

RIGOBELLO



MARILDA RIGOBELLO *mt*

Este exemplar corresponde a *mt* edição final da  
tese defendida pela candidata Marilda Rigobello e aprovada  
pela Comissão Julgadora.

*Hiroshi Aoyama*  
29/4/91

# TREONIL-TRNA SINTETASE DE GERMEN DE TRIGO PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES CINÉTICAS

*impl.*

Orientador: PROF. DR. HIROSHI AOYAMA *mt*

*t*

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

17104659

R449t  
13931/BC

CAMPINAS - 1991

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

# DEDICATÓRIA

*Ao Jorge, Mariana e Gabriela*

*Aos meus pais e irmãos.*

## *AGRADECIMENTOS*

Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama pela paciência e também pelo esforço em proporcionar condições para a realização deste trabalho.

À dona Jéida, pela presença agradável e pela manutenção do laboratório.

Ao Prof. Dr. Nelson Duran pelas críticas e sugestões valiosas.

Ao meu irmão Marcelo pela companhia em algumas noites de trabalho.

As pessoas que contribuíram indiretamente para a realização desta tese.

À CAPES E UNICAMP pelas bolsas concedidas.

CONTEÚDO	Páginas
1. Introdução	01
a) Histórico	02
b) Purificação	02
c) Estrutura das ARS	03
d) O Reconhecimento do tRNA	08
e) Mecanismo de Reação	10
f) Outras funções das ARS	11
g) Complexos Multienzimáticos	12
h) Regulação da Biossíntese das ARS	13
i) Objetivos da tese	14
2. Material e Métodos	
Material	16
Métodos	
a) Preparação do carvão ativo	19
b) Preparação de Pirofosfeto radioativo	19
c) Ativação da DEAE - celulose	20
d) Ativação da Fosfocelulose	21
e) Preparação da hidroxiapatita	21
f) Purificação da enzima	22
1 - Extração	22
2 - Cromatografia em DEAE - celulose	23
3 - Cromatografia em Fosfocelulose	23
4 - Cromatografia em Hidroxiapatita	24

5 - Cromatografia em Blue Sepharose CL6B	25
g) Determinação de atividade enzimática	
1 - Método de intercâmbio isotópico ATP-PPi	25
2 - Método de aminoacilação do tRNA	26
h) Determinação da concentração de proteínas	27

### 3. Resultados

a - Purificação enzimática	27
b - Determinação de parâmetros cinéticos	36
1 - Determinação da velocidade de reação em função da variação da concentração da enzima	36
2 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação do tempo de reação	36
3 - Determinação da influência do pH na velocidade da reação enzimática	38
4 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da concentração de treonina	38
5 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação da concentração de ATP	38
6 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação da concentração de pirofosfato	43
7 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação de concentração de magnésio	43
8 - Influência de íons cálcio na reação enzimática	43
9 - Influência de íons zinco na reação enzimática	46
10 - Influência de íons potássio na reação enzimática	47

11 - Influência de análogos de ATP: ab metileno ATP e gb...	
metileno ATP	48
12 - Capacidade aminoaciladora da enzima	49
4. Discussão	
a - Purificação	50
b - Propriedades cinéticas	53
5. Referências	59
6. Resumo	71
7. Summary	72

## ABREVIATURAS USADAS

- ARS - Aminoacil-tRNA sintetases
- tRNA - Acido ribonucleico transportador
- mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
- rRNA - Ácido ribonucleico ribossomal
- DNA - Ácido desóxirribonucleico
- ATP - Adenosina trifosfato
- ADP - Adenosina Difosfato
- AMP - Adenosina monofosfato
- KM - Constante de Michaelis
- DEAE - Dietilaminoetil
- $Ap_4A$  -  $P^1P^4$  di(Adenosina 5') tetrafosfato
- Pi - Fosfato inorgânico
- PPi - Pirofosfato inorgânico
- GSH - Glutathiona reduzida
- PMSF - Fluoreto de Metil sulfonila
- Tris - tris (hidroximetil aminometano)
- PP0 - 2,5- difenil oxazol
- POP0P - 1,4 - bis - (2(4 metil - 5 fenil oxazolil) benzeno
- Ac - Acetato
- a.e - atividade específica
- V - Velocidade de reação enzimática
- U - Unidade de atividade enzimática

## INTRODUÇÃO

As aminoacil-tRNA sintetases [E.C. 6.1.1.3] são enzimas que catalisam a reação da aminoacilação, com a formação do aminoacil-tRNA, que é o primeiro passo da síntese de proteínas (Schimmel 1979). Estas enzimas, largamente distribuídas em todos os organismos, estão envolvidas com as regras do código genético que dirigem os passos essenciais da manutenção da hereditariedade das moléculas biológicas.

A reação catalisada pelas ARS pode ocorrer em duas etapas; envolve tres substratos e promove a formação de três produtos, tendo a participação do íon magnésio como estabilizador dos grupos fosfato carregados negativamente.

Na primeira etapa o aminoácido mais uma molécula de ATP reagem produzindo um composto intermediário, o aminoaciladenilato, sendo liberada uma molécula de pirofosfato. O aminoaciladenilato é uma molécula altamente energética e esta energia é utilizada para, juntamente com o tRNA específico para o aminoácido em questão, formar o aminoacil tRNA, na segunda etapa da reação. Uma molécula de AMP é então liberada.

O tRNA é chamado de adaptador molecular porque pelo pareamento de seu anticódon, reconhece os códons do mRNA, possibilitando a correta formação da cadeia polipeptídica. Se a especificidade intermolecular das reações envolvidas em todo este processo não fosse tão alta, estariam sendo introduzidos erros na proteína em formação.

## **a) Histórico**

As ARS de mamíferos foram descobertas em 1955 (Hoagland) e de bactérias em 1956 (Berg).

Anteriormente haviam sido feitos estudos sobre a incorporação de alanina radioativa a proteínas em frações fígado de rato (Sickevitz, 1951). Paralelamente estava sendo relacionado o efeito do ATP na incorporação de aminoácidos a proteínas (Zamecnik e Keller, 1954) e também estava sendo estudada a relação entre tRNA e síntese de proteínas (Littlefield e Keller, 1955).

Em plantas as ARS foram detectadas inicialmente em microsomas de ervilhas (Webster 1957) e em folhas de espinafre (Clark, 1958).

## **b) Purificação**

A purificação das ARS emprega usualmente processos como fracionamento celular, precipitação diferencial de proteínas com sulfato de amônio, cromatografias de troca iônica como DEAE-celulose e Fosfocelulose e de adsorção como o gel de hidroxiapatita. A filtração em gel, principalmente Sephadex é usada geralmente para retirada do sulfato de amônio utilizado na precipitação diferencial de proteínas.

O grau de homogeneidade obtido na purificação das ARS é diferente em cada caso. Além dos métodos citados acima, podem ser empregadas as cromatografias em afinidade, onde a enzima é eluída com substratos da reação. A cromatografia em afinidade mais utilizada para as ARS emprega Sepharose ligada ao tRNA ou ligada

ao Cibacron Blue. (Moe e Piszkievics, 1976).

Atualmente, com as técnicas de clonagem do gen específico para a enzima pode haver uma amplificação da quantidade de enzima existente em determinada célula. O rendimento da purificação é bem maior nestes casos.

### c) Estrutura das Aminoacil tRNA Sintetases

Independente da reação comum catalisada pelas ARS, há muito pouco em termos estruturais que justifique o fato destas enzimas estarem colocadas em uma única classe. Uma característica interessante desta classe é seu polimorfismo de tamanho. A heterogeneidade é relativa tanto aos pesos moleculares, que variam desde 58000 até 380.000, quanto à estrutura quaternária.

Existem quatro tipos de estrutura quaternária:  $\alpha$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_4$  e  $\alpha_2\beta_2$ .

Entre as enzimas monoméricas - do tipo  $\alpha$  - são encontradas a arginil-, a glutamil-, a glutaminil-, isoleucil-, leucil- e valil-tRNA sintetases, sendo que as três primeiras têm peso molecular menor que 75000 e as demais tem peso molecular por volta de 100.000.

A maioria das ARS é dimérica (do tipo  $\alpha_2$ ), sendo que o peso molecular de cada monômero pode variar desde 35000 até 100.000. Entre estes situam-se a aspartil -, asparaginil -, histidil -, lisil -, metionil -, prolil -, seril -, treonil -, triptofanil - e tirosil - tRNA sintetases.

A glicil- e fenilalanil - tRNA sintetases são do tipo  $\alpha_2\beta_2$  e a alanil - tRNA sintetase é do tipo  $\alpha_4$ . Seus pesos moleculares

situam-se entre 200.000 e 380.000 Estes dados podem ser verificados no trabalho de revisao realizado por (Schimmel 1987).

É conhecido que tanto a estrutura quaternária quanto o pêso molecular de uma enzima que corresponde a determinado aminoácido são conservados através de diversos organismos durante a evolução.

Foram localizadas repetições de determinadas sequencias de aminoácidos em enzimas que apresentam cadeias polipeptidicas maiores tais como a Isoleucil tRNA sintetase de E. coli que é um monômero de peso molecular igual a 105.000. (Baldwin, 1966)

Sabe-se também que há homologias de sequências de aminoácidos entre enzimas correspondentes a um mesmo aminoácido mas provenientes de fontes diferentes, como é o caso da treonil-tRNA sintetase mitocondrial de S. cerevisiae e a treonil-tRNA sintetase de E. coli que apresentam 36% de homologia entre as sequências repetidas nas mesmas enzimas (Hirsch e col., 1968; von der Haar, 1976).

Do ponto de vista genético, estes fatos podem ser explicados através de mecanismos para gerar diversidade tais como duplicações parciais ou totais de genes, seguidos por divergência das sequências duplicadas. Mas, o fato da estrutura quaternária e do peso molecular haverem sido preservados ao longo da evolução para uma mesma enzima específica de determinado aminoácido torna dificil a explicação das repetições de sequências internas do ponto de vista evolutivo.

A homologia existente entre sequências repetidas internamente em enzimas específicas para o mesmo aminoácido às

vezes não é muito forte. As diferenças podem ser devidas à especificidade no reconhecimento do tRNA que é diferente nas diversas fontes de cada enzima (Schimmel, 1979, 1989).

A glutaminil - tRNA sintetase de citoplasma de levedura (Lee e col, 1967) é maior que a mesma enzima de E. coli (Powers e col, 1978), havendo uma diferença de 309 aminoácidos na porção terminal. A diferença de tamanho entre sintetases específicas para um mesmo aminoácido pode estar indicando que existem sequências que não estão associadas com a função aminoaciladora da enzima.

Através da manipulação de genes que codificam para as ARS são feitos estudos sobre sua organização funcional.

Em relação à alanil-tRNA sintetase de E. coli foram feitