dr. Quivo Tahin por me ter facultado a utilização do contador de cintilação.

ABREVIATURAS

AA	= aminoácido
tRNA	= ácido ribonucleico de transferencia
AA-tRNA	= aminoacil-tRNA
ARS	= aminoacil-tRNA sintetase
ARS.AA-AMP	= enzima.aminoacil-adenilato
TRS	= treonil-tRNA sintetase
AMP	= adenosina 5'-monofosfato
ATP	= adenosina 5'-trifosfato
CTP	= citidina 5'-trifosfato
GTP	= guanosina 5'-trifosfato
UTP	= uridina 5'-trifosfato
PPi	= pirofosfato inorgânico
P.M.	= peso molecular
SH	= sulfidrila
DTT	= ditionotreitól
GSH	= glutation reduzido
DTNB	= ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
NEM	= N-etilmaleimida
PCMB	= p-cloromercuribenzoato
Tris	= tris(hidroximetil aminometano)
TCA	= ácido tricloroacético
DEAE	= dietil amino etil-
PPO	= 2,5-difenil oxazol
POPOP	= 1,4-bis-2(4 metil-5 fenil oxazolil)benzeno
Ativ.Esp.	= atividade específica
A ₂₈₀	= absorbância a 280 nm
KM	= constante de Michaelis
U	= unidades de atividade enzimática
BSA	= albumina de soro bovino
TEMED	= N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamino
EDTA	= ácido etileno diamino tetraacético

ÍNDICE

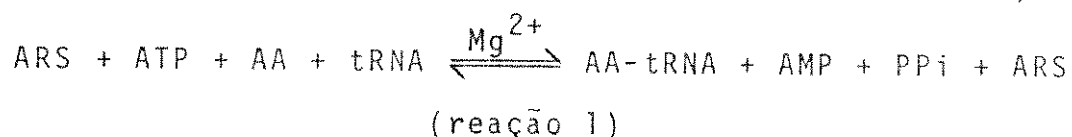
	pag.
Introdução	1
Material e Métodos	16
1. Material	16
2. Métodos	17
2.1. Purificação de treonil-tRNA sintetase de fígado de boi	17
2.2. Tratamento de carvão ativo	20
2.3. Padronização de carvão tratado	20
2.4. Preparação de pirofosfato (32 PPI)	21
2.5. Determinação de atividade enzimática ...	21
2.5.1. Método de intercâmbio isotópico ATP- 32 PPI	21
2.5.2. Método de aminoacilação do tRNA	22
2.6. Determinação da concentração de proteínas	23
2.7. Preparação de líquido de cintilação	23
2.8. Preparação de hidroxapatita	23
2.9. Ativação de DEAE-celulose	24
2.10. Ativação de fosfocelulose	24
2.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida ..	24
Resultados	25
1. Purificação	25
2. Propriedades cinéticas da TRS na reação de intercâmbio ATP-PPI	30
2.1. Influência do pH	30
2.2. Efeito da concentração da enzima	33
2.3. Influência da concentração de Mg^{2+}	33
2.4. Influência da concentração de ATP e determinação da KM	33
2.5. Influência da concentração de treonina e determinação da KM	37
2.6. Influência da concentração de PPI e determinação da KM	37
2.7. Influência do tRNA	37
2.8. Especificidade enzimática em relação a outros L-aminoácidos	37

2.9. Especificidade enzimática por outros nucleotídeos	42
2.10. Substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes	42
2.11. Substituição do Mg^{2+} por aminas	42
2.12. Efeito de reagentes SH	42
3. Propriedades cinéticas da TRS na reação de aminoacilação do tRNA	42
3.1. Influência do pH	47
3.2. Efeito da concentração de enzima	47
3.3. Influência da concentração de BSA	47
3.4. Influência da concentração de Mg^{2+}	47
3.5. Influência da concentração de ATP e determinação da K_M	47
3.6. Influência da concentração de tRNA e determinação da K_M	53
3.7. Influência da concentração de treonina e determinação da K_M	53
3.8. Especificidade da TRS por outros L-aminoácidos	53
3.9. Especificidade da TRS por outros nucleotídeos trifosfato	57
3.10. Substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes	57
3.11. Substituição do Mg^{2+} por amina	57
3.12. Influência de reagentes SH	62
Discussão	63
1. Purificação	63
2. Determinação dos parâmetros cinéticos pela reação de intercâmbio ATP-PPi	65
3. Determinação dos parâmetros cinéticos pela reação de aminoacilação	70
Conclusões	76
Resumo	77
Summary	78
Bibliografia	79

INTRODUÇÃO

A ligação de um aminoácido ao seu correspondente ácido ribonucleico de transferencia, com formação de complexos aminoacil-tRNAs, é o primeiro evento da biossíntese de proteínas. Após esta etapa, denominada de ativação dos aminoácidos, os aminoacil-tRNAs se dirigem para os ribossomos onde ocorrem as etapas subsequentes da síntese proteica.

A formação dos aminoacil-tRNAs é catalisada pelas aminoacil-tRNA sintetases ou L-aminoácidos: tRNA Ligases (AMP) [E.C.6.1.1.-] através de uma reação que pode ser esquematizada da seguinte maneira (Novelli, 1967; Mehler, 1970):

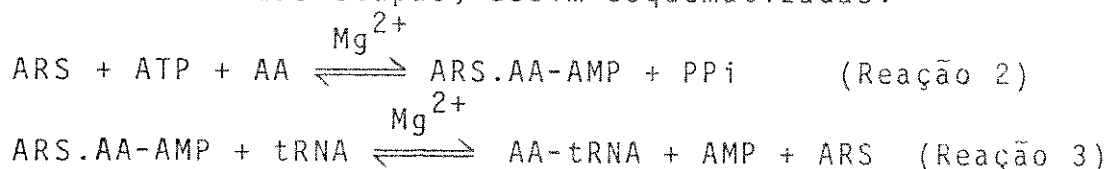


Nesta reação envolvendo três substratos, aminoácido, ATP e tRNA, cada aminoácido é esterificado ao grupo hidroxila 2' ou 3' da ribose na extremidade 3' do tRNA. A energia requerida para formação desta ligação éster é fornecida por hidrólise do ATP que é dependente de cátions bivalentes, geralmente Mg^{2+} , como a maioria das reações enzimáticas que utilizam ATP como fonte de energia.

Quanto aos possíveis mecanismos de reação as ARS estão divididas em dois grupos:

1) Enzimas que catalisam a reação de aminoacilação do tRNA em uma única etapa, conforme mostra a Reação 1. Pertencem a este grupo as ARS que necessitam da presença dos três substratos para que a reação ocorra (Lovgren e colaboradores, 1975; Takeda e Ohnishi, 1975).

2) Enzimas que catalisam a reação de aminoacilação do tRNA em duas etapas, assim esquematizadas:



Na primeira etapa (Reação 2), conhecida como reação de intercâmbio ATP-PPi, a ARS interage com dois substratos, ATP e aminoácido, formando um complexo intermediário funcional, aminoacil-adenilato, onde o grupo carboxila do aminoácido forma uma ligação tipo anidrido com o grupo fosfato 5' do ATP, deslocando pirofosfato inorgânico. Na segunda etapa (Reação 3), denominada de aminoacilação do tRNA, o aminoácido é transferido do complexo aminoacil-adenilato ao seu correspondente tRNA (Midelfort e colaboradores, 1975; Santi e Webster, 1975).

A ocorrência de ARS nas células está diretamente relacionada com o número de L-aminoácidos naturais, isto é, existe uma enzima para cada aminoácido, embora possa existir um ou mais tRNAs codificando um mesmo aminoácido.

Sendo enzimas precursoras da síntese de proteínas, as ARS estão presentes em todas as células de organismos procaríotos e eucariotos. Quanto à localização intracelular, as ARS são encontradas no citoplasma, e mais recentemente tem-se isolado enzimas de organelas como mitocôndrias (Chiu e Suyama, 1975) e cloroplastos (Locy e Cherry, 1978) que diferem das ARS de origem citoplasmática, tanto em aspectos estruturais como em propriedades cinéticas. As enzimas citoplasmáticas, porém, são as mais conhecidas, existindo amplas revisões

abrangendo os mais variados aspectos (Söll e Schimmel, 1974; Kisselev e Favorova, 1974; Schimmel e Söll, 1979).

A baixa frequência de erros na estrutura primária das proteínas demonstra a grande especificidade das ARS em relação ao reconhecimento dos seus substratos, aminoácido, ATP e tRNA. Os fatores determinantes desta alta especificidade não são conhecidos até o momento.

Com a finalidade de obter informações mais precisas sobre vários aspectos, os autores vem procurando purificar cada vez mais as ARS, sendo no entanto que poucas tem chegado a nível de cristalização.

Purificação

Desde o isolamento da primeira ARS, a triptofanil-tRNA sintetase de mamífero por Hoagland (1955), uma grande variedade de sintetases tem sido isolada de diferentes fontes, sendo os procariotos mais utilizados que os eucariotos vegetais e animais (Söll e Schimmel, 1974).

Os procariotos mais usados para extração das ARS são Escherichia coli, levedura e Bacillus stearothermophilus. Entre as sintetases provenientes destas três fontes, as enzimas de E.coli são as mais estudadas, tendo-se recentemente ARS para cada um dos vinte diferentes L-aminoácidos, a partir de um mesmo extrato de células (Kern e Lapointe, 1979). De levedura, um pouco menos estudadas que E.coli, também já foram purificadas as vinte diferentes enzimas (Kern e colaboradores, 1977).

Nos eucariotos, devido a maior complexidade do sis

tema, como por exemplo as sintetases formando complexos estáveis de alto peso molecular que contêm diferentes enzimas agregadas (Kellermann e colaboradores, 1979), o processo de purificação torna-se mais difícil, razão pela qual são menos empregados como fonte de extração. A maior parte das enzimas purificadas de origem animal é de mamíferos. Nos vegetais, geralmente, utilizam-se sementes como fontes de purificação das sintetases.

O grau de homogeneidade das ARS purificadas por diferentes métodos é bastante variável. Geralmente, são empregadas três ou mais etapas cromatográficas tornando o processo demorado. O uso de reagentes protetores de grupos SH e inibidores de proteólise evitam a degradação da enzima durante a purificação. Atualmente tem-se adicionado às técnicas usuais de purificação, a cromatografia por afinidade que tem melhorado sensivelmente a homogeneidade das ARS. Neste método, a enzima é fixada a uma resina e posteriormente eluída por um ou mais dos seus substratos. Uma das resinas mais utilizadas é a Sepharose ligada a Azul de Dextrano, devido a afinidade que as ARS possuem por este cromóforo (Moe e Piszkiwicz, 1976). A eluição da enzima a partir deste suporte é bastante variável, dependendo da enzima e da fonte de obtenção. Imbault e colaboradores (1979) mostraram que a valil-tRNA sintetase de cloroplastos de Euglena gracilis era eluída por aplicação de uma solução contendo L-valina, ATP e Mg^{2+} . Em contrapartida, Sarantoglou e colaboradores (1980), trabalhando com a mesma enzima isolada de citoplasma de Euglena gracilis pela mesma técnica, somente conseguiram a eluição utilizando o tRNA específico.

Uma alternativa para este método é o emprego de fosfocelulose como suporte ao invés de Sepharose-azul de de trano. As sintetases são adsorvidas inespecificamente em fosfocelulose e posteriormente eluidas pelos seus respectivos tRNAs. Yamada (1978), purificando ARS de levedura por esta técnica, verificou que a valil e tirosil-tRNA sintetases não eram eluidas pelos seus respectivos tRNAs na ausência de Mg^{2+} e a isoleucil-tRNA sintetase requeria a presença de Mg^{2+} e ATP para ser eluída pelo seu correspondente tRNA.

Os exemplos citados mostram as dificuldades no estabelecimento de um método padrão de purificação das sintetases, pois uma mesma técnica pode ser de simples aplicação para uma determinada enzima mas não para outras. Apesar disto, muitas ARS foram purificadas até a homogeneidade e algumas puderam ser cristalizadas. Entre estas podemos citar: metionil-tRNA sintetase de E.coli (Zelwer e colaboradores, 1976); tirosil-tRNA sintetase de B.stearothermophilus (Irwin e colaboradores, 1976); aspartil-tRNA sintetase de levedura (Dietrich e colaboradores, 1980).

Características moleculares das ARS

Quanto ao número de cadeias componentes das sintetases e o tipo de estrutura destas cadeias, observa-se uma grande diversidade, dependendo da fonte usada na obtenção da enzima e do tipo de enzima considerado. Os principais tipos de estrutura encontrados nas sintetases são: monômeros de tamanho variável com estrutura α ; dímeros de subunidades idênticas α_2 ; tetrameros com subunidades diferentes tipo $\alpha_2\beta_2$ e

tetrameros com subunidades idênticas α_4 (Söll e Schimmel, 1974).

Esta grande variação estrutural das subunidades re flete as grandes diferenças encontradas em relação aos pesos moleculares. A maior parte das ARS cujas estruturas foram de terminadas pertence a procariotos, principalmente E.coli. En tre as sintetases de E.coli encontramos desde monômeros tipo α , com P.M.59.000, como a glutamyl-tRNA sintetase (Willick e Kay, 1976) até tetrâmeros de estrutura $\alpha_2\beta_2$, com P.M.227.000, como a glicil-tRNA sintetase (Ostrem e Berg, 1974).

As vezes aparecem estudos estruturais discrepantes para uma mesma enzima, de uma mesma fonte. Assim, para a tirosil-tRNA sintetase de levedura, Bhanot e colaboradores (1974) obtêm um dímero α_2 com P.M.80.000; e Faulhammer e Cramer (1977), um tetrâmero α_4 com P.M.116.000.

Entre as ARS que apresentam homogeneidade estrutural podemos citar a seril-tRNA sintetase, que independentemente da fonte de obtenção apresenta sempre a estrutura α_2 e os P.M. são próximos. A enzima de levedura tem P.M. 120.000 (Heider e colaboradores, 1971); a de fígado de galinha, P.M. 120.000 (Lemur e colaboradores, 1972); e a de sementes Lupinus luteus, P.M.110.000 (Jakubowski e Pawelkiewicz, 1975).

Quanto a estrutura primária, composição e sequência de aminoácidos das ARS, os dados disponíveis são bastante con trovertidos. Até o momento, apenas uma sintetase foi completamente sequenciada, a triptofanil-tRNA sintetase, de B. stearothermophilus (Winter e Hartley, 1977), enquanto outras sintetases sō o foram parcialmente (Koch e colaboradores, 1974).

A determinação dos resíduos de aminoácidos essen-

ciais para a atividade catalítica das sintetases tem sido estudada por modificações químicas da molécula da enzima.

A clivagem proteolítica das ARS parece ser o principal fator responsável pelo aparecimento de múltiplas formas de enzima em procariotos. Kern e colaboradores (1975) trabalhando com a valil-tRNA sintetase de levedura, isolaram duas formas enzimáticas de P.M. diferentes. A enzima de menor P.M. apresentava menor atividade específica na reação de aminoacilação. O uso de inibidores de proteólise durante a purificação diminuiu sensivelmente o aparecimento da enzima de menor atividade específica, sendo este um forte indício de proteólise de enzima nativa.

A modificação química das ARS por bloqueio de grupos SH é um dos aspectos mais extensivamente estudados devido ao fato de que todas as sintetases são sensíveis a estes reagentes. A alteração de grupos SH destas enzimas geralmente causa inativação das mesmas, às vezes diferentemente, dependendo da sintetase. Assim, a triptofanil-tRNA sintetase de E.coli, que é um dímero α_2 , possui um total de quatro grupos SH por subunidade, porém apenas um deles reage rapidamente com DTNB causando inativação da enzima (Kuehl e colaboradores, 1976). Por outro lado, a triptofanil-tRNA sintetase humana, que é um dímero α_2 , com P.M. maior que a enzima de E.coli, possui seis grupos SH por subunidade e quatro deles reagem rapidamente com DTNB levando a enzima à inativação (Lipscomb e colaboradores, 1976). Tanto enzima de E.coli como a enzima humana são protegidas da inativação pela adição dos seus substratos ou por reagentes protetores de grupos SH,

como o DTT. A proteção da enzima por seus substratos é um forte indício de que os grupos SH, em questão, fazem parte do sítio ativo.

Pouco se sabe a respeito de outros resíduos de aminoácidos envolvidos nas reações catalisadas pelas sintetases. Porém, a necessidade de um pH ótimo entre 7,0 e 9,0 para a reação de aminoacilação tem chamado a atenção quanto a uma possível participação dos resíduos de histidina, que nesta faixa de pH estão desprotonados. Favorova e colaboradores (1978) verificaram que a modificação causada por dietil pirocarbonato em 3 dos 22 resíduos de histidina presentes na molécula de triptofanil-tRNA sintetase de pâncreas bovino, provocam completa inativação da enzima. Na presença dos substratos ou de hidroxilamina a enzima é protegida da inativação.

Características cinéticas das ARS

Estudos de interação de ARS com seus substratos e dados cinéticos utilizando-se tanto a reação de intercâmbio ATP-PPi quanto a reação de aminoacilação de tRNA são importantes para o entendimento das especificidades dos substratos e do mecanismo de reação.

Mecanismos de reação

Conforme descrito anteriormente, a reação de formação de aminoacil-tRNA pode ocorrer em uma única etapa (Reação 1), ou em duas, produzindo o complexo intermediário aminoacil-adenilato (Reação 2) e posterior transferência do aminoácido deste complexo para o tRNA (Reação 3).

Entre estes dois possíveis mecanismos, a reação de aminoacilação em duas etapas é a mais aceita; Midelfort e colaboradores (1975); Kim e colaboradores (1977); Fasiolo e Fersht (1978) apresentam várias evidências que apoiam este mecanismo. O principal argumento em favor deste mecanismo é que entre as 20 sintetases existentes, 17 catalisam a reação de intercâmbio ATP-PPi (Reação 2), na ausência de tRNA, formando o complexo intermediário aminoacil-adenilato. Este mecanismo, entre tanto, não pode ser generalizado devido a existência de 3 sin tetases, arginil-, glutamil- e glutaminil - tRNA sintatases, que necessitam da presença de seus tRNAs respectivos para catalisar a reação de intercâmbio, sem formação de complexo intermediário. Recentemente, Kern e Lapointe (1980) e Kern e co laboradores (1980) observaram que as reações de aminoacilação catalisadas, respectivamente, pela glutamil- e glutaminil-tRNA sintetases de E.coli, em meio ácido, ocorrem em duas etapas. Godeau (1980) observou que a arginil-tRNA sintetase de B. stearothermophilus catalisa a reação de aminoacilação em duas etapas e que o tRNA funciona como um ativador. Apesar destas evidências cinéticas que apoiam a reação em 2 etapas para aque las 3 enzimas, o não isolamento do complexo aminoacil-adenilato é o ponto de apoio para alguns autores defenderem o mecanismo de reação em uma única etapa (Pastuszyn e Loftfield, 1972; Lovgren e colaboradores, 1975).

Quando ocorre formação intermediária do complexo aminoacil-adenilato (Reação 2) o mecanismo de reação pode ser de dois tipos: a) ao acaso, onde tanto do ATP quanto o amino-

ácido podem ser o primeiro substrato a se ligar à enzima para a catálise (Santi e colaboradores, 1971; Midelfort e colaboradores, 1975); b) sequencial, onde existe uma ordem de entrada do substrato, isto é, o aminoácido pode ser o primeiro substrato a se ligar a ARS (Myers e colaboradores, 1971), ou o ATP o primeiro substrato (Allende e colaboradores, 1970; Lin e colaboradores, 1975).

Para as reações de formação de aminoacil-tRNA, que ocorrem em uma única etapa (Reação 1), o mecanismo é do tipo concomitante, onde os três substratos participam simultaneamente da reação (Loftfield, 1972).

Especificidade pelos substratos

Os três substratos das ARS são bem distintos entre si, ou seja, uma macromolécula, o tRNA; um composto rico em energia, o ATP; e uma molécula pequena, o aminoácido.

O tRNA, sem dúvida, é o mais estudado, permitindo facilmente interações do tipo ácidonucleico-proteína com as ARS. Ao contrario das ARS, os tRNAs são bem conhecidos quanto às estruturas primária, secundária e terciária. Atualmente, cerca de 80 diferentes tRNAs, obtidos de diversas fontes, possuem suas sequências de nucleotídeos determinadas (Rich e Rajbhandary, 1976). Entre as moléculas de tRNA bem conhecidas, o tRNA específico para fenilalanina, obtido de levedura, é usado como modelo molecular por ser o primeiro tRNA cuja estrutura terciária foi detalhadamente estabelecida (Rich, 1974). Estudos comparativos entre estas moléculas mostram grandes similaridades tanto na estrutura primária, composta de regiões com bases fixas e variáveis, quanto nas

estruturas secundária e terciária, que parecem ser comuns a todos os tRNAs (Kim, 1978). Este fato e a alta especificidade das sintetases em relação ao reconhecimento destas moléculas tem sido amplamente investigados visando determinar que região da molécula do tRNA é utilizada pela enzima como sítio de reconhecimento (Schimmel, 1979).

Os estudos, até agora mencionados, sobre o problema do reconhecimento abordam a aminoacilação correta do tRNA, porém, a ocorrência de aminoacilação errada pode ser observada "in vitro". Ebel e colaboradores (1973) demonstraram que dois tipos de tRNAs de levedura, específicos para alanina e fenilalanina, são aminoacilados pela valil-tRNA sintetase de *E.coli* ou de levedura. Em ambos os casos, a formação do par aminoacil-tRNA inespecífico difere da formação do par específico pelos valores de K_M e de velocidade máxima. Nas reações inespecíficas, as K_M s são 100 vezes maiores e a velocidade máxima cerca de 1000 vezes menor, em comparação com as reações específicas.

A especificidade enzimática em relação aos nucleosídeos trifosfatos existentes é quase absoluta para o ATP. As regiões da molécula de ATP responsáveis por tal especificidade tem sido investigada através do uso de análogos do ATP nas reações catalisadas pelas sintetases. Freist e Cramer (1980) estudaram o comportamento cinético de algumas sintetases de levedura, nas reações de intercâmbio ATP-PPi e de aminoacilação, em presença de diferentes análogos do ATP, contendo modificações na ribose ou na adenina. Entre as enzimas testadas, com exceção da arginil-tRNA sintetase, nenhuma catalisa

a reação de aminoacilação com análogos contendo modificações na ribose, porém, na reação de intercâmbio ATP-PPi, estes análogos funcionam como substratos. Por outro lado, os análogos com base modificada, as vezes atuam como inibidores da reação de aminoacilação, mas como substratos para a reação de intercâmbio ATP-PPi. Estes resultados deixam claro que há uma maior especificidade enzimática para a reação de aminoacilação, e a região da molécula responsável por tal especificidade varia conforme a sintetase.

As sintetases são altamente específicas em relação aos aminoácidos naturais de forma L-. Os D-isômeros não são substratos efetivos, com exceção da D-tirosina que é ativada pela tirosil-tRNA sintetase de E.coli, com eficiência um pouco menor que a L-tirosina (Santi e Peña, 1973). O uso de análogos de aminoácidos tem possibilitado determinar que regiões da molécula estão envolvidas no reconhecimento pelas sintetases. Mudanças no radical do aminoácido podem causar total rejeição da enzima pelo análogo (Lepore e colaboradores, 1975). A integridade do grupo amino parece ser fundamental para a atividade catalítica das sintetases visto que os análogos contendo grupo amino modificado não atuam como substratos (Kovaleva e colaboradores, 1977). Quanto ao grupo carboxila, as sintetases apresentam uma tolerância pois diferentes análogos funcionam como inibidores competitivos, excluindo a possibilidade de ligação do aminoácido à enzima através da carboxila (Lepore e colaboradores, 1975; Nevinskii e colaboradores, 1975).

Nas reações de catálise, as ARS necessitam também

de um cátion bivalente, geralmente Mg^{2+} . Entre as funções deste íon metálico, a formação de complexo com o ATP parece ser indiscutível, pois na ausência de Mg^{2+} , o ATP não atua como substrato, pelo menos na reação de intercâmbio. Na reação de aminoacilação, torna-se mais difícil o estabelecimento de sua função, pois além de formar complexo com o ATP, este cátion é requerido na manutenção da estrutura do tRNA (Midel fort e colaboradores, 1975).

O Mg^{2+} tem influência em vários aspectos das ARS. Na purificação por cromatografia de afinidade em Sepharose, a triptofanil-tRNA sintetase de E.coli é eluída por ATP ou tRNA específico na ausência de Mg^{2+} , enquanto na presença de Mg^{2+} a enzima só é eluída por seu respectivo tRNA (Drocourt e colaboradores, 1979). Com relação ao mecanismo, Mèrault e colaboradores (1978) observaram para a triptofanil-tRNA sintetase de pâncreas bovino, que para concentração ótima de Mg^{2+} , a entrada de ATP e triptofano é ao acaso, e quando este íon é adicionado em excesso, ATP é o primeiro substrato, em uma sequência ordenada.

A utilização de outros cátions bivalentes, em substituição ao Mg^{2+} , tem mostrado diferentes efeitos conforme a enzima e a etapa da reação considerada (Hyafil e Blanquet, 1977).

A substituição do Mg^{2+} por poliaminas apenas na reação de aminoacilação é outro ponto bastante discutido. É baseado neste aspecto que alguns autores (Pastuszyn e Loftfield, 1972; Takeda e Ohnishi, 1975) sugerem o mecanismo concomitante para a reação de formação de aminoacil-tRNA.

Treonil-tRNA sintetase

A treonil-tRNA sintetase [E.C.6.1.1.3], enzima a que se refere a presente tese, tem sido estudada de vários organismos.

Allende e colaboradores (1966;1970) estudaram propriedades de complexos formados entre a treonil-tRNA sintetase de fígado de rato e treonil-AMP; ATP e treonil-AMP-tRNA.

Hirsh (1968) observou em E.coli que o complexo enzima-treonil-adenilato não reagia com hidroxilamina para formar treonil-hidroxamato (um dos métodos de determinação da atividade das ARS), a menos que tRNA ou p-cloromercuribenzoato estivessem presentes na reação.

Aoyama (1974) e Taga (1974) estudaram também esta enzima de fígado de rato e de boi, respectivamente, do ponto de vista de purificação e propriedades cinéticas.

Hennecke e colaboradores (1977) purificaram a treonil-tRNA sintetase de E.coli e determinaram o P.M. e a composição de subunidades da enzima nativa. A posição dos genes responsáveis pela síntese desta sintetase foi determinada através de estudos com mutantes por estes autores.

Freist e colaboradores (1978) testaram vários análogos de ATP, com modificações na base e no açúcar, na reação de formação de treonil-tRNA, utilizando enzima de levedura de padeiro. Yamada (1978) realizou uma rápida purificação de treonil-tRNA sintetase de levedura de cervejeiro por cromatografia de afinidade em fosfocelulose.

Esta tese tem por objetivo dar uma continuidade aos trabalhos realizados por Taga (1974) que purificou a treonil-tRNA sintetase de E.coli.

nil-tRNA sintetase de fígado bovino e caracterizou a enzima determinando seu ponto isoelétrico, peso molecular e parâmetros cinéticos na reação de intercâmbio ATP-PPi. Neste sentido nos propomos purificar a mesma enzima, utilizando centrifugações diferenciais, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-celulose, hidroxapatita e fosfocelulose. Com a enzima purificada estudamos as condições ótimas de ensaio; especificidade enzimática; substituição de Mg^{2+} por outros cátions bivalentes e aminas, e o efeito de reagentes sulfidrílicos, tanto na reação de intercâmbio ATP-PPi quanto de aminoacilação de tRNA.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

ATP, GTP, CTP, UTP, AMP, L-aminoácidos, BSA, DTT, GSH, β -mercaptoetanol, DTNB, aminas, poliaminas, tRNA de E.coli, DEAE-celulose (0,92 mEq/g), fosfocelulose (9,0 mEq/g), Coomassie Brilliant Blue, acrilamida, NN'-metilenebisacrilamida, TEMED, persulfato de amônio e glicerol, foram obtidos da "Sigma Chemical Company" (U.S.A.).

PCMB e NEM, foram adquiridos da "Mann Research Laboratories Inc." (U.S.A.).

Carvão ativo, foi obtido da "Merck" (Germany).

Dowex 1-ag 1x8, Cl^- (200 a 400 mesh), foi adquirida da "J. T. Baker Chemical Co." (U.S.A.).

Papel de filtro (3 MM), foi obtido da "Whatman Biochemicals Ltd." (England).

Filtros de nitrocelulose (H A W P, porosidade 0,45 μ) e membranas Pellicon (tipo PT), foram adquiridas da "Millipore Filter Corporation" (U.S.A.).

POPOP e PPO, foram obtidos da "Beckman Instruments Inc." (U.S.A.).

L-aminoácidos (^{14}C) e (^3H), foram adquiridos da "Schwarz/Mann" (U.S.A.).

Fosfato de Sódio (^{32}P), foi obtido no "Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares" (São Paulo).

Treonil-tRNA sintetase de fígado bovino foi purificada em nosso laboratório.

Fígado bovino foi cedido pelo Frigorífico Macuco

(Valinhos - São Paulo).

2. Métodos

2.1. Purificação de TRS de fígado de boi.

O método que utilizamos para purificação de TRS, baseia-se no trabalho de Allende e colaboradores (1966), fazendo-se algumas modificações. Coloca-se uma porção de fígado, logo após o sacrifício do animal, em um recipiente imerso em gelo moído. As operações subsequentes são realizadas entre 0°C e 5°C.

Homogeneização do tecido

Adiciona-se 200 g de fígado (picado com tesoura) a 600 ml de tampão fosfato de potássio 0,08 M pH 6,8 contendo KCl 0,1 M e homogeneiza-se (Omni-Mixer-Sorvall) durante 2 minutos, a velocidade máxima. Filtra-se em gaze e o filtrado obtido constitui o extrato bruto.

Eliminação de Mitochondria

Centrifuga-se o extrato bruto a 15.000 x g durante 15 minutos (Centrifuga Sorvall). Coleta-se o sobrenadante pós-mitochondrial.

Eliminação de microssomo

Mantendo-se em constante agitação a fração pós-mitochondrial, adiciona-se lentamente solução de BaCl_2 até concentração final de 0,02 M. Logo após a adição do BaCl_2 , centrifuga-se a 15.000 x g por 15 minutos. Coleta-se o sobrenadante pós-microsomal.

Saturação com sulfato de amônio

À fração pós-microsomal, adiciona-se lentamente sob agitação constante, Sulfato de amônio sólido até 40% de saturação. Mantem-se o pH da mistura em torno de 6,8 pela adição de hidróxido de amônio 2 M. Deixa-se agitando por 1 hora, após completa adição do sal. Centrifuga-se a 15.000 x g durante 15 minutos. Ao sobrenadante obtido, adiciona-se Sulfato de amônio até 75% de saturação procedendo-se conforme descrito para saturação a 40%. Após adição do sal, deixa-se agitando por 2 horas. Centrifuga-se a 15.000 x g por 15 minutos, Despreza-se o sobrenadante e ressuspende-se o precipitado em tampão fosfato de potássio 0.005 M pH 6,8 contendo DTT 10^{-4} M. Dialisa-se a suspensão com o mesmo tampão até que todo sulfato de amônio tenha sido eliminado.

Cromatografia em DEAE-celulose

Aplica-se o material dialisado a uma coluna de DEAE celulose (2 x 20 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,005 M pH 6,8 contendo DTT 10^{-4} M. A seguir lava-se a resina com tampão de equilíbrio, até que a A_{280} do eluído seja inferior a 0,05. Elui-se a enzima aplicando-se um gradiente linear de sal, constituído de 250 ml do tampão de equilíbrio e 250 ml do mesmo tampão contendo KCl 0,5 M. Reunem-se as frações com atividade enzimática e satura-se com sulfato de amônio até 75%. Após adição do sal, deixa-se agitando por 2 horas. Centrifuga-se a 15.000 x g durante 15 minutos. Despreza-se o sobrenadante e suspende-se o precipitado em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8 contendo DTT 10^{-4} M.

Dialisa-se o material contra o mesmo tampão até completa remoção do sulfato de amônio.

Adsorção em Hidroxiapatita

Mantem-se uma suspensão de hidroxiapatita previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 6,8 contendo DTT 10^{-4} M sob agitação e lentamente adiciona-se a fração dialisada proveniente da etapa anterior. Deixa-se agitando por 30 minutos e centrifuga-se a 3000 x g durante 5 minutos. Despreza-se o sobrenadante sem nenhuma atividade enzimática e suspende-se o gel precipitado no tampão usado para equilíbrio. Deixa-se agitando durante 15 minutos e centrifuga-se a 3000 x g por 5 minutos. Despreza-se o sobrenadante e repete-se esta operação até que o sobrenadante apresente A_{280} menor que 0,20. Neste ponto, apenas substitui-se o tampão em questão, por tampão fosfato de potássio 0,10 M pH 6,8 contendo DTT 10^{-4} M e repete-se a operação até que o sobrenadante não contenha proteínas. Elui-se a enzima, ressuspendendo-se a hidroxiapatita com tampão fosfato de potássio 0,35 M pH 6,8 contendo DTT 10^{-4} M. Agita-se durante 15 minutos e centrifuga-se a 3000 x g por 5 minutos. Coleta-se o sobrenadante e repete-se este processo até que toda a enzima tenha sido extraída do gel. Reune-se as frações contendo atividade enzimática e concentra-se em um concentrador de proteínas (Amicon; membrana PT) Dialisa-se o material concentrado contra tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,5 contendo DTT 10^{-4} M.

Cromatografia em fosfocelulose

Aplica-se o material proveniente da etapa anterior,

em uma coluna de fosfocelulose (1 x 8 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,5 contendo DTT 10^{-4} M. Lava-se a resina com este tampão até que a A_{280} do eluído seja inferior a 0,02. Aplica-se um gradiente linear constituído de 100 ml do tampão acima e 100 ml do mesmo tampão contendo KCl 0,5 M. Reune-se as frações que apresentam atividade enzimática, concentra-se por filtração utilizando - se um concentrador de proteínas. Dialisa-se o material concentrado em tampão fosfato de potássio 0,01 M pH 7,5 contendo DTT 10^{-4} M. Adiciona-se glicerol até 50% ao material dialisado e armazena-se a -15°C .

2.2. Tratamento de carvão ativo

Usamos o método descrito por Kornberg e Stadman (1957), com modificações.

Adiciona-se HCl 6 N ao carvão na proporção de 10 ml/g de carvão. Agita-se a mistura com um bastão de vidro a cada 10 minutos durante 2 horas. Deixa-se o carvão sedimentar e despreza-se o sobrenadante ácido. Ressuspende-se o carvão em água destilada, agita-se a mistura e após sedimentação do carvão retira-se a água. Repete-se este procedimento até que todo ácido tenha sido removido. Adiciona-se água ao carvão de maneira que a mistura contenha 30 g/100 ml da suspensão.

2.3. Padronização do carvão tratado

Determinamos a capacidade de adsorção do carvão tratado através da quantidade necessária do mesmo para total adsorção de cerca de 3×10^{-3} M de ATP, por medida da A_{260} .

2.4. Preparação do Pirofosfato (^{32}PPI)

Empregamos o método descrito por Bergman (1962), com algumas variações.

Transfere-se 1 ml de fosfato de sódio dibásico (^{32}P) contendo de 1 a 5 mC para um cadinho de porcelana e adicionam-se 20 μmoles de fosfato de sódio dibásico. Deixa-se a mistura em estufa a 80°C , por 1 noite, para evaporação. Transfere-se o resíduo obtido para uma mufla, procedendo-se uma pirólise entre 450°C e 500°C , durante 1 hora e 15 minutos. Após resfriamento do material dissolve-se o resíduo com 15 ml de água destilada, adicionando-se 5 ml de cada vez. Aplica-se o material dissolvido em 1 coluna (1 x 4 cm) de Dowex-1 na forma de cloreto. Lava-se a coluna com 20 a 30 ml de água, cujo eluido não deve conter radioatividade. Elui-se os fosfatos e pirofosfatos aplicando-se uma mistura de HCl 0,01 M contendo LiCl 0,05 M. Coletam-se frações de 10 ml e retiram-se aliquotas de 0,01 ml de cada fração eluída para determinação da radioatividade em um cintilador Beckman (LS-100C). Observa-se a presença de 2 picos contendo radioatividade. O primeiro corresponde ao ^{32}P eluído a partir do tubo 1 ao tubo 5. O segundo pico é de ^{32}PPI cuja eluição inicia-se a partir do tubo 15 estendendo-se até o tubo 25. Reunem-se os tubos contendo ^{32}PPI e ajusta-se o pH entre 8 - 9 com NaOH 0,1 N. Guarda-se o material no congelador (-15°C).

2.5. Determinação da Atividade Enzimática

2.5.1. Método de Intercâmbio isotópico $\text{ATP-}^{32}\text{PPI}$

Acompanhamos a atividade enzimática pela reação de

intercâmbio isotópico ATP- 32 PPi conforme descrito por Papas e Mehler (1970) com algumas modificações.

A mistura de incubação contém:

100 mM de tampão tris-HCl pH 7,8; 1 mM de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 1 mM de ATP; 10 mM de MgCl_2 ; 5 mM de L-treonina e cerca de 10^5 CPM de 32 PPi. Incuba-se esta mistura por 2 minutos a 37°C e inicia-se a reação adicionando-se 0,1 ml de enzima, perfazendo-se um volume final de 1 ml. Após 10 minutos a 37°C , paralisa-se a reação pela adição de 0,5 ml de HClO_4 7%. Adicionam-se a seguir 0,5 ml de carvão ativo a 30% e 1 ml de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,1 M. Agita-se vigorosamente a mistura durante 20 segundos em um agitador (tipo Vortex), filtrando-se em seguida sobre discos de papel Whatmann 3 MM, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Lava-se o material retido no filtro com $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0,01 M pH 7,0 (aproximadamente 15 ml). Determina-se a radioatividade dos filtros em um cintilador Beckman.

Neste método a atividade enzimática é medida pela quantidade de μmoles de 32 PPi incorporada ao ATP nas condições de ensaio.

Atividade específica é definida como μmoles de 32 PPi incorporados por mg de proteínas.

2.5.2. Método de aminoacilação do tRNA

Conforme descrito por Allende e colaboradores (1970), determinamos a atividade enzimática pela formação de AA-tRNA, usando-se aminoácido radioativo.

A mistura de reação cujo volume final é 0,1 ml, contém:

60 mM de tris-HCl pH 8,0; 50 mM de KCl; 1 mM de GSH; 0,5 mM de ATP; 20 mM de $MgCl_2$; 0,012 mM de treonina (^{14}C), atividade específica 40 mC/mmol; 0,1 mg de BSA; 0,3 mg de tRNA de E.coli. Inicia-se a reação pela adição de 0,86 μg de enzima à mistura previamente equilibrada a 37°C. Após 15 minutos de incubação a 37°C, paraliza-se a reação pela adição de 3 ml de solução gelada de TCA 5% contendo treonina 1 mM. Filtra-se em membrana de nitrocelulose umedecida previamente em solução gelada de TCA 5% contendo treonina 1 mM e lava-se 3 vezes com 5 ml desta solução. Secam-se as membranas sob uma lâmpada, adicionam-se 5 ml de líquido de cintilação e determina-se a radioatividade em um cintilador Beckman.

A atividade enzimática é expressa em nmoles de treonina (^{14}C) incorporadas ao tRNA, nas condições de ensaio.

2.6. Determinação da concentração de proteínas

Utilizamos o método do Biureto, segundo Gornall e colaboradores (1949), para concentrações superiores a 10 mg/ml. Para concentrações inferiores a 10 mg/ml, utilizamos o método de Lowry modificado por Hartree (1972). Para acompanhar o eluído de colunas fizemos leitura direta da absorbância a 280 nm.

2.7. Preparação de líquido de cintilação

Preparamos o líquido de cintilação conforme descrito por Malt e Miller (1967).

2.8. Preparação de hidroxapatita

Preparamos o gel de fosfato de cálcio, conforme descrito por Levin (1962).

2.9. Ativação de DEAE-celulose

Ativamos a resina segundo o método descrito por Peterson e Sober (1962).

2.10. Ativação de fosfocelulose

Empregamos o método descrito por Peterson (1970).

2.11. Eletroforese em gel de Poliacrilamida

Utilizamos o método descrito por Ornstein (1964).

Para coloração e descoloração empregamos o método de Vesterbeq (1972).

RESULTADOS

Os trabalhos experimentais desenvolvidos para a treonil-tRNA sintetase forneceram resultados relativos aos seguintes aspectos: purificação; propriedades cinéticas nas reações de intercâmbio ATP-PPi e de aminoacilação. Tais resultados expressam a média de pelo menos três experimentos.

1. Purificação

A TRS de fígado de boi foi purificada cerca de 120 vezes com um rendimento de 7% por uma série de etapas como pode ser observado na TAB.I. Após a homogeneização do tecido (extrato) observa-se que nas 3 etapas subsequentes não há praticamente aumento de atividade específica, mas estas etapas são efetivas para redução de proteínas contaminantes. Comparando-se a quantidade de proteínas totais presentes no extrato com o teor proteico após saturação com sulfato de amônio a 75%, verifica-se que aproximadamente 80% das proteínas totais são eliminadas durante estas operações facilitando a etapa seguinte que é cromatografia do material em DEAE-celulose.

O perfil cromatográfico da TRS em DEAE-celulose pode ser observado na FIG.1. A enzima é fixada a esta resina, sendo eluída após aplicação de um gradiente linear de KCl que vai de 0 a 0,5 M. Em termos de proteínas (A_{280}), a figura mostra 3 picos. O primeiro pico é representado pelas proteínas

TABELA I

Purificação de TRS a partir de 200 g de fígado bovino pelo método (2.1). As principais etapas da purificação estão resumidas na tabela abaixo. A atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.1). Neste método unidade enzimática (U) é definida como μ moles de ^{32}PPi incorporados ao ATP nas condições de ensaio. A dosagem de proteínas foi feita pelo método (2.6).

Frações	Volume (ml)	Proteínas totais	Unidades totais	Ativ.esp. U/mg	Purificação
Extrato	600	32.940	2.100	0,06	1
Sobr. p ^{os} mitocondrial	500	17.900	1.700	0,10	1,5
Sobr. p ^{os} microssomal	450	12.915	1.395	0,11	1,7
75% sat. com sulf. am ^o nio (ap ^{os} diálise)	110	4.994	572	0,12	1,8
DEAE-celulose	18	571	112	0,20	3,1
Hidroxiapatita	10	91	64	0,70	11
Fosfocelulose (50% glicerol)	8	16	122	7,53	118

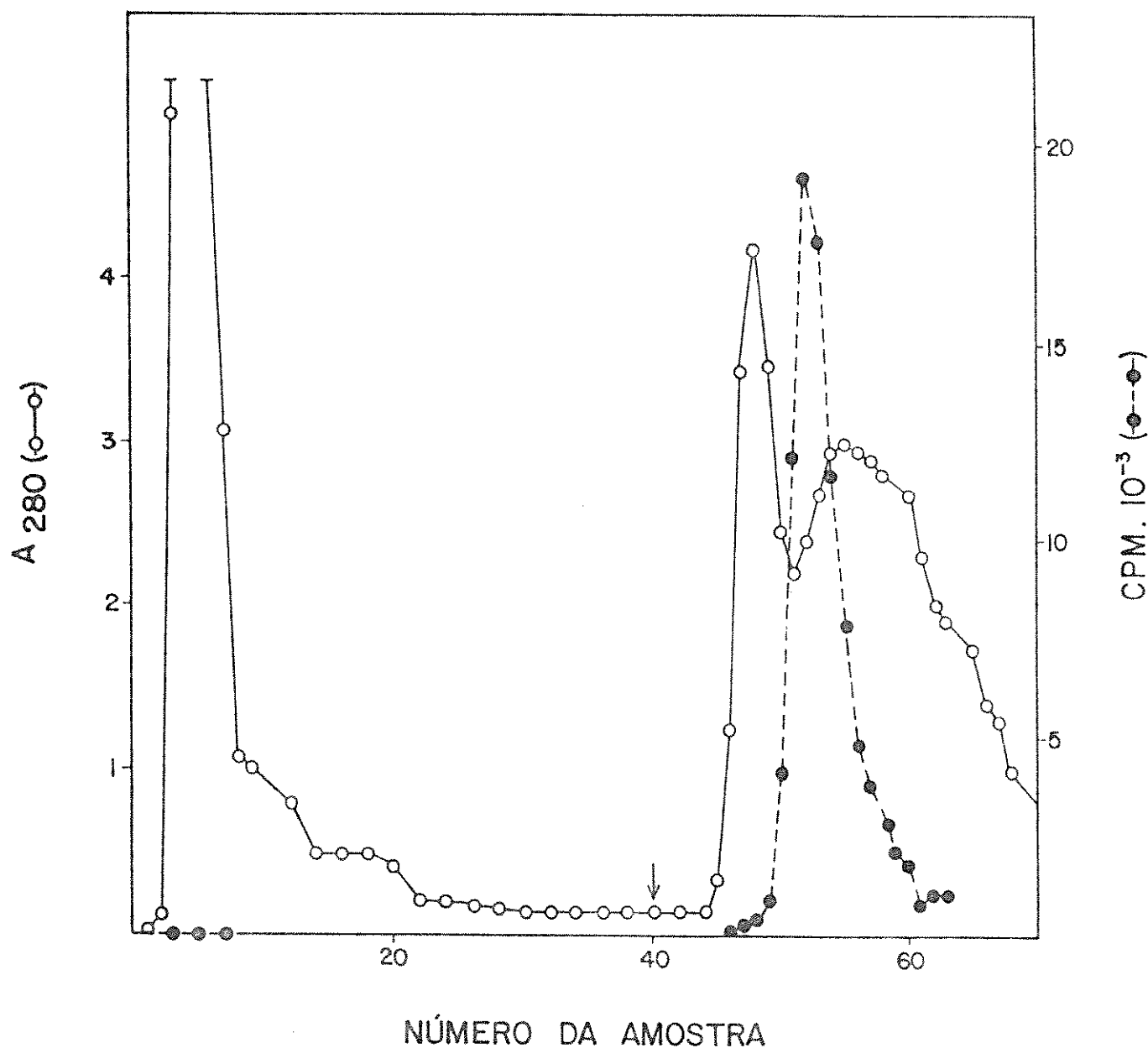


FIGURA 1 - Cromatografia em DEAE-Celulose

Conforme descrito em métodos (2.1.), o material dialisado contendo 1.560 mg de proteínas, foi aplicado em uma coluna de DEAE-cel. (2 x 20 cm). A enzima foi eluída com um gradiente linear de KCl a partir do ponto indicado na figura. Coletaram-se frações de 20 ml e determinou-se a concentração de proteínas por leitura da A_{280} (o—o) e a atividade enzimática (●---●) pelo método de intercâmbio isotópico (2.5.1).

que não se fixam à resina, entre estas proteínas a hemoglobina que é um dos principais contaminantes é quase toda eliminada. A ausência de atividade enzimática neste pico proteico, indica que toda a enzima permanece ligada a resina. Após a aplicação do gradiente de KCl dois picos proteicos são observados e entre eles situa-se o pico de atividade enzimática. Este perfil de eluição da TRS foi constante em todas as purificações efetuadas. Com relação a atividade específica esta etapa fornece um pequeno aumento conforme indica a TAB.I. A estabilidade da enzima após eluída é mantida por uma semana a 4°C.

Na etapa seguinte, cromatografia por adsorção em hidroxiapatita, obteve-se um razoável aumento na atividade específica como mostra a TAB.I. A quantidade de gel necessária para total adsorção da enzima, foi estabelecida através da dosagem da atividade enzimática no sobrenadante obtido após centrifugação do gel contendo enzima adsorvida. Mantendo-se a proporção de 20 g de hidroxiapatita para 1 g de proteína, conseguimos completa adsorção da enzima. A extração da enzima da hidroxiapatita foi feita com tampão fosfato 0,35 M. Nesta fase a TRS é muito instável devendo ser concentrada imediatamente após extração, dialisada e submetida a cromatografia em fosfocelulose que é a última etapa da purificação.

A FIG.2 mostra o perfil cromatográfico da TRS em fosfocelulose. Dois picos de proteínas são mostrados na figura. O primeiro pico eluído livremente não apresentou nenhuma atividade enzimática. No segundo pico proteico que é eluído pela aplicação de um gradiente linear de KCl de 0 a 0,5 M a TRS é eluída conforme mostra o pico de atividade enzimática.

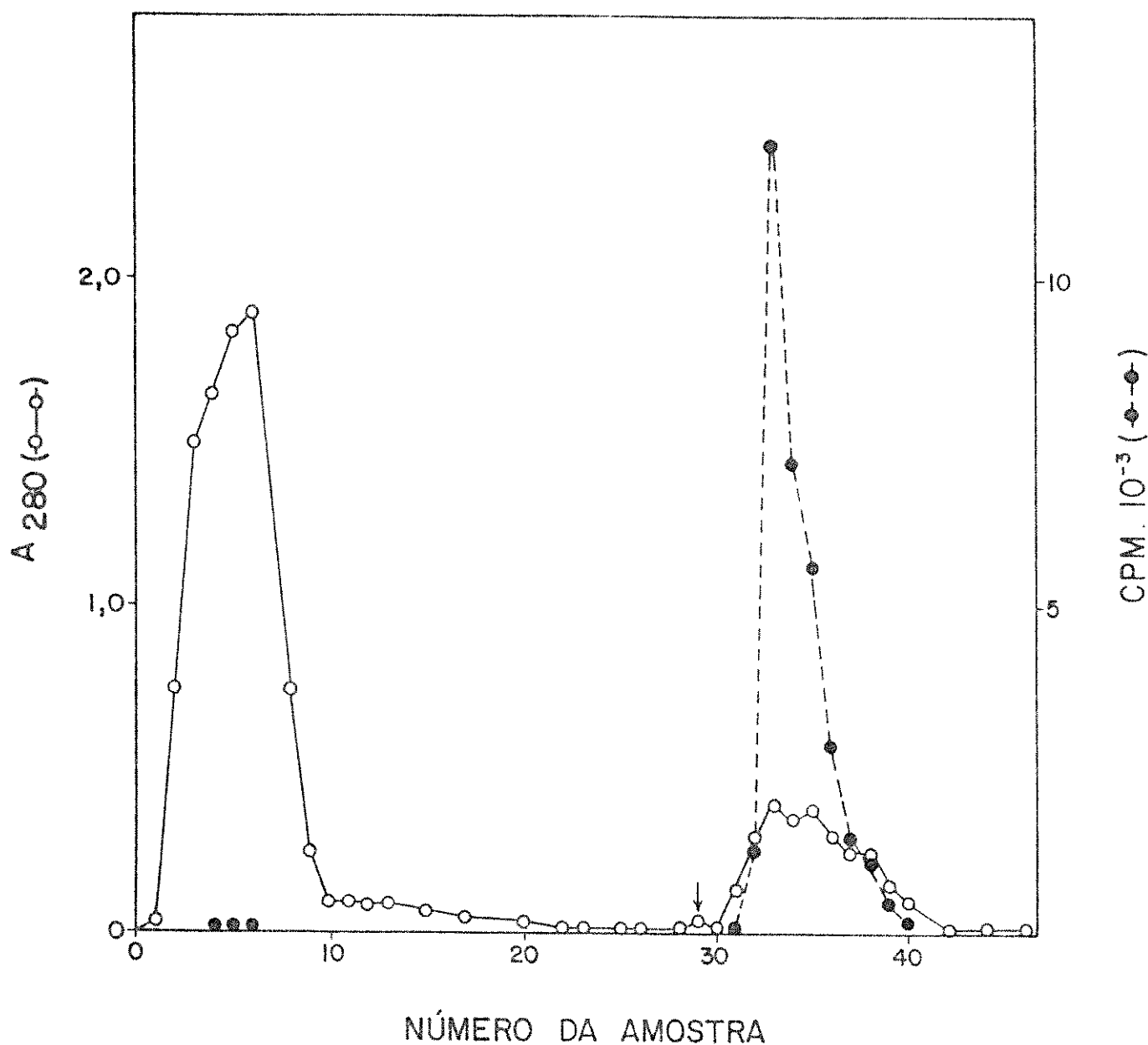


FIGURA 2 - Cromatografia em fosfocelulose

O material proveniente da extração em hidroxiapatita contendo 106 mg de proteínas foi aplicado a uma coluna de fosfocelulose (1 x 8 cm) conforme métodos (2.1). A partir do ponto indicado na figura, aplicou-se um gradiente linear de KCl para eluição da enzima. Foram coletadas frações de 10 ml. Proteínas (o—o) e atividade enzimática (●---●) foram determinadas de maneira idêntica ao descrito na figura 1.

Esta etapa foi a que forneceu maior purificação, cerca de 10 vezes em relação a etapa anterior, como indicado na TAB.I. A estabilidade da TRS nesta fase é crítica, mesmo após concentração da enzima. A adição de glicerol a 50% e o armazenamento a -20°C , permitiu manter a atividade enzimática por pelo menos 6 meses.

O grau de homogeneidade da TRS foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida. A FIG.3 mostra o perfil eletroforético obtido com a enzima eluída da coluna de fosfocelulose. A existência de mais de uma banda de proteína indica que as etapas empregadas na purificação de TRS não foram suficientes para a obtenção de uma enzima 100% homogênea.

2. Propriedades cinéticas da TRS na reação de intercâmbio ATP-PPi.

Nesta reação vários fatores podem limitar a velocidade máxima de catálise da TRS. Com o objetivo de determinar as condições ótimas de ensaio, inicialmente estudamos a influência do pH e da concentração de cada um dos componentes do meio de reação. Após o estabelecimento destas condições, fizemos alguns estudos adicionais procurando verificar a influência do tRNA na reação; a especificidade da enzima por seus substratos; a substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes e por poliaminas; e por último estudamos o efeito de reagentes SH na atividade enzimática.

2.1. Influência do pH.

A FIG.4 mostra que a velocidade da reação depende tanto do pH quanto a natureza do tampão utilizado. Com tampão



FIGURA 3 - Eletroforese analítica em gel de poliacrilamida.

50 μ g de enzima proveniente da última etapa de purificação, foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida conforme método (2.11).

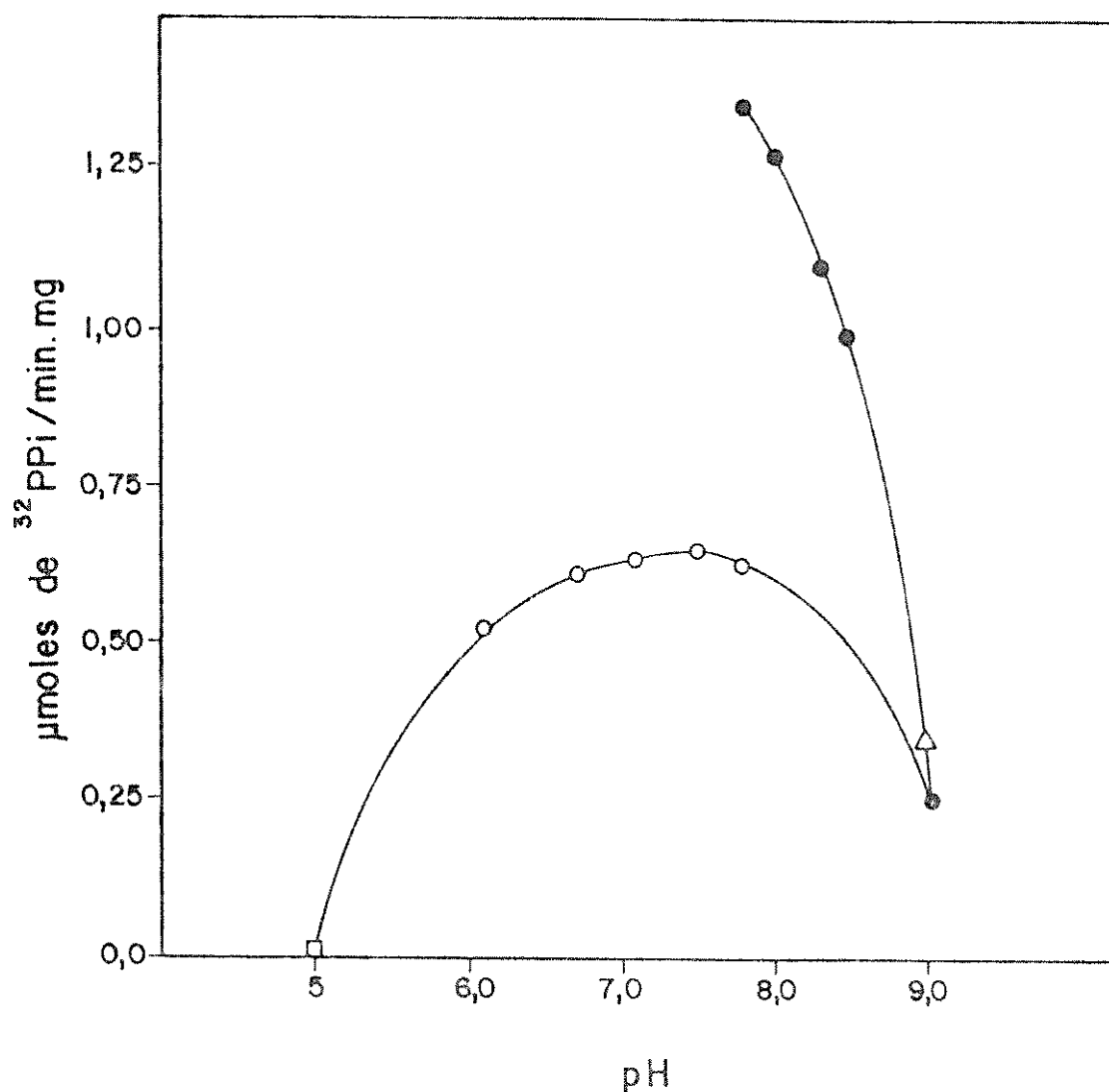


FIGURA 4 - Influência do pH na reação de intercâmbio ATP-PPi

O meio de reação foi preparado com diferentes tampões: acetato pH 5,0 ($\square$); fosfato pH 6,1; 6,7; 7,1; 7,5 e 7,8 ($\circ$); tris-HCl pH 7,8; 8,0; 8,3; 8,5 e 9,0 ($\bullet$) borato pH 9,0 (Δ). A determinação da atividade enzimática e o meio de reação estão descritos em métodos (2.5.1). A reação foi catalisada por 10 μg de enzima.

fosfato o pH ótimo é 7,5 e com tris-HCl é 7,8. Porém, a velocidade obtida com tris-HCl é aproximadamente o dobro da velocidade atingida com tampão fosfato. Por esta razão foram utilizados nos ensaios tris-HCl no seu pH ótimo.

2.2. Efeito da concentração da enzima.

Observa-se na FIG.5 que a atividade enzimática é proporcional a concentração de enzima pelo menos até 40 μ g. Esta relação linear existente entre concentração de enzima e velocidade da reação, permite a escolha de qualquer um dos pontos componentes desta reta para os ensaios. Porém por questões práticas adotamos a concentração de 10 μ g por ensaio em todas as experiências feitas.

2.3. Influência da concentração de Mg^{2+} .

A FIG.6 mostra que as concentrações de Mg^{2+} situadas entre 5 e 20 mM, permitem atingir a vel.max.da reação, enquanto as concentrações abaixo de 5 mM são limitantes da vel.max. Mantivemos nos ensaios a concentração de 10 mM por fornecer uma boa margem de segurança.

2.4. Influência da concentração do ATP e determinação da KM.

No gráfico superior a direita da FIG.7 pode se observar o efeito da concentração de ATP na velocidade da reação. A vel.max. da reação é atingida a partir da concentração 1 mM e se mantém constante até 2 mM. Nos ensaios foram mantidas a concentração 1 mM. A KM do ATP foi determinada nesta experiência através do gráfico inferior a esquerda e o valor obtido foi $1,1 \cdot 10^{-4}$ M.

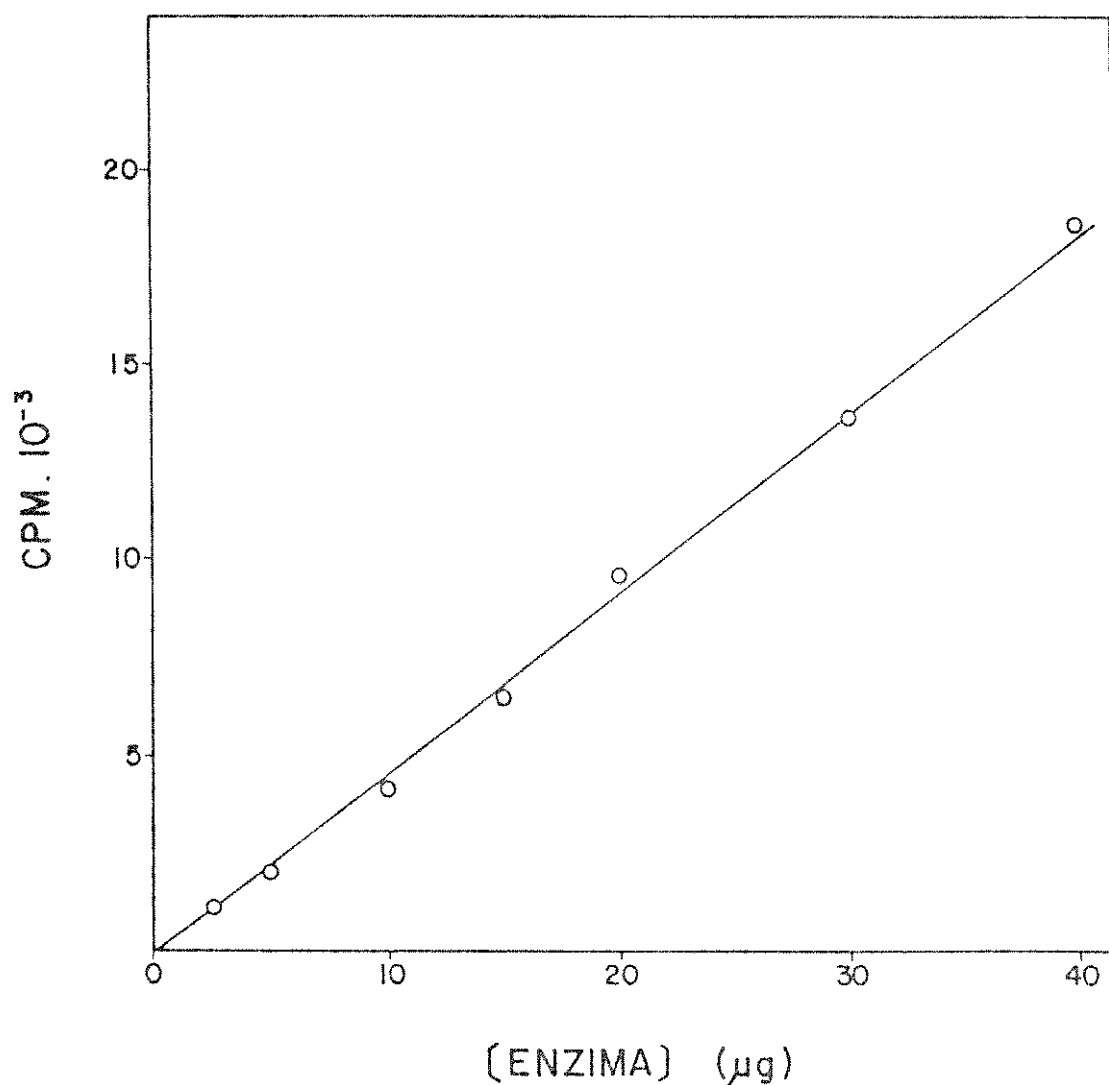


FIGURA 5 - Influência da concentração da enzima na reação de intercâmbio ATP-PPi.

O método utilizado na determinação da atividade enzimática e o meio de reação estão descritos em métodos (2.5.1). Exceto a concentração da enzima que variou conforme indicado na figura, os demais reagentes foram mantidos fixos. CPM representa a atividade enzimática nas condições de ensaio.

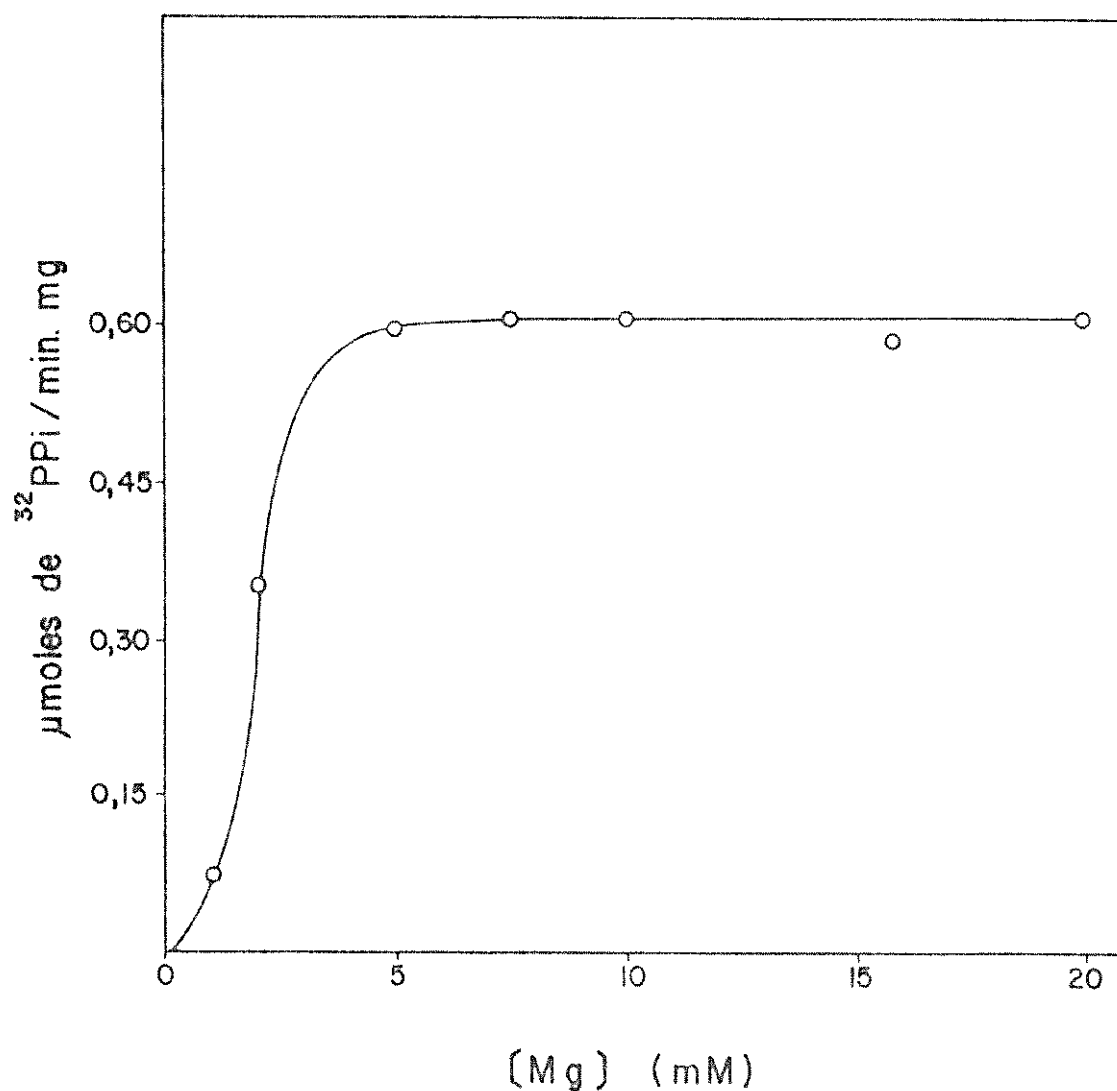


FIGURA 6 - Variação da concentração de magnésio na reação de intercâmbio ATP- P_i .

A atividade enzimática foi determinada em função das concentrações de Mg^{2+} indicadas na figura pelo método (2.5.1). O meio de reação descrito neste método só sofreu alteração em relação ao Mg^{2+} . A reação foi catalisada por 10 μg de enzima.

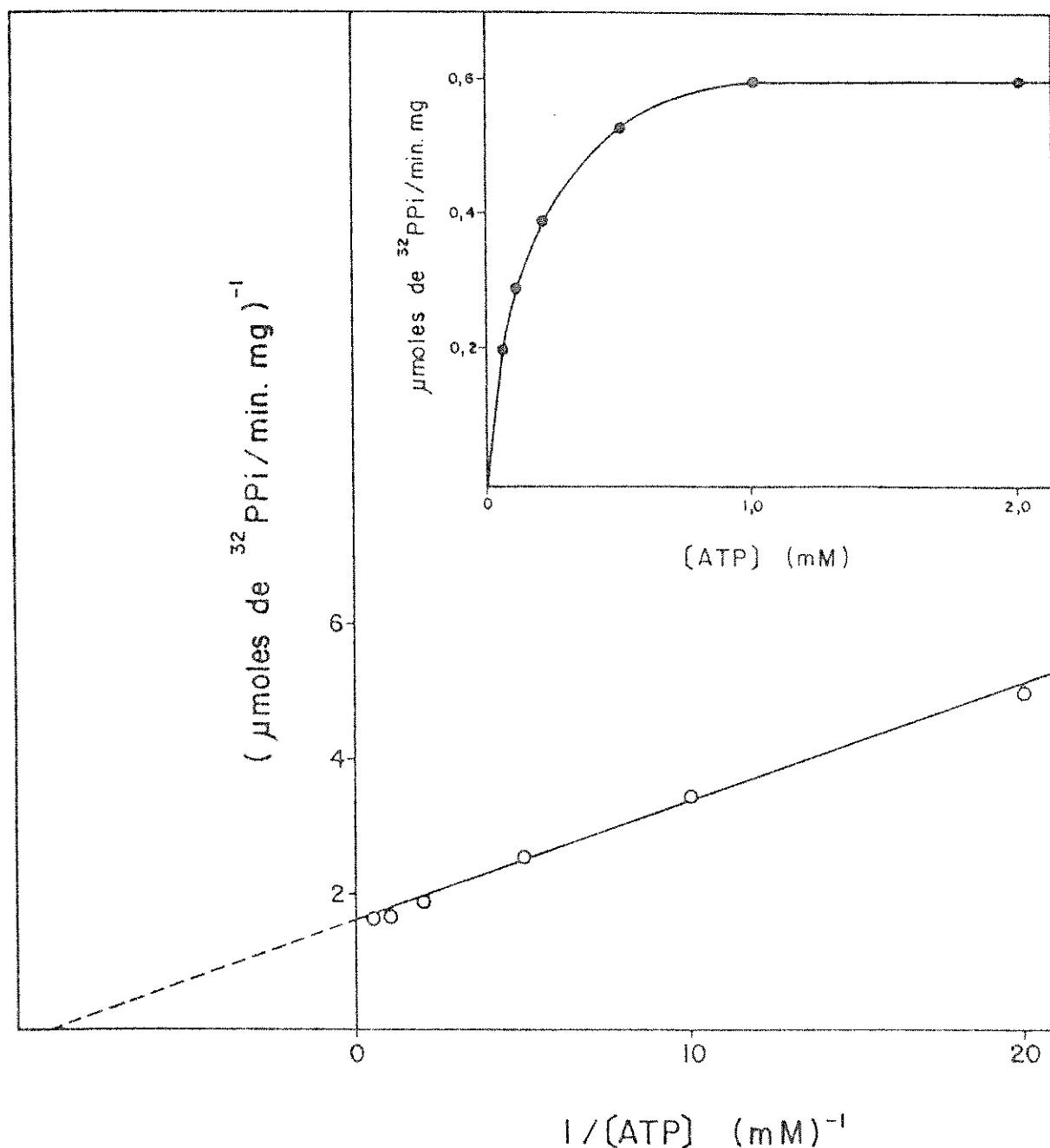


FIGURA 7 - Efeito da concentração de ATP na reação de intercâmbio ATP-PPi.

O gráfico superior a direita indica a atividade enzimática em função de diferentes concentrações de ATP. A determinação da atividade enzimática e o meio de reação contendo concentrações variáveis de ATP conforme a figura, estão descritos em métodos (2.5.1). A concentração de enzima em cada ensaio, foi 10 μg . O gráfico inferior a esquerda é de Lineweaver e Burk, através do qual determinou-se a K_M do ATP.

2.5. Influência da concentração de treonina e determinação da K_M .

O efeito da concentração de treonina na atividade enzimática está indicado no gráfico superior a direita da FIG.8. As concentrações abaixo de 1 mM limitam a velocidade da reação. A vel.max. da reação é atingida com concentrações de treonina situadas entre 5 mM e 10 mM. A concentração de 5 mM foi adotada nos ensaios. Pelo gráfico inferior a esquerda determinou-se a K_M para a treonina que foi $1,2 \cdot 10^{-4} M$.

2.6. Influência da concentração de PPi e determinação da K_M .

A FIG.9 mostra no gráfico superior a direita que concentrações de PPi acima de 1 mM causam inibição da atividade enzimática. A concentração de 1 mM foi mantida nos ensaios. Através do gráfico inferior a esquerda, obteve-se uma K_M para o PPi de $2,1 \cdot 10^{-4} M$.

2.7. Influência do tRNA.

A TAB.II mostra a atividade enzimática na presença e na ausência de tRNA. Praticamente nenhuma alteração é notada para as duas concentrações de tRNA utilizadas.

2.8. Especificidade enzimática em relação a outros L-aminoácidos.

A alta especificidade da TRS em relação a L-treonina é mostrada na TAB.III. Os demais L-aminoácidos testados não são ativados pela enzima com exceção da serina e histidina que são ativadas em 4% e 20% respectivamente, em comparação com a ativação da treonina considerada 100%.

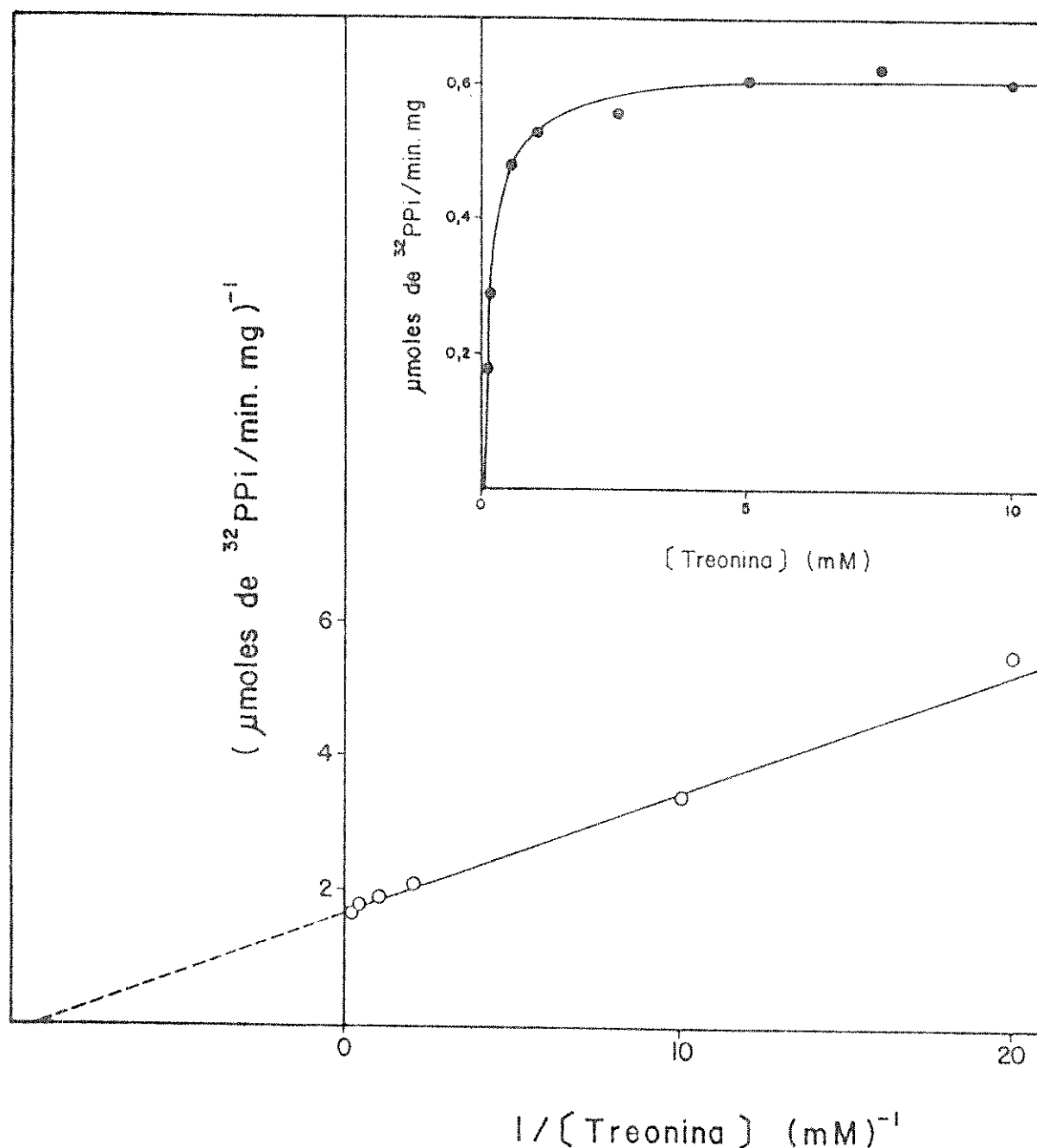


FIGURA 8 - Influência da concentração de treonina na reação de intercâmbio ATP-PPi

As concentrações de treonina indicadas no gráfico superior a direita, foram utilizadas no meio de reação e a atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.1). Exceto a concentração de treonina, o meio de reação descrito neste método, não foi alterado. A reação foi catalisada por 10 μg de enzima. A K_M da treonina foi determinada pelo gráfico inferior a esquerda, segundo Lineweaver e Burk.

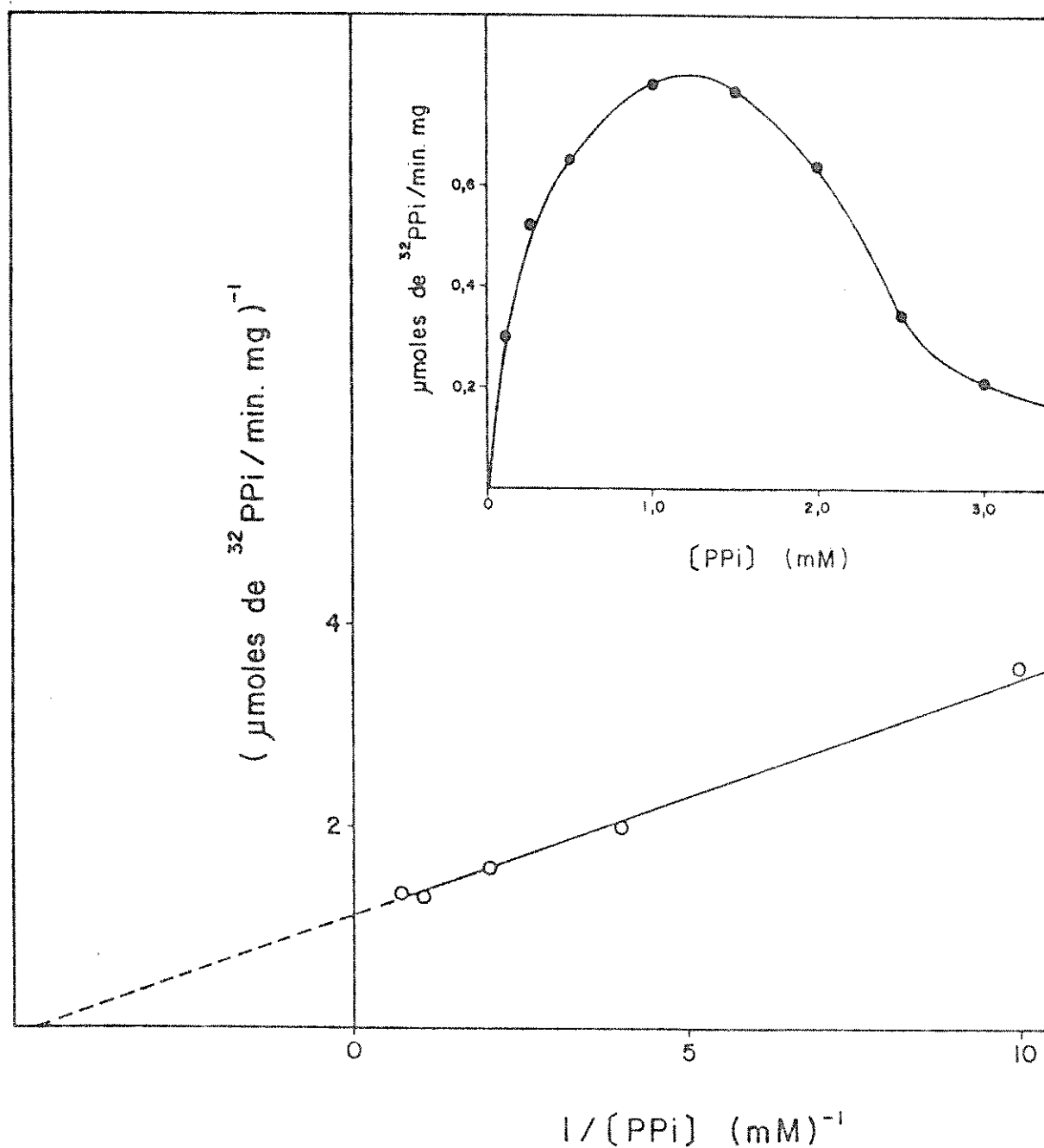


FIGURA 9 - Variação da concentração de PPI na reação de intercâmbio ATP-PPI

Utilizando-se, as concentrações de PPI indicadas no gráfico superior a direita, determinou-se a atividade enzimática pelo método (2.5.1). 10 μg de enzima foram utilizadas nos ensaios e no meio de reação, apenas, a concentração de PPI foi variável. O gráfico inferior a esquerda é a determinação da K_M do PPI, conforme Lineweaver e Burk.

TABELA II

Influência do tRNA na reação de intercâmbio ATP-PPi

O tRNA foi adicionado ao sistema completo conforme indicado na tabela. A dosagem da atividade enzimática e o sistema completo estão descritos em métodos (2.5.1). A reação foi catalisada por 10 μ g de enzima.

Adições ao sistema completo	μ moles de $^{32}\text{PPi}/\text{min.mg}$
nada	0,63
0,3 mg	0,63
0,6 mg	0,68

TABELA III

Especificidade enzimática em relação aos L-aminoácidos na reação de intercâmbio ATP-PPi.

A atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.1), variando-se o AA adicionado ao meio de reação conforme indicado na tabela. A quantidade de enzima por reação foi 10 µg.

L-aminoácidos	µmoles de $^{32}\text{PPi}/\text{min.mg}$
Treonina	0,56
Leucina	0,00
Isoleucina	0,00
Prolina	0,00
Fenilalanina	0,00
Triptofano	0,00
Serina	0,02
Glutamina	0,00
Valina	0,00
Histidina	0,11
Metionina	0,00
Glicina	0,00
Lisina	0,00
Cisteina	0,00
Ácido Glutâmico	0,00
Arginina	0,00
Tirosina	0,00
Alanina	0,00

2.9. Especificidade enzimática por outros nucleotídeos.

A TAB.IV indica que nenhum dos nucleotídeos testados funcionam com substratos em substituição ao ATP. A pequena atividade enzimática obtida com CTP e GTP não é significativa quando comparada com a atividade obtida com ATP.

2.10. Substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes.

Entre os cátions bivalentes testados, o Zn^{2+} e Mn^{2+} substituem parcialmente o Mg^{2+} , conforme indicado na TAB.V. A atividade enzimática em presença destes cátions é 5 vezes menor que a obtida no controle onde o Mg^{2+} foi mantido.

2.11. Substituição do Mg^{2+} por aminas.

A TAB.VI mostra que nenhuma das aminas utilizadas em substituição ao Mg^{2+} , foi capaz de causar qualquer efeito na atividade enzimática.

2.12. Efeito de reagentes SH.

Na TAB.VII estão indicados os diferentes efeitos dos reagentes bloqueadores de grupos SH. Com exceção do PCMB que reduz a atividade enzimática para 20%, o efeito do DTNB e NEM é praticamente nulo. A adição de DTT protege a enzima da inativação causada por PCMB.

3. Propriedades cinéticas da TRS na reação de aminoacilação do tRNA.

Considerando-se as devidas diferenças existentes entre este método de determinação da atividade enzimática e o método de intercâmbio ATP-PPi, nossos estudos cinéticos para reação de aminoacilação obedeceram a mesma sequência adotada

TABELA IV

Especificidade enzimática em relação a outros nucleotídeos na reação de intercâmbio ATP-PPi.

Os nucleotídeos indicados na tabela, foram adicionados ao meio de reação na concentração 1 mM. A atividade enzimática foi de terminada pelo método (2.5.1) e 10 µg de enzima foram utilizadas por ensaio

Nucleotídeos	µmoles de $^{32}\text{PPi}/\text{min.mg}$
-	0,00
ATP	0,63
UTP	0,00
GTP	0,02
CTP	0,01
AMP	0,00

TABELA V

Influência de Cations bivalentes na reação de intercâmbio ATP-PPi.

A atividade enzimática determinada pelo método (2.5.1), foi verificada na presença dos cations bivalentes indicados. A reação foi catalisada por 10 μ g de enzima e a concentração dos cations foi 5 mM.

Cations	μ moles de 32 PPi/min.mg
-	0,00
Mg ²⁺	0,55
Mn ²⁺	0,12
Zn ²⁺	0,12
Ca ²⁺	0,02
Ba ²⁺	0,00
Cu ²⁺	0,00

TABELA VI

Influência de aminas na reação de intercâmbio ATP-PPi

As aminas indicadas na tabela foram adicionadas ao meio de reação em substituição ao Mg^{2+} , exceto no controle onde o Mg^{2+} foi mantido na concentração 5 mM. A concentração final das aminas foi 5 mM e 10 μg de enzima foi usada por ensaio. A atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.1).

Aminas	$\mu moles$ de $^{32}PPi/min.mg$
-	0,00
controle (+ Mg^{2+})	0,55
diamino etano	0,00
1,2-diamino propano	0,00
1,5-diamino pentano	0,01
1,6-diamino hexano	0,00
espermidina	0,00
espermina	0,01

TABELA VII

Efeito de reagentes sulfidrílicos na reação de intercâmbio ATP-PPi.

10 µg de enzima previamente dialisada foi adicionada ao sistema completo contendo as adições discriminadas na tabela abaixo. O sistema completo e a determinação da atividade enzimática estão descritos em métodos (2.5.1).

Adições ao sistema completo	µmoles de $^{32}\text{PPi}/\text{min.mg}$
nenhuma	0,62
+ 1 mM de DTT	0,64
+ 0,1 mM PCMB	0,12
0,6 mM DTNB	0,54
+ 2,5 mM NEM	0,60
+(1mM DTT + 0,1mM PCMB)	0,60
+(1mM DTT + 0,6mM DTNB)	0,58
+(1mM DTT + 2,5mM NEM)	0,64

para a reação de intercâmbio ATP-PPi.

3.1. Influência do pH.

A variação da atividade enzimática em função do pH está indicada na FIG.10. A atividade enzimática máxima foi atingida com tampão tris-HCl pH 8,0, sendo este tampão e este pH adotados nas experiências subsequentes.

3.2. Efeito da concentração de enzima.

A FIG.11 mostra a variação da atividade enzimática em função da concentração de enzima. A reação é linear para concentrações abaixo de 2 μg , ocorrendo uma quebra da linearidade quando concentrações superiores a 2 μg foram utilizadas. Adotamos nos ensaios a concentração de 0,86 μg .

3.3. Influência da concentração de BSA.

A adição de diferentes concentrações de BSA nos ensaios provoca um aumento na atividade enzimática conforme indicado na FIG.12. Consideramos que a atividade enzimática na ausência de BSA é nula para melhor visualizar este efeito. A concentração de 100 μg de BSA foi mantida nos ensaios.

3.4. Influência da concentração de Mg^{2+} .

Na FIG.13 é mostrada a dependência da velocidade de reação da concentração de Mg^{2+} . A atividade enzimática máxima foi obtida com a concentração de 20 mM, a qual foi utilizada nos ensaios.

3.5. Influência da concentração de ATP e determinação da KM.

O gráfico superior a direita da FIG.14 indica que

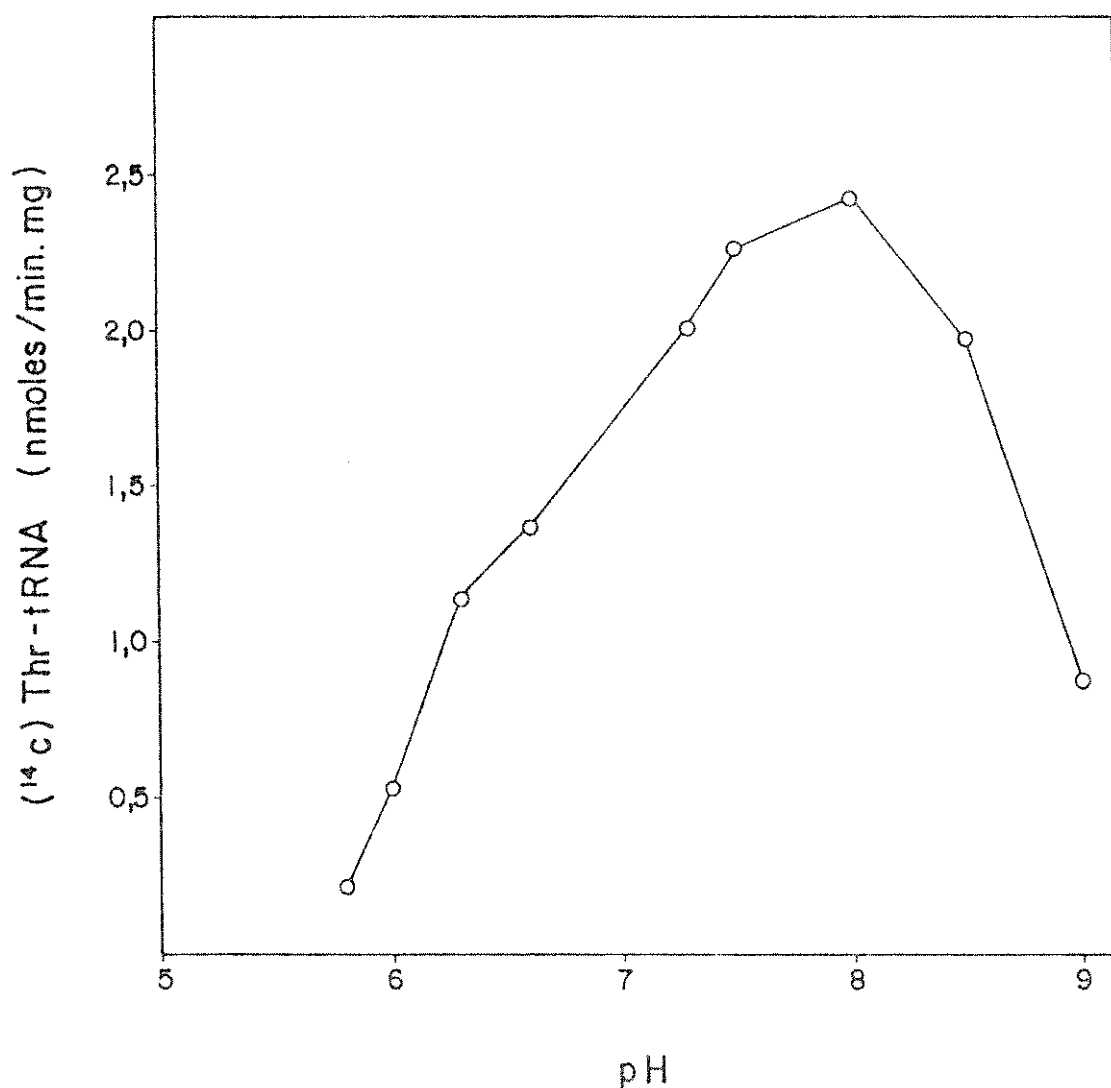


FIGURA 10 - Efeito do pH na reação de aminoacilação

Determinou-se a atividade enzimática, em diferentes pH, utilizando-se os seguintes tampões 60 mM: cacodilato pH 5,8; 6,0; 6,3 e 6,8, Tris-HCl pH 7,3; 7,5; 8,0 e 8,5, Borato pH 9,0. Os demais componentes do meio de reação não foram alterados. A atividade enzimática e a composição do meio de reação estão descritos em métodos (2.5.2).

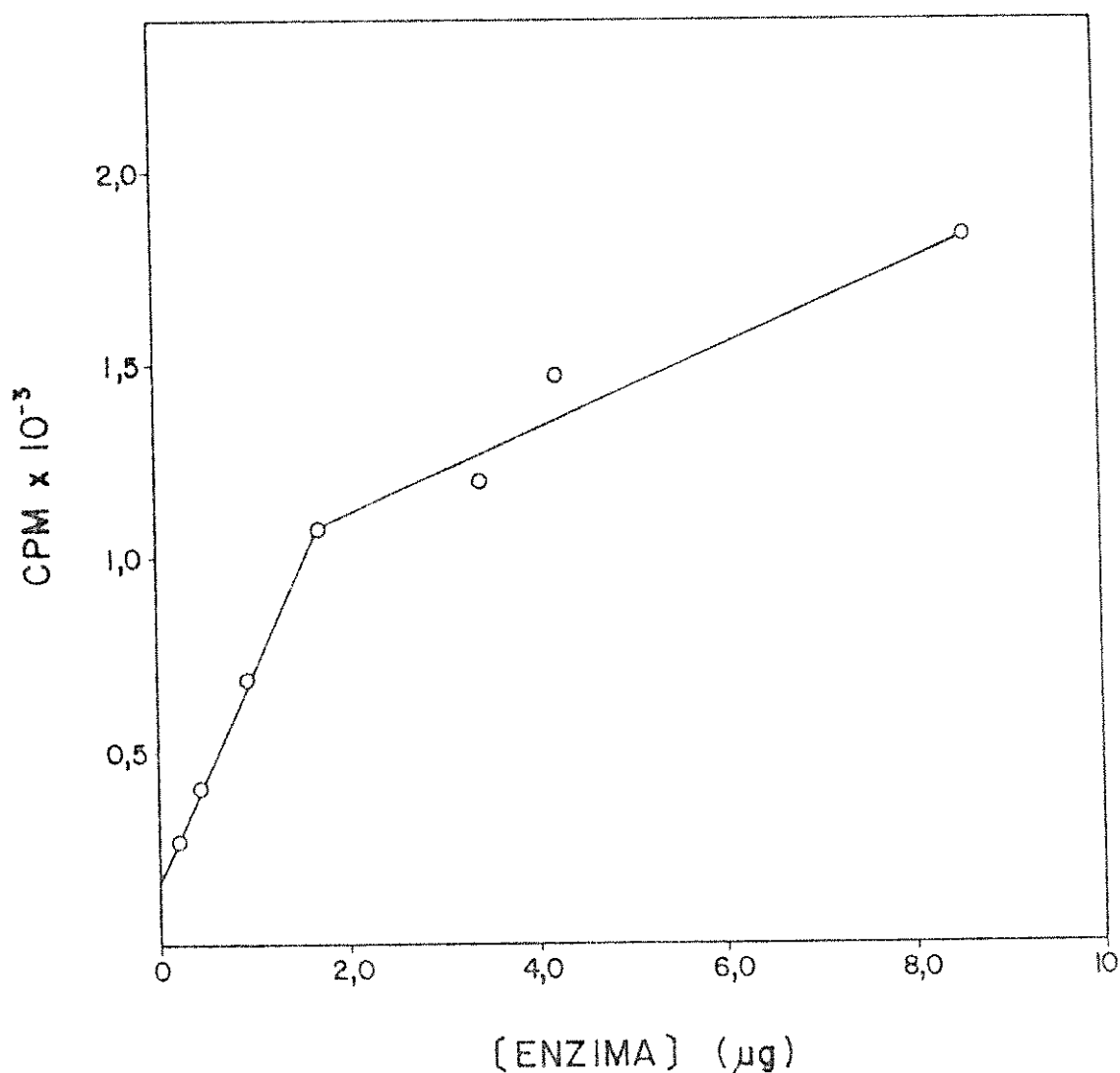


FIGURA 11 - Variação da concentração de enzima na reação de aminoacilação

A dosagem da atividade enzimática e o meio de reação estão descritos em métodos (2.5.2). Exceto a concentração de enzima que variou conforme indicado na figura, as demais condições foram mantidas. CPM representa a atividade enzimática nas condições de ensaio.

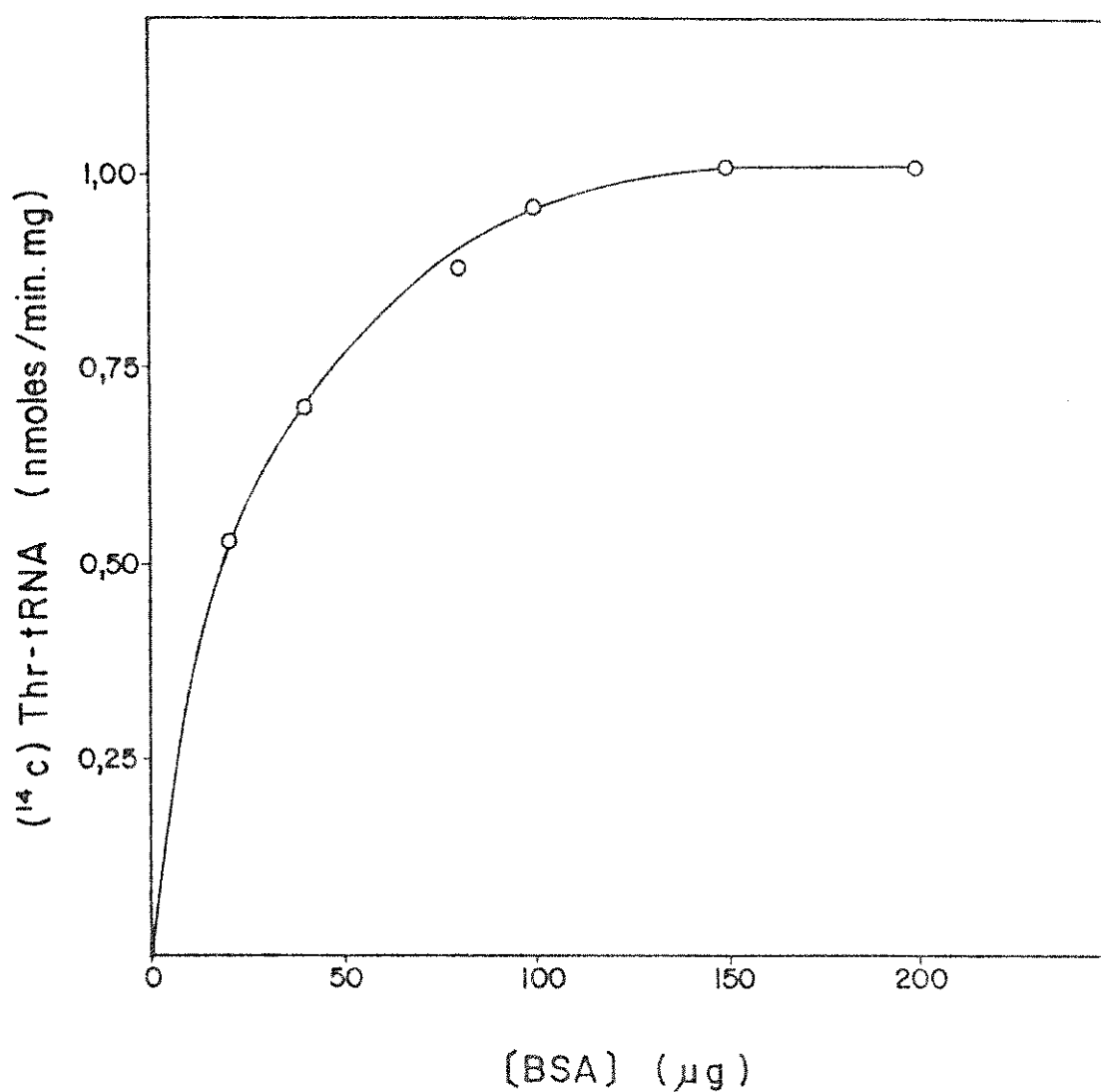


FIGURA 12 - Incremento da velocidade na reação de aminoacilação na presença de diferentes concentrações de BSA

Mantendo-se as condições conforme métodos (2.5.2) para determinação da atividade enzimática, variou-se apenas a concentração de BSA no meio de reação como indicado na figura.

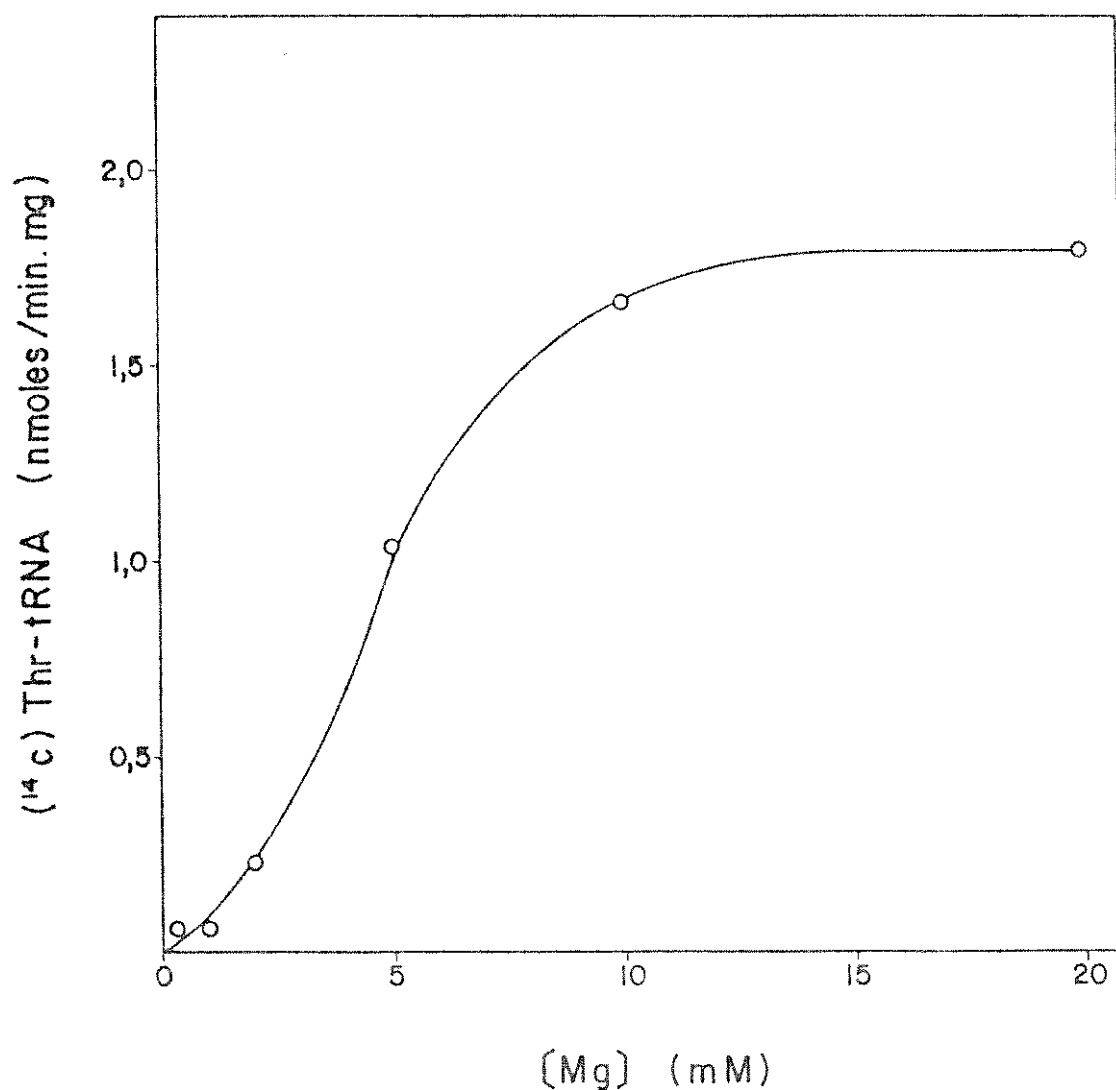


FIGURA 13 - Efeito da concentração de magnésio na reação de aminoacilação

A atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.2), em presença de diferentes concentrações de Mg^{2+} . Utilizou-se nos ensaios o meio de reação descrito neste método, variando-se somente a concentração de Mg^{2+} conforme a figura.

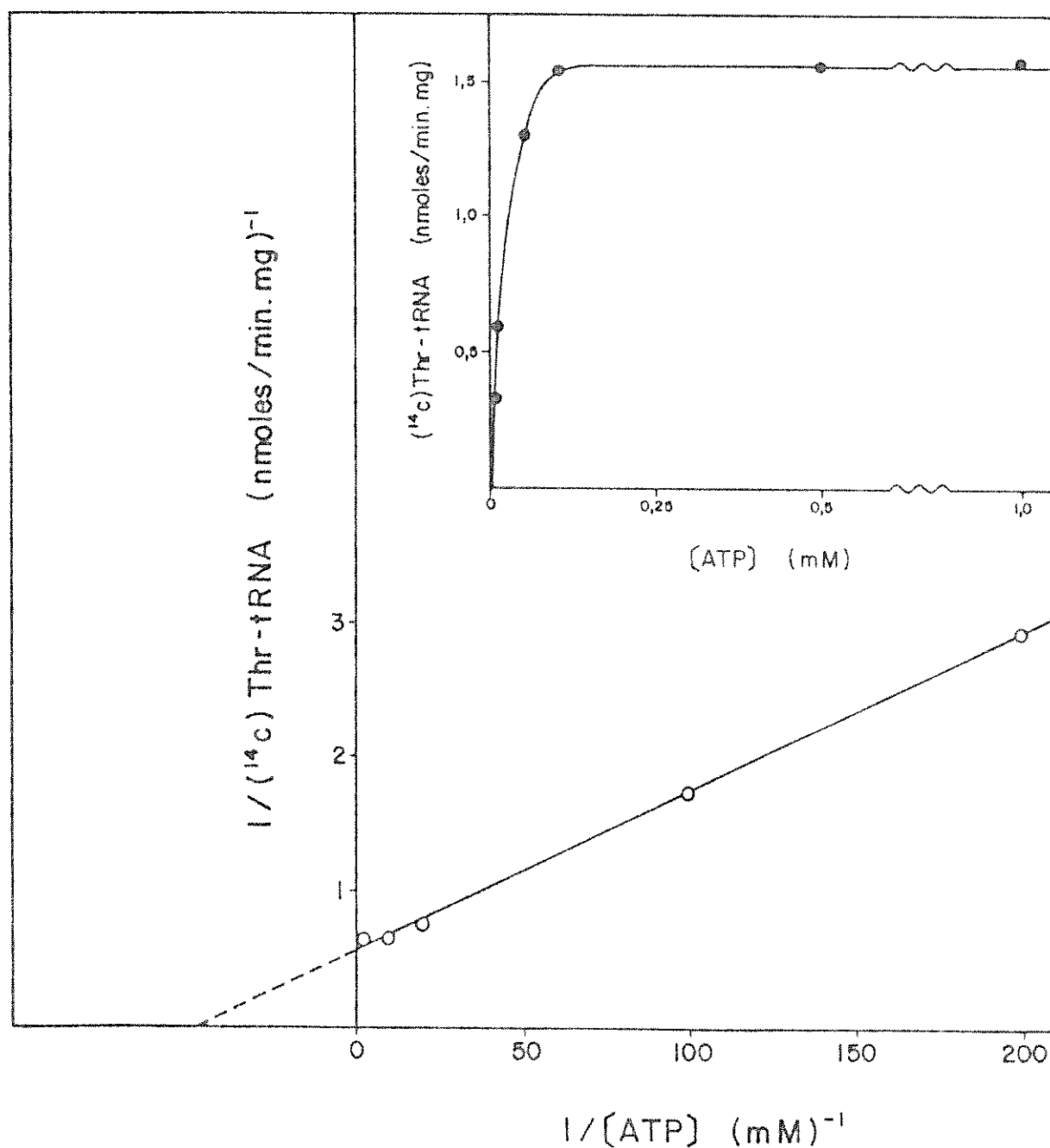


FIGURA 14 - Variação da concentração de ATP na reação de aminoacilação

O gráfico superior a direita mostra a atividade enzimática em função de diferentes concentrações de ATP. A dosagem da atividade enzimática e o meio de reação contendo as concentrações de ATP indicadas na figura, estão descritos em métodos (2.5.2). O gráfico inferior a esquerda é de Lineweaver e Burk através do qual determinou-se a K_M do ATP.

as concentrações de ATP situadas entre 0,10 mM e 1,0 mM foram efetivas para atingir a atividade enzimática máxima. Nos ensaios foi mantida a concentração de 0,5 mM. O valor da K_M para o ATP, determinado pelo gráfico inferior a esquerda foi de $2,2 \cdot 10^{-5} M$.

3.6. Influência da concentração de tRNA e determinação da K_M .

A variação da atividade enzimática em função da concentração de tRNA está indicada no gráfico superior a direita da FIG.15. Observa-se que a atividade enzimática é constante entre as concentrações de 0,3 mg e 0,4 mg de tRNA as quais correspondem a velocidade máxima da reação. Adotamos nos ensaios a concentração de 0,3 mg de tRNA. Pelo gráfico inferior a esquerda determinamos a K_M do tRNA que foi $2,4 \cdot 10^{-4} M$. Para obtenção da K_M em concentração molar, assumimos que o P.M. do tRNA é 28.000.

3.7. Influência da concentração de treonina e determinação da K_M .

No gráfico superior a direita da FIG.16 está indicada a variação da velocidade da reação em função da concentração de treonina. A atividade enzimática máxima é atingida a partir da concentração 0,02 mM, sendo praticamente constante até 0,04 mM. Nos ensaios a concentração de treonina variou entre 0,01 mM e 0,02 mM. O valor da K_M para treonina, obtido através do gráfico inferior a esquerda foi $4 \cdot 10^{-6} M$.

3.8. Especificidade da TRS por outros L-aminoácidos.

A TAB.VIII mostra que entre os L-aminoácidos ensaia

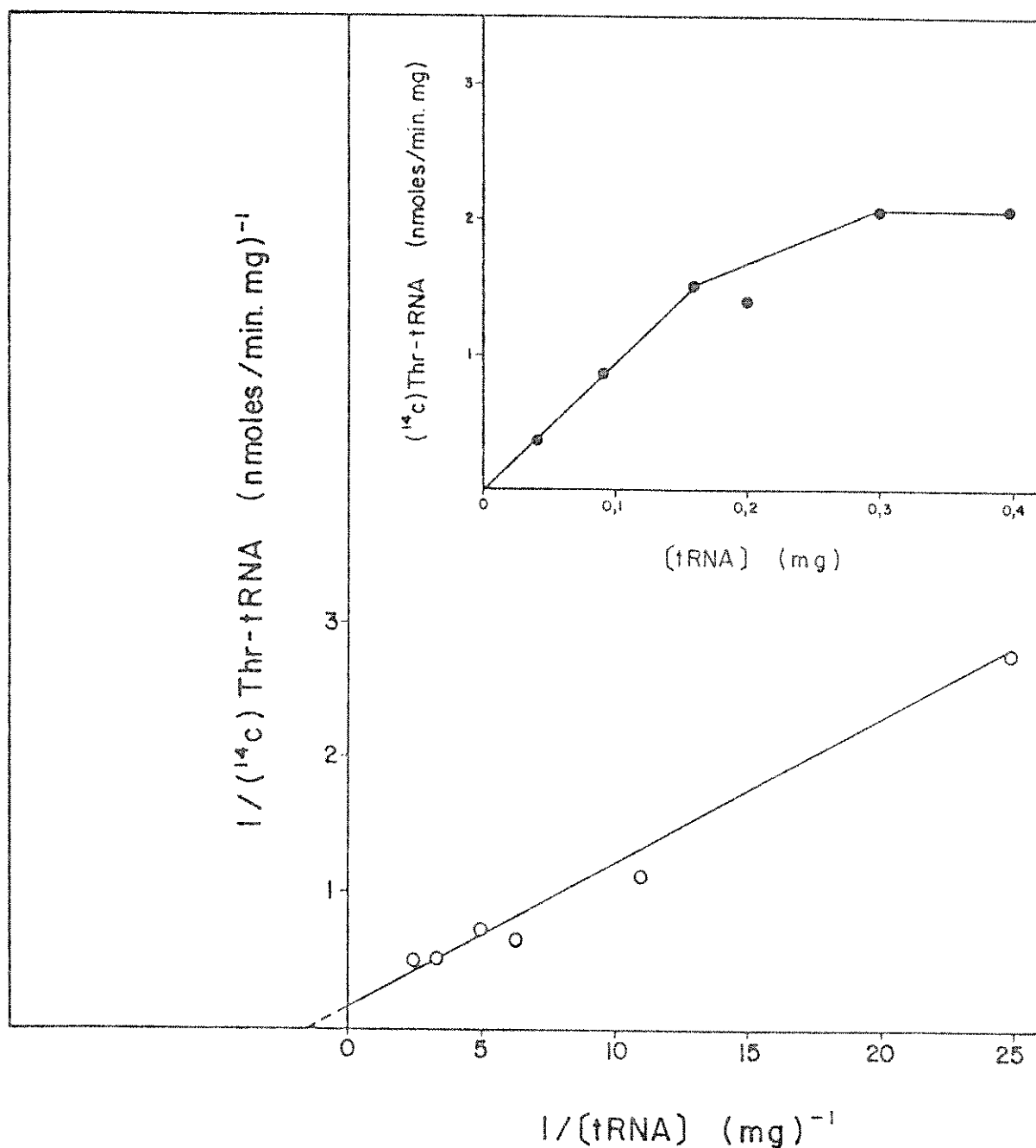


FIGURA 15 - Influência da concentração de tRNA na reação de aminoacilação

As concentrações de tRNA indicadas no gráfico superior a direita, foram adicionadas ao meio de reação e a atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.2). O meio de reação descrito neste método só foi alterado em relação a concentração de tRNA. A K_M do tRNA foi determinada pelo gráfico inferior a esquerda, segundo Lineweaver e Burk.

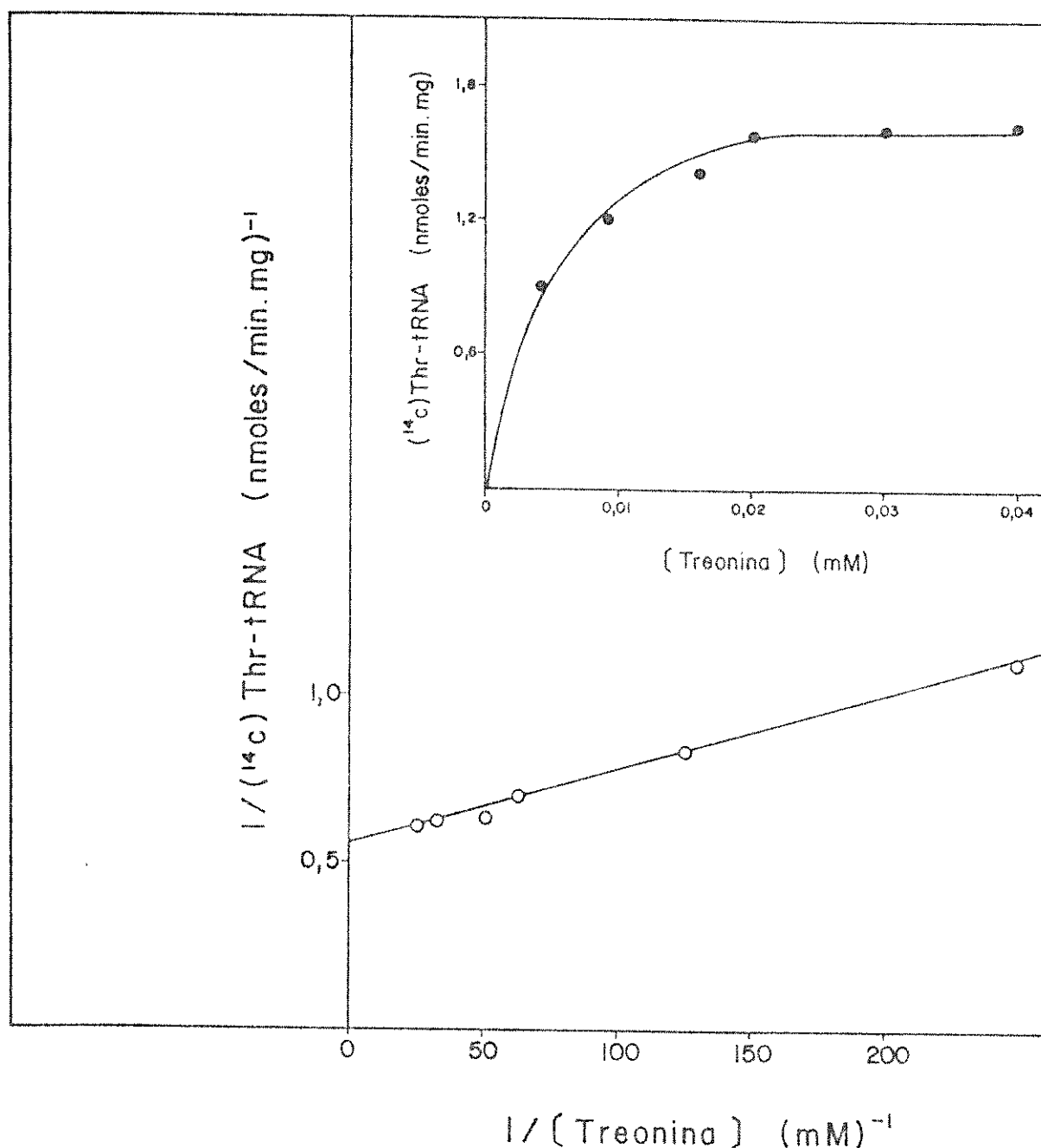


FIGURA 16 - Efeito da concentração de treonina na reação de aminoacilação

A atividade enzimática foi determinada pelo método (2.5.2) em presença das concentrações de treonina indicadas no gráfico superior a direita. Exceto a concentração de treonina que variou no meio de reação, os demais componentes não foram alterados. Através do gráfico inferior a esquerda, determinou-se a K_M da treonina conforme Lineweaver e Burk.

TABELA VIII

Especificidade da TRS em relação a L-aminoácidos na reação de aminoacilação.

Utilizou-se o método (2.5.2) para determinação da atividade enzimática. Os L-aminoácidos radioativos foram adicionados conforme indicado na concentração final de 0,01 mM. Usou-se 200 µg de tRNA, e a reação foi catalisada por 0,86 µg de enzima.

L-aminoácidos radioativos	AA-tRNA formado (nmoles/min.mg)
(¹⁴ C) treonina	1,87
(¹⁴ C) cisteína	0,00
(¹⁴ C) fenilalanina	0,17
(³ H) triptofano	0,23
(³ H) arginina	0,00
(³ H) leucina	0,00
(³ H) lisina	0,00
(³ H) metionina	0,00
(³ H) prolina	0,00

dos, a fenilalanina e o triptofano causam uma aminoacilação parcial do tRNA de 9% e 12% respectivamente, em relação a aminoacilação obtida com a treonina, considerada 100%. Com os demais aminoácidos nenhuma atividade enzimática foi obtida.

3.9. Especificidade da TRS por outros nucleotídeos trifosfato.

Na TAB IX está indicada a alta especificidade enzimática pelo ATP, considerada 100%. Exceto a pequena aminoacilação causada pelo GTP e CTP, respectivamente 12% e 6,5%, nenhum efeito foi observado com os outros nucleotídeos ensaiados.

3.10. Substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes.

O efeito de outros cátions bivalentes é mostrado na TAB.X. Tomando-se como 100% a aminoacilação obtida com Mg^{2+} , observa-se que com exceção do Zn^{2+} os demais cátions Mn^{2+} , Ba^{2+} e Ca^{2+} substituem parcialmente o Mg^{2+} causando aminoacilação de 55%, 43% e 39% respectivamente.

3.11. Substituição do Mg^{2+} por amina.

Na TAB.XI está indicado o efeito das aminas utilizadas em substituição ao Mg^{2+} . Comparando-se a aminoacilação obtida com as aminas em questão com o controle onde Mg^{2+} foi mantido e cuja aminoacilação é considerada 100%, verifica-se que a espermidina; a 1,2 diamino propano e a diamino etano causam substituição parcial do Mg^{2+} em 61%, 10% e 6% respectivamente. As demais aminas não causava praticamente nenhum efeito.

TABELA IX

Especificidade da TRS em relação a nucleotídeos trifosfato na reação de aminoacilação.

A determinação da atividade enzimática e o meio de reação es
tão descritos em métodos (2.5.2). Exceto a concentração de
tRNA 200 µg e o tipo de nucleotídeo adicionado conforme indi
ca a tabela, as demais condições foram mantidas. Utilizou-se
0,86 µg de enzima.

Nucleotídeos	(¹⁴ C)Thr-tRNA formado (nmoles/min.mg)
-	0,00
ATP	2,00
GTP	0,24
CTP	0,13
UTP	0,00

TABELA X

Efeito de cations bivalentes na reação de aminoacilação.

Os cations abaixo indicados, foram adicionados ao meio de reação em substituição ao Mg^{2+} , exceto no controle onde o Mg^{2+} foi mantido. O meio de reação e a determinação da atividade enzimática estão descritos em métodos (2.5.2). A reação foi catalisada por 0,86 μg de TRS.

Cations bivalentes	(^{14}C) Thr-tRNA formado (nmoles/min.mg)
-	0,00
Mg^{2+}	1,67
Mn^{2+}	0,92
Ba^{2+}	0,72
Ca^{2+}	0,65
Zn^{2+}	0,00

TABELA XI

Efeito de aminos na reação de aminoacilação.

Adicionou-se ao meio de reação as aminos abaixo indicadas na concentração 10 mM em substituição ao Mg^{2+} . O meio de reação e a determinação da atividade enzimática estão descritos em métodos (2.5.2). A reação foi catalisada por 0,86 μg de enzima.

Aminos	(^{14}C)Thr-tRNA formado (nmoles/min.mg)
-	0,00
controle (+ Mg^{2+})	1,67
diamino etano	0,10
1,2-diamino propano	0,16
1,5-diamino pentano	0,00
1,6-diamino hexano	0,01
espermidina	1,02
espermina	0,03

TABELA XII

Influência de reagentes sulfidrílicos na reação de aminoacilação.

0,86 µg de TRS previamente dialisada foi utilizada nos ensaios. Determinou-se a atividade enzimática pelo método (2.5.2). O sistema completo diferencia-se do meio de reação descrito neste método, apenas pela ausência de GSH.

Adições ao sistema completo	(¹⁴ C)Thr-tRNA formado (nmoles/min.mg)
nenhuma	1,96
1 mM GSH	2,58
0,25 mM NEM	0,18
0,30 mM DTNB	0,00
1 mM GSH + 0,25 mM NEM	2,89
1 mM GSH + 0,30 mM DTNB	1,57

3.12. Influência de reagentes SH

A proteção da enzima por GSH durante a reação, pode ser verificada na TAB.XII. Na ausência de GSH a atividade enzimática é reduzida em 24% em comparação com a atividade obtida na presença de GSH, tomada como 100%. Quanto aos reagentes bloqueadores de grupos SH, NEM e DTNB observa-se inativação da enzima em 93% e 100% respectivamente. Em presença de GSH, a inativação causada pelo DTNB é parcialmente eliminada, obtendo-se 61% de atividade enzimática. Com relação ao NEM, o GSH protege totalmente a enzima da inativação.

DISCUSSÃO

1. Purificação

O aumento da atividade específica da treonil-tRNA sintetase durante as etapas iniciais da purificação, anteriores a cromatografia em DEAE-celulose, foi relativamente pequeno. A presença de substratos endógenos e a grande quantidade de proteínas existentes nas frações iniciais, podem ter contribuído para este fato. A partir desta etapa cromatográfica o aumento da atividade específica passa a ser significativo conforme indicado na TAB.I. Ao final de três diferentes tipos de cromatografia, obtivemos uma enzima purificada 120 vezes com um rendimento de 7%, cujo grau de homogeneidade não foi total conforme mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida na FIG.3, onde pode-se observar a existência de mais de uma banda de proteína. Nossa purificação foi inferior a descrita por Taga (1974) para a mesma enzima. Aquele autor trata o dialisado do fracionamento com sulfato de amônio inicialmente com hidroxapatita, ao passo que nós realizamos nesta fase cromatografia em DEAE-celulose, por ser este um método mais rápido. Acreditamos, entretanto, que esta simples inversão na cromatografia não deva ser responsável pela diferença na purificação.

Entre as dificuldades encontradas na purificação da TRS, constituiu-se um dos pontos críticos, a eliminação de mi crossomo. Normalmente, o sobrenadante pós-microssomal é obtido por centrifugação a 105.000 x g, durante 1 hora. Lemaire e colaboradores (1969) separam microssomo por precipitação do

sobrenadante pós mitocondrial com BaCl_2 a uma concentração final de 0,02 M. A opção por um destes dois métodos foi feita através de um estudo comparativo, usando um mesmo extrato celular que foi dividido em duas porções, sendo uma precipitada com BaCl_2 e a outra ultracentrifugada. Verificamos que a perda da atividade específica do material precipitado com BaCl_2 é recuperada na etapa seguinte, que é saturação com sulfato de amônio a 75%. Por esta razão e por ser mais simples e mais rápida que a ultracentrifugação, a eliminação de microssomo por precipitação com BaCl_2 foi mantida.

A próxima etapa que apresentou dificuldades, foi a diálise do material 75% saturado. Devido a alta concentração de sulfato de amônio, a sua eliminação por diálise não ocorre em menos de 24 horas, ainda que sucessivas trocas de tampão sejam efetuadas. Em decorrência desta prolongada diálise, frequentemente uma porção de enzima é perdida por denaturação, sendo necessária uma centrifugação, antes de realizar a cromatografia.

Quanto as etapas cromatográficas, os resultados foram repetitivos nas diversas purificações efetuadas. Devido ao baixo teor de proteínas do material eluído da coluna de fosfocelulose, a concentração foi feita por filtração em membrana de nitrocelulose sob pressão de nitrogênio, evitando as diálises prolongadas necessárias quando sulfato de amônio é utilizado para concentração.

Em relação a estabilidade da TRS durante a purificação, verificamos que exceto o material eluído da coluna de DEAE que é estável por uma semana a 4°C , nas demais etapas da

purificação a perda de atividade enzimática é bastante considerável, devendo-se evitar o congelamento prolongado do material. Após a última etapa de purificação, a adição de glicerol a 50% estabiliza a TRS, durante cerca de 6 meses por armazenamento a -15°C .

Nos estudos cinéticos realizados com esta enzima, a remoção do glicerol por diálise mostrou-se desnecessária, após termos constatado que a atividade da enzima dialisada e da enzima contendo 50% de glicerol é praticamente a mesma. Por esta razão e pelo fato de que a enzima após diálise perde facilmente sua atividade (cerca de 24 horas), utilizou-se nos ensaios a enzima contendo glicerol, devidamente diluída.

2. Determinação dos parâmetros cinéticos pela reação de intercâmbio ATP-PPi

As condições ótimas para esta reação, foram estabelecidas através do estudo da influência do pH; concentração de enzima; concentração de Mg^{2+} e determinação das K_M s para cada um dos substratos.

Quanto ao estudo do pH na reação, dois fatores devem ser considerados: a natureza do tampão e o pH propriamente dito. A FIG.4 mostra que a variação da atividade enzimática em função do pH é pouco acentuada entre os pHs 7,0 e 8,0, quando foi utilizado tampão fosfato, porém a atividade é cerca de 50% menor do que quando se utiliza tampão tris-HCl. O efeito inibidor causado por tampão fosfato nesta reação, já foi observado para outras sintetases. Mehler (1971) atribuiu esta inibição a alta sensibilidade da reação a concentração de Mg^{2+} . Este íon pode formar complexos com muitas substâncias

utilizadas como tampão dependendo do pH. Assim, apesar da atividade enzimática variar mais acentuadamente com o pH e do inconveniente do pH ser dependente da temperatura, selecionamos o tampão tris-HCl pH 7,8 como ótimo para a reação (neste pH o poder tamponante do fosfato é pequeno).

Entre as concentrações de enzima indicadas na FIG.5, a escolha de 10 µg por ensaio, que corresponde a uma diluição de 1:20 da enzima armazenada com 50% de glicerol, mostrou-se adequada, devido a redução da viscosidade e promoção de um bom índice de atividade enzimática.

Os valores das K_M s obtidos para cada um dos substratos foram: $1,1 \cdot 10^{-4}$ M para o ATP; $1,2 \cdot 10^{-4}$ M para a treonina e $2,1 \cdot 10^{-4}$ M para o PPI, conforme indicado nas FIG.7; 8 e 9 respectivamente. Estes valores não diferem significativamente dos obtidos por Taga (1974).

As concentrações de ATP e PPI podem ser discutidas em função da concentração de Mg^{2+} (FIG.6) devido a formação de complexos entre este íon e aqueles substratos. Uma análise cinética detalhada dos possíveis tipos de complexos formados entre ATP e Mg^{2+} ; e PPI e Mg^{2+} foi feita por Cole e Schimmel (1970), que estabeleceram que tanto o ATP quanto o PPI, competem pelo Mg^{2+} para formar os verdadeiros substratos da reação, $MgATP^{2-}$ e $MgP_2O_7^{2-}$ em pH 8,0. Os nossos resultados indicam a necessidade de uma relação ATP: Mg^{2+} ótima para se atingir a velocidade máxima da reação. Para 1 mM de ATP e variando-se a concentração de Mg^{2+} (FIG.6), observamos que a velocidade máxima da reação só foi atingida a partir da concentração 5 mM

de Mg^{2+} e foi constante até 20 mM. Disto tiramos que as relações ATP: Mg^{2+} 1:5; 1:10 e 1:20 são efetivas na reação. Para a concentração fixa de Mg^{2+} 10 mM e concentração variável de ATP (FIG.7) estas relações ATP: Mg^{2+} , são igualmente eficientes. Em ambos os casos observa-se que tanto o ATP quanto o Mg^{2+} são limitantes da velocidade da reação, desde de que estas relações não sejam mantidas.

Quanto ao PPI, observa-se uma inibição da velocidade da reação para concentrações acima de 1 mM (FIG.9). Considerando-se que este substrato também forma complexo com o Mg^{2+} e que a relação PPI: Mg^{2+} ótima foi 1:10, conseguimos reversão parcial da inibição, quando aumentamos a concentração de Mg^{2+} para valores próximos da relação ótima. Porém, o aumento da concentração de Mg^{2+} para concentrações de PPI acima de 2 mM que são inibidoras, causam precipitação de pirofosfato de magnésio. Deve-se levar em conta, também que concentrações elevadas de PPI, causam diluição isotópica no ensaio.

Em resumo, os valores das KMs para cada um dos substratos, envolvidos nesta reação, estão em concordância com os valores de KMs descritos para as sintetases em geral (Schimmel e Soll, 1979).

O efeito do tRNA na reação ATP-PPI foi praticamente nulo, conforme indicado na TAB.II. A sua função nesta reação, é bastante discutida devido a existência de três sintetases, glutamil-, glutaminil- e arginil-tRNA sintetase que não catalisam a reação de intercâmbio na ausência de tRNA, sendo este um forte argumento contra a reação de aminoacilação em 2 etapas, geralmente aceita para as demais sintetases. Kern e

Lapointe (1980) sugeriram que o tRNA é necessário na reação de intercâmbio como efector alostérico responsável por mudanças conformacionais da enzima, tornando-a ativa. A ausência de qualquer efeito do tRNA na reação de intercâmbio, fato este também observado por Aoyama (1974) para a mesma enzima de fígado de rato, para a qual também foi isolado o complexo intermediário funcional (TRS.AMP-treonina) por Allende e colaboradores (1970), parecem-nos boas evidências de que a TRS de fígado de boi, catalisa a reação de aminoacilação em 2 etapas.

A especificidade da treonil-tRNA sintetase em relação a treonina é bastante grande. Com exceção da serina ativada em 4% e da histidina ativada em 20% (TAB.III), nenhum outro dos L-aminoácidos testados, é reconhecido pela enzima como substrato. A pequena ativação obtida com a serina, poderia ser explicada pelas semelhanças estruturais deste aminoácido com a treonina. Porém para histidina que é estruturalmente muito diferente da treonina e cujo grau de ativação foi maior que o obtido para a serina, poder-se-ia pensar em uma possível contaminação da nossa enzima pela histidil-tRNA sintetase, embora tal hipótese não tenha sido comprovada experimentalmente.

Entre os vários nucleotídeos testados, GTP, CTP, UTP e AMP, nenhum mostrou-se efetivo como substrato para esta reação, indicando que a TRS é altamente específica com relação ao ATP (TAB.IV). Estudos com análogos de ATP (Freist e Cramer, 1980) tem mostrado diferentes efeitos conforme a enzima e o tipo de reação utilizado para determinar a atividade enzimática. Aoyama (1974), verificou que o α,β -metileno ATP não subs-

titui o ATP na reação ATP-PPi catalisada pela TRS de fígado de rato.

O requerimento de cátions bivalentes, geralmente Mg^{2+} , parece ser um fato indiscutível para esta família de enzimas, pelo menos na reação ATP-PPi (Santi e Webster, 1975). Porém a substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes, causa diferentes níveis de atividade dependendo do cátion e da enzima em questão. Na reação ATP-PPi, observamos uma substituição parcial pelo Mn^{2+} e Zn^{2+} (TAB.V) que causam 22% de atividade enzimática; com relação ao Ca^{2+} , Ba^{2+} e Cu^{2+} , nenhuma ativação foi observada. O efeito real da substituição do Mg^{2+} nesta reação, é dificultado devido a precipitação da maioria dos cátions utilizados, com exceção do Zn^{2+} e Cu^{2+} . Devido a necessidade de manter uma concentração ótima de cátions no ensaio, com já foi discutido em relação ao Mg^{2+} , diminuir a concentração destes para evitar precipitação poderia causar resultados falsos. Quanto ao cobre que apesar de não precipitar é completamente inativo, pode-se atribuir um outro efeito, que é a capacidade deste cátion de oxidar grupos SH que podem estar envolvidos com a atividade da enzima (Kern e Lapointe, 1979).

Por outro lado, a substituição do Mg^{2+} por diaminas e poliaminas, não mostrou qualquer efeito na reação ATP-PPi (TAB.VI). Sendo cátions polivalentes amplamente distribuídos na natureza e capazes de interagir com ácidos nucleicos e proteínas (Cohen, 1971) o seu possível efeito nas reações catalisadas pelas sintetases tem sido amplamente estudado. Para a nossa enzima, assim como para as ARS de uma maneira geral, a

reação ATP-PPi não é catalisada por aminas, na ausência de Mg^{2+} (Aoyama, 1974).

Quanto a inativação das ARS por reagentes bloqueadores de grupos SH observa-se uma ampla variedade de efeitos, conforme a enzima e a reação utilizada para determinação da atividade enzimática (Lipscomb e colaboradores, 1976). O PCMB causou a perda de 81% da atividade enzimática que foi recuperada em presença de DTT, enquanto o NEM e o DTNB praticamente não causaram qualquer efeito na reação ATP-PPi (TAB.VII). Quanto ao NEM e DTNB, poder-se-ia pensar que estes reagentes tenham atuado em grupos SH, não envolvidos na atividade catalítica da TRS, pelo menos nesta reação. Ostrem e Berg(1974) mostraram que para a glicil-tRNA sintetase de E.coli, o NEM reage rapidamente com um grupo SH de uma das subunidades desta enzima, causando um estímulo na velocidade da reação ATP-PPi. Porém, esta enzima modificada por NEM, não é capaz de catalisar a reação de aminoacilação. P-hidroximercuribenzoato causou a perda da atividade enzimática em ambas as reações devido a dissociação das cadeias α e β componentes desta enzima.

3. Determinação dos parâmetros cinéticos pela reação de aminoacilação

Por este método de determinação da atividade enzimática, foram feitos praticamente os mesmos estudos cinéticos que na reação ATP-PPi. As condições ótimas de ensaio foram determinadas, verificando-se a influência do pH na reação, assim como da concentração de enzima; BSA; Mg^{2+} e de cada um dos substratos. Com estas condições estabelecidas, foram feitos estudos relativos a especificidade enzimática, substituição

de Mg^{2+} por cátions bivalentes e aminas, e inativação da TRS por reagentes SH.

A influência do pH na atividade enzimática para a reação de aminoacilação praticamente não diferiu do observado na reação ATP-PPi; a velocidade da reação foi bastante sensível ao pH (FIG.10). As menores variações da velocidade da reação estão situadas entre os pHs 7,5 e 8,5, ocorrendo um pico de atividade máxima em pH 8,0. Os valores de pH abaixo desta faixa ou acima causam limitação acentuada da atividade enzimática, principalmente em pH entre 5,0 e 6,0. Estes resultados estão de acordo com a exigência de meio alcalino para a reação de aminoacilação, que é uma característica comum de todas as sintetases (Kern e Lapointe, 1979).

A atividade enzimática em função da concentração da enzima apresentou uma quebra da linearidade a partir de concentrações superiores a 2 μ g (FIG.11). A não linearidade na velocidade em função da concentração de enzima pode ser devido a alguns fatores como: a) limitação na capacidade do método de estimação da velocidade, não indicando um decréscimo real na atividade enzimática; b) exaustão de substrato, não indicando falta de proporcionalidade de velocidade inicial com a concentração de enzima; c) a presença de algum inibidor na preparação enzimática, uma vez que a enzima utilizada nos ensaios, proveniente da cromatografia de fosfocelulose, não é dialisada previamente por problemas de estabilidade.

O aumento da atividade enzimática em presença de BSA (FIG.12) é devido ao fato de que a BSA protege a enzima da inativação causada pela alta diluição da mesma nos ensaios. Obser

vamos que na ausência de BSA a enzima diluída perde a atividade em questão de 3 a 4 horas. Estes resultados estão de acordo com Carias e colaboradores (1978) que verificaram que a leucil- e arginil-tRNA sintetase de germe de trigo, possuem suas atividades aumentadas em presença de BSA, além de serem protegidas da inativação. Este efeito da BSA, deve estar associado a formação de complexos multimoleculares pelas ARS de eucariotos (Kellermann e colaboradores, 1979). A medida que estes complexos são desagregados durante a purificação da enzima vai ocorrendo perda da estabilidade da mesma. A função da BSA seria promover algum tipo de interação com a enzima, mantendo-a em sua conformação ativa.

Nesta reação, assim como na reação ATP-PPi, há requerimento do cátion Mg^{2+} . Entre as suas possíveis funções, a formação de complexo com o ATP é bastante clara, conforme pode ser observado nas figuras 13 e 14; a manutenção de uma relação ótima ATP: Mg^{2+} é uma condição necessária nesta reação. Com a fixação da concentração de ATP em 0,5 mM (FIG.13) obtivemos a velocidade máxima da reação com Mg^{2+} 20 mM, portanto a relação ATP: Mg^{2+} ótima foi 1:40. Por outro lado, a variação de ATP (FIG.14), mantendo a concentração de Mg^{2+} em 20 mM, indicavam que as relações ATP: Mg^{2+} ótimas para a reação podem ser 1:20; 1:40 e 1:80. A maior quantidade de Mg^{2+} nesta reação em comparação com a reação ATP-PPi, provavelmente está relacionada com o tRNA (substrato desta reação) que também requer Mg^{2+} para manutenção de sua estrutura (Santi e Webster, 1975).

Os valores das KMs obtidas nesta reação foram: - $2,2 \cdot 10^{-5}$ M para o ATP (FIG.14); $2,4 \cdot 10^{-4}$ M para o tRNA (FIG.15)

e 4.10^{-6} M para a treonina (FIG.16). Com relação ao ATP e treonina, estes valores de K_M , estão dentro da média encontrada para as sintetases em geral (Schimmel e Soll, 1979). Porém, a K_M para tRNA mostrou-se muito alta em comparação com as obtidas para outras sintetases, que variam entre 10^{-6} e 10^{-8} M, indicando a alta afinidade das ARS pelos seus respectivos tRNAs. Acreditamos que a baixa afinidade da TRS pelo tRNA está relacionada com a utilização de tRNA de E.coli, portanto um sistema heterólogo, além do mesmo ter sido utilizado na forma bruta, isto é, contendo aceptores para muitos outros L-aminoácidos. Schimmel e Soll (1979) mostraram que nos sistemas heterólogos existe uma menor afinidade da enzima pelo tRNA, além de ser mais frequente aminoacilações incorretas. Kern e colaboradores (1975) observaram que grandes diferenças de K_M foram encontradas quando se utilizou o tRNA específico para a valina e o tRNA bruto na reação de aminoacilação catalisada pela valil-tRNA sintetase de levedura, ainda que ambos os tRNAs fossem procedentes da mesma fonte que a enzima, isto é, um sistema homólogo.

Nos estudos de especificidade da TRS por outros aminoácidos (TAB.VIII), verificamos uma pequena aminoacilação pela fenilalanina 9% e pelo triptofano 12%. Sendo estes aminoácidos estruturalmente bem diferentes da treonina, estas aminoacilações inespecíficas poderiam ter sido causadas por contaminação da nossa preparação. Levando-se em conta que em presença de fenilalanina e triptofano a reação de intercâmbio ATP-PPi não ocorre acreditamos que o principal fator determinante destas aminoacilações tenha sido a utilização de um sis

tema heterólogo que é propício para aminoacilações incorretas, principalmente quando se utiliza tRNA bruto (Schimmel e Soll, 1979).

Quanto ao ATP, a TRS mostrou uma grande especificidade em comparação com os outros nucleotídeos testados (TAB. IX). A pequena velocidade da reação obtida na presença de GTP e CTP, 12% e 6,5% respectivamente, pode ser justificada por uma menor exigência da TRS em relação à adenina. Freist e colaboradores (1978) observaram que análogos do ATP contendo mo dificações na base, servem como substrato nas reações de ami noacilação, catalisada pela TRS de levedura, porém reduzem a 25% a velocidade da reação. Por outro lado, análogos contendo modificações na ribose são completamente inativos.

A substituição do Mg^{2+} por outros cátions bivalentes nesta reação, mostrou resultados bem diferentes em comparação com a reação ATP-PPi (TAB.X). Com exceção do Zn^{2+} que não possui qualquer efeito na reação os demais cátions utilizados substituem parcialmente o Mg^{2+} na seguinte ordem de eficiência: $Mg^{2+} = 100\% > Mn^{2+} = 55\% > Ba^{2+} = 43\% > Ca^{2+} = 39\%$. As causas destes diferentes graus de eficiência não são bem determinadas. Como nesta reação o PPi é substituído pelo tRNA, e sen do o PPi a principal causa da precipitação na reação ATP-PPi, poder-se-ia pensar que estes cátions fossem capazes de formar complexos com o ATP embora menos eficientemente que o Mg^{2+} .

Os efeitos de amins em substituição ao Mg^{2+} estão indicados na TAB.XI. Observa-se que as diaminas são substituintes pouco eficientes, enquanto a espermidina é capaz de causar 61% de aminoacilação. A função das poliaminas princi-

palmente, é bastante discutida na reação de aminoacilação, pois em alguns casos, elas são capazes de catalisar a reação com a mesma eficiência que o Mg^{2+} (Takeda e Onishi, 1975). Por outro lado, Santi e Webster (1975) observaram que a substituição do Mg^{2+} por espermina é devida ao tRNA, que mesmo após extensiva diálise contra EDTA, ainda retém Mg^{2+} na sua estrutura em quantidade suficiente para formar complexo com o ATP, sendo apenas aparente o efeito estimulante da espermina.

A inativação da TRS por reagentes bloqueadores de grupos SH pode ser observada na TAB. XII. Enquanto o NEM e o DTNB causam inativação completa da enzima nesta reação, na reação ATP-PPi nenhum efeito foi observado na atividade enzimática por estes mesmos reagentes. Este diferente efeito causado na TRS conforme o método utilizado para determinação da atividade enzimática pode ter sido causado por algum tipo de alteração na molécula da enzima, inativando o sítio do tRNA que é substrato na reação de aminoacilação, mas não da reação ATP-PPi. A inativação da enzima por qualquer um destes reagentes é evitada em presença de GSH.

CONCLUSÕES

Durante a purificação da TRS, a determinação da atividade enzimática foi feita pelo método ATP-PPi. Conforme nos resultados cinéticos, observa-se que nesta reação entre os vários fatores que podem afetar a atividade enzimática, a concentração de PPi é um dos principais porque o mesmo é inibidor da reação quando utilizado fora da concentração ótima, que é de 1 mM. Como as condições ótimas para esta reação são foram estabelecidas com a enzima relativamente homogênea e devido a instabilidade da TRS, é provável que a concentração de PPi 2 mM utilizada para determinação da atividade enzimática durante as etapas da purificação tenha sido o principal fator responsável pelos baixos índices obtidos.

Quanto ao comportamento cinético da TRS, observa-se que grandes diferenças são encontradas, conforme o método utilizado na determinação da atividade enzimática, devendo-se observar o método utilizado para comparação de resultados com outras sintetases.

Finalmente, a falta de conhecimento da exata estrutura da TRS de fígado de boi, assim como das ARS de eucariotos em geral limita um maior entendimento do seu comportamento cinético, principalmente no que se refere à inativação da enzima por reagentes SH.

RESUMO

A treonil-tRNA sintetase foi purificada de fígado bovino utilizando-se centrifugações diferenciais, saturação fracionada com sulfato de amônio e cromatografias em DEAE-celulose, hidroxapatita e fosfocelulose. A purificação foi de cerca de 120 vezes, com rendimento de 7%. A eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou que a purificação não está totalmente homogênea. A enzima é mais estável a -20°C em presença de 50% glicerol.

Com esta enzima foram realizados estudos físico-químicos com a finalidade de determinar alguns parâmetros cinéticos. Na reação de intercâmbio ATP-PPi, onde a presença de tRNA não é necessária, e as especificidades pela treonina e pelo ATP são bastante altas, obteve-se $K_M(\text{ATP}) = 1,1 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $K_M(\text{treonina}) = 1,2 \cdot 10^{-4} \text{M}$; $K_M(\text{pirofosfato}) = 2,1 \cdot 10^{-4} \text{M}$. Na reação de formação de treonil-tRNA foram obtidos: $K_M(\text{ATP}) = 2,2 \cdot 10^{-5} \text{M}$; $K_M(\text{treonina}) = 4 \cdot 10^{-6} \text{M}$; $K_M(\text{tRNA}) = 2,4 \cdot 10^{-4} \text{M}$. Ambas as reações dependem de Mg^{2+} e são sensíveis a reagentes sulfidrílicos.

SUMMARY

Threonyl-tRNA synthetase was extracted from beef liver and purified by differential centrifugations, neutral salt precipitation and chromatographic procedures. The degree of purification obtained was about 120 fold, with a yield of 7%. The analysis by polyacrylamide electrophoresis has shown a small heterogeneity at the last step of the enzyme purification.

The kinetic parameters were studied and the K_M values determined: $K_M(\text{ATP}) = 1.1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $K_M(\text{threonine}) = 1.2 \times 10^{-4} \text{ M}$ and $K_M(\text{PPi}) = 2.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ for ATP-PPi exchange reaction. For threonyl-tRNA formation reaction the K_M values found were: $2.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ (ATP); $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ (threonine) and $2.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ (tRNA). Both reactions were Mg^{2+} dependent and presented sensibility to sulfhydryl reagents.

BIBLIOGRAFIA

- Allende, C.C.; Allende, J.E.; Gatica, M.; Celis, J.; Mora, G. e Matamala, M. (1966). The aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetases. I. Properties of the threonyl adenylate-enzyme complex. *J.Biol.Chem.*, 241, 2245-2251.
- Allende, C.C.; Chaimovich, H.; Gatica, M. e Allende, J.E. (1970). The aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetases. II. Properties of an adenosine triphosphate-threonyl transfer ribonucleic acid synthetase complex. *J.Biol.Chem.*, 245, 93-101.
- Aoyama, H. (1974). Treonil-tRNA sintetase de fígado de rato. Reação de intercâmbio ATP-PPI; interação enzima-substrato; efeito de poliaminas. Tese de Doutorado. USP.
- Bergmann, F.H. (1962). Bacterial amino acyl RNA synthetases. In *Methods in Enzymology*, (Ed. S.P. Colowick e N.O.Kaplan), Acad.Press, N.Y., London, vol.V, 708-718.
- Bhanot, O.S.; Kucan, Z.; Aoyagi, S.; Lee, F.C. e Chambers, R.W. (1974). Purification of tyrosine: tRNA ligase, valine: tRNA ligase, alanine: tRNA ligase, and isoleucine: tRNA ligase from *Saccharomyces cerevisiae* α S 288 C. In *Methods in Enzymology*, (Ed. L.Grossman and K.Moldave) Acad.Press, N.Y., London, vol.XXIX, parte E, 547-576.
- Carias, J-R.; Mouricout, M.; Quintard, B., Thomes, J-C. e Julien, R. (1978). Leucyl-tRNA and arginyl-tRNA synthetases of wheat germ. Inactivation and ribosome effects. *Eur. J.Biochem.*, 87, 583-590.
- Chiu, A.O.S. e Suyama, Y. (1975). The absence of structural relationship between mitochondrial and cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase from *Tetrahymena pyriformis*. *Arch.Biochem. Biophys.*, 171, 43-54.

- Cohen, S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- Cole, F.S. e Schimmel, P.R. (1970). Isoleucyl transfer ribonucleic acid synthetase. The role of magnesium in amino acid activation, *Biochemistry*, 9, 3143-3148.
- Dietrich, A.; Giegé, R.; Comarmond, M.B.; Thlerry, J.C. e Moras, D. (1980). Christallographic studies on the aspartyl-tRNA synthetase tRNA^{ASP} system from yeast. The crystalline aminoacyl-tRNA synthetase. *J.Mol.Biol.*, 138, 129-135.
- Drocourt, J.L.; Thang, D.C.; Buckingham, R.H. e Thang, M.N. (1979). Blue dextran sepharose chromatography of the tryptophanyl-tRNA synthetase of *E.coli*: a potencial application for the purification of the enzyme. *Nucl.Ac. Res.*, 6, 2919-2928.
- Ebel, J.P.; Giegé, R.; Bonnet, J.; Kern, D.; Befort, N.; Bollack, C.; Fasiolo, F.; Gangloff, J. e Dirheimer, G. (1973). Factors determining the specificity of the RNA aminoacylation reaction. Non-absolute specificity of tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase recognition and particular importance of maximal velocity. *Biochimie*, 55, 547-557.
- Fasiolo, F. e Fersht, A.R. (1978). The aminoacyladenylate mechanism in the aminoacylation reaction of yeast phenylalanyl-tRNA synthetase. *Eur.J.Biochem.*, 85, 85-88.
- Faulhammer, H.G. e Cramer, F. (1977). Tyrosil-tRNA synthetase from Baker's yeast. Rapid isolation by affinity elution, molecular weight of the enzyme, and determination of essential sulfhydryl groups. *Eur.J.Biochem.*, 75, 561-570.
- Favorova, O.O.; Madoyan, I.A. e Kisselev, L.L. (1978). Evidence for essential histidine residues in tryptophanyl-tRNA synthetase. *Eur.J.Biochem.*, 86, 193-202.

- Freist, W.; Sternbach, H.; Von der Haar, F. e Cramer, F. (1978). Threonyl-tRNA, lysyl-tRNA and arginyl-tRNA synthetases from baker's yeast. Substrate specificity with regard to ATP analogues. *Eur.J.Biochem.*, 84, 499-502.
- Freist, W. e Cramer, F. (1980). Phenylalanyl-tRNA, lysyl-tRNA, isoleucyl-tRNA e arginyl-tRNA synthetases. Substrate specificity in the ATP-PPi exchange with regard to ATP analogs. *Eur.J.Biochem.*, 107, 47-50.
- Godeau, J-M. (1980). Arginyl-transfer ribonucleic acid synthetase of Bacillus stearothermophilus. Purification and kinetic analysis. *Eur.J.Biochem.*, 103, 169-177.
- Gornall, A.G.; Bardawill, J. e David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol.Chem.*, 177, 751-766.
- Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. *Anal.Biochem.*, 48, 422-427.
- Heider, H.; Gottschalk, E. e Cramer, F. (1971). Isolation and characterization of seryl-tRNA synthetase from yeast. *Eur.J.Biochem.*, 20, 144-152.
- Hennecke, H.; Bock, A.; Thomale, J. e Nass, G. (1977). Threonyl-transfer ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli: subunit structure and genetic analysis of the structural gene by means of a mutated enzyme and of a specialized transducing Lambda bacteriophage. *J. Bacteriol.*, 131, 943-950.
- Hirsh, D.I. (1968). A study of the threonyl adenylate complex with threonyl tRNA and its reactions with hydroxylamine. *J.Biol.Chem.*, 243, 5731-5738.

- Hoagland, M.B. (1955). An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim.Biophys.Acta*, 16, 288-289.
- Hyafil, F. e Blanquet, S. (1977). Methionyl-tRNA synthetase from E.coli: Substituting magnesium by manganese in the L-methionine activating reaction. *Eur.J.Biochem.*, 74, 481-493.
- Imbault, P.; Sarantoglou, V. e Weil, J.H. (1979). Purification of the chloroplastic valyl-tRNA synthetase from Euglena gracilis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 88, 75-84.
- Irwin, M.J.; Nyborg, J.; Reid, B.R. e Blow, D.M. (1976). The crystal structure of tyrosyl-transfer RNA synthetase at 2.7 Å resolution. *J.Mol.Biol.*, 105, 577-586.
- Jakubowski, H. e Pawelkiewicz, J. (1975). The plant aminoacyl-tRNA synthetases. Purification and characterization of valyl-tRNA, tryptophanyl-tRNA and seryl-tRNA synthetases from yellow-Lupin seeds. *Eur.J.Biochem.*, 52, 301-310.
- Kellermann, O.; Brevet, A.; Tonetti, H. e Waller, J-P. (1979). Macromolecular complexes of aminoacyl-tRNA synthetases from eukaryotes.1. Extensive purification and characterization of the high-molecular-weight complex(es) of seven aminoacyl-tRNA synthetases from sheep liver. *Eur.J.Biochem.*, 99, 541-550.
- Kern, D.; Giegé, R.; Robre-Saul, S.; Boulanger, Y. e Ebel, J-P. (1975). Complete purification and studies on the structural and kinetic properties of two forms of yeast valyl-tRNA synthetase. *Biochimie*, 57, 1167-1176.
- Kern, D.; Dietrich, A.; Fasiolo, F.; Renaud, M.; Giegé, R. e Ebel, J-P. (1977). The yeast aminoacyl-tRNA synthetases. Methodology for their complete or partial purification and comparison of their relative activities under various extraction conditions. *Biochimie*, 59, 453-462.

- Kern, D. e Lapointe, J. (1979). The twenty aminoacyl-tRNA synthetases from E.coli. General separation procedure, and comparison of the influence of pH and divalent cations on their catalytic activities. Biochimie, 61, 1257-1272.
- Kern, D. e Lapointe, J. (1980). The catalytic mechanism of glutamyl-tRNA synthetase of E.coli. Evidence for two-step aminoacylation pathway and study of the reactivity of the intermediate complex. Eur.J.Biochem., 106, 137-150.
- Kern, D.; Potier, S.; Lapointe, J. e Boulanger, Y. (1980) The glutamyl-transfer RNA synthetase of E.coli. Purification, structure and function relationship. Biochim.Biophys. Acta, 607, 65-80.
- Kim, J.P.; Chakraborty, K. e Mehler, A.H. (1977). Evidence for single mechanism for aminoacyl-tRNA synthetases including aminoacyl adenylate as intermediates. J.Biol. Chem., 252, 2698-2701.
- Kim, S-H. (1978). Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications. In Advances in Enzymology (Ed. A.Meister) John Wiley & Sons Inc., vol.46, 279-315.
- Kisselev, L.L. e Favorova, O.O. (1974). Aminoacyl-tRNA synthetases: Some recent results and achievements. In Advances in Enzymology (Ed. A.Meister) John Wiley & Sons, Inc., vol.40, 141-238.
- Koch, G.L.E.; Boulanger, Y. e Hartley, B.S. (1974) Repeating sequences in aminoacyl-tRNA synthetases. Nature, 249, 316-320.
- Kornberg, A. e Stadman, E.R. (1957). Preparation of coenzyme A. In Methods in Enzymology, (Ed. S.P.Colowick e N.O.Kaplan) Acad. Press Inc., N.Y., vol.III, 909.

- Kovaleva, G.K.; Kurkina, N.K.; Sudakova, E.S. e Favorova, O.O. (1977). Interaction of tryptophanyl-tRNA synthetase with tryptophan analogs modified at the α -amino groups. *Biokhimiya*, 42, 97-100.
- Kuehl, G.V.; Lee, M-L. e Muench, K.H. (1976). Tryptophanyl transfer ribonucleic acid synthetase of *Escherichia coli*. Character of required thiol group and structure of thiol peptides. *J.Biol.Chem.*, 251, 3254-3260.
- Lemaire, G.; Dorrizi, M. e Labouesse, B. (1969). Purification of tryptophan tRNA synthetase from beef pancreas. *Bull. Soc.Chim.Biol.*, 51, 495-510.
- Lemur, M.A.; Gerlinger, P.; Clavert, J. e Ebel, J-P. (1972). Purification and properties of seryl-tRNA synthetase from hen's liver. *Biochimie*, 54, 1391-1397.
- Lepore, G.C.; Di Natale, P.; Guarini, L. e De Lorenzo, F. (1975). Histidyl-tRNA synthetase from *Salmonella Thiphimurium*: Specificity in the binding of histidine analogues. *Eur.J.Biochem.*, 56, 369-374.
- Levin, O. (1962). Column chromatography of proteins: Calcium phosphate. In *Methods in Enzymology*, (Ed. S.P.Colowick e N.O.Kaplan), Acad.Press, N.Y., London, vol.V, 27-32.
- Lin, C-S.; Irwin, R. e Chirikjian, J.G. (1975). Kinetic studies of leucyl transfer RNA synthetase from bakers' yeast. Order of addition of substrates and release of products. *J.Biol.Chem.*, 250, 9299-9303.
- Lipscomb, M.S.; Lee, M-L. e Muench, K.H. (1976). Human tryptophanyl transfer ribonucleic acid synthetase. Composition, function of thiol groups, and structure of thiol peptides. *J.Biol.Chem.*, 251, 3261-3268.

- Locy, R.D. e Cherry, J.H. (1978). Purification and characterization of two tyrosyl-tRNA synthetase activities from soybean cotyledons. *Phytochemistry*, 17, 19-27.
- Loftfield, R.B. (1972). The mechanism of aminoacylation of tRNA. In *Progr.Nucl.Ac.Res.Mol.Biol.* (Ed. J.N.Davidson e W.E.Cohn). Acad.Press, N.Y. and London, vol.12, 87-128.
- Lovgren, T.N.E.; Heinonen, J. e Loftfield, R.B. (1975). The mechanism of aminoacylation of transfer ribonucleic acid. Reactivity of enzyme-bound isoleucyl adenylate. *J.Biol. Chem*, 250, 3854-3760.
- Malt, R.A. e Miller, W.L. (1967). Increased efficiency in liquid scintillation counting: glass fiber discs and a new scintillator. *Anal.Biochem.*, 18, 388-391.
- Mehler, A.H. (1970). Induced activation of aminoacid activating enzymes by amino acids and tRNA. In *Progr.Nucl.Ac.Res. Mol.Biol.* (Ed. J.N.Davidson e W.E.Cohn) Acad.Press, N.Y. London, vol.10, 1-22.
- Mehler, A.H. (1971). Factors influencing activity of aminoacyl-tRNA synthetases. In *Methods in Enzymology* (Ed. K.Moldave e L.Grossman) Ac.Press, N.Y. e London vol.XX, part C, 203-210.
- Mérault, G.; Graves, P-V.; Labouesse, B. e Labouesse, J. (1978). Influence of magnesium on the steady-state-derived order of substrate addition and product release in tRNA^{trp} aminoacylation by beef pancreas tryptophan: tRNA ligase. Significance of the deduced mechanism. *Eur.J.Biochem.*, 87, 541-550.
- Midelfort, C.F.; Chakraborty, K.; Steinschneider, A. e Mehler, A.H. (1975). Kinetic demonstration of the intermediate role aminoacyl-adenylate-enzyme in the formation of valyl transfer ribonucleic acid. *J.Biol.Chem.*, 250, 3866-3878.

- Moe, J.G. e Piszkievic, D. (1976). Purification of isoleucyl transfer ribonucleic acid by affinity chromatography on blue-dextran-sepharose. FEBS Lett., 72, 147-150.
- Myers, G., Blank, H.U. e Soll, D. (1971). A comparative study of the interactions of Escherichia coli leucyl-, seryl-, and valyl-transfer ribonucleic acid synthetases with their cognate transfer ribonucleic acids. J.Biol.Chem., 246, 4955-4964.
- Nevinskii, G.A.; Favorova, O.O.; Lavik, O.I.; Petrova, T.D.; Kochkina, L.L. e Savchenko T.I. (1975). Fluorinated analogs of tryptophan as substrates and inhibitors of ATP-(³²P) pyrophosphate exchange reaction catalyzed by tryptophanyl-tRNA synthetase. Biokhimiya, 40, 291-376.
- Novelli, G.D. (1967). Aminoacid activation for protein synthesis. In Ann.Rev.Biochem. (Ed. P.D.Boyer, A.Meister, R.L.Sinsheimer e E.E.Snell), Ann Rev.Inc. Calif. USA, vol.36 (parte II), 449-484.
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis. I. Back ground and theory. Ann.N.Y. Acad.Sci., 121, 321-349.
- Ostrem, D.L. e Berg, P. (1974). Glycyl transfer ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli, purification, properties and substrate binding. Biochemistry, 13, 1338-1348.
- Papas, T.S. e Mehler, A.H. (1970). Analysis of the amino acid binding to the proline tRNA synthetase of E.coli. J.Biol.Chem., 245, 1588-1595.
- Pastuszyn, A. e Loftfield, R.B. (1972). Non-participation of aminoacyl adenylates in the spermine catalyzed aminoacylation of tRNA. Biochem.Biophys.Res.Comm., 47, 775-783.

- Peterson, E.A. (1970). Cellulosic ion exchangers. In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, (Ed. T.S. Work e E. Work), North Holland Publ. Comp., Amsterdam, London, vol. 2, parte II.
- Peterson, E.A. e Sober, H.A. (1962). Column chromatography of proteins: substituted cellulose. In Methods in Enzymology, (Ed. S.P. Colowick e N.O. Kaplan), Acad. Press, N.Y., London, vol. V, 3-27.
- Rich, A. (1974). Transfer RNA and protein synthesis. *Biochimie*, 56, 1441-1449.
- Rich, A. e Rajbhandary, U.L. (1976). Transfer RNA: Molecular structure, sequence and properties. In *Ann. Rev. Biochem.* (Ed. E.E. Snell; P.D. Boyer; A. Meister e C.C. Richardson). *Ann. Rev. Inc.*, vol. 45, 805-860.
- Santi, D.V.; Danenberg, P.V. e Satterly, P. (1971). Phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetase from Escherichia coli. Reaction parameters and order of substrates addition. *Biochemistry*, 10, 4804-4812.
- Santi, D.V. e Peña, V.A. (1973). Tyrosyl transfer ribonucleic acid synthetase from E. coli B. Analysis of tyrosine and adenosine 5'-triphosphate binding sites. *J. Med. Chem.*, 16, 273-280.
- Santi, D.V. e Webster, R.W.J. (1975). The role of polyamines in the aminoacyl transfer ribonucleic acid synthetase reactions. Demonstration of the requirement for magnesium ion and a secondary stimulatory effect of spermine. *J. Biol. Chem.*, 250, 3874-3877.
- Sarantoglou, V.; Imbault, P. e Weil, J.H. (1980). The use of affinity elution from blue dextran sepharose by yeast tRNA^{Val} in the complete purification of the cytoplasmic valyl-tRNA synthetase from Euglena gracilis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 93, 134-140.

- Schimmel, P.R.* (1979). Understanding the recognition of transfer RNAs by aminoacyl transfer RNA synthetases. In *Advances in Enzymology* (Ed. A.Meister) John Wiley & Sons Inc., vol. 49, 187-222.
- Schimmel, P.R. e Soll, D. (1979). Aminoacyl-tRNA synthetases: General features and recognition of transfer RNAs. In *Ann.Rev.Biochem.* (Ed. E.E.Snell; P.D.Boyer; A.Meister e C.C.Richardson), *Ann.Rev.Inc.*, vol. 48, 601-648.
- Soll, D. e Schimmel, P.R. (1974). Aminoacyl-tRNA synthetases. In *The Enzymes* (Ed.P.D.Boyer) Acad.Press, N.Y., London, vol.X, 489-538.
- Taga, E.M. (1974). Treonil-tRNA sintetase do fígado bovino: purificação e estudo de algumas propriedades. Tese de Mestrado. USP.
- Takeda, Y. e Ohnishi, T. (1975). Aminoacyl transfer RNA formation. V. Effect of ethylenediaminetetraacetate on isoleucyl transfer RNA formation stimulated by either spermine or Mg^{2+} . *J.Biol.Chem.*, 250, 3878-3882.
- Vesterberg, O. (1972). Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta*, 257, 11-19.
- Willick, G.E. e Kay, C.M. (1976). Circular dichroism study of the interaction of glutamyl-tRNA synthetase with tRNA^{Glu}. *Biochemistry*, 15, 4347-4352.
- Winter, G.P. e Hartley, B.S. (1977). The amino acid sequence of tryptophanyl tRNA synthetase from Bacillus stearothermophilus. *FEBS lett.*, 80, 340-342.
- Yamada, H. (1978). Effects of adenosine triphosphate and magnesium chloride on affinity elution of aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthetases from phosphocellulose with transfer ribonucleic acids. *J.Biochem.*, 83, 1577-1581.

- Yamada, H. (1978). Rapid purification of threonyl-tRNA synthetase from Saccharomyces carlsbergensis by affinity elution from phosphocellulose. J.Biochem., 83, 1583-1589.
- Zelwer, C.; Risler, J.L. e Monteilhet, C. (1976). A Low-resolution model of crystalline methionyl-transfer RNA synthetase from Escherichia coli. J.Mol.Biol., 102 , 93-101.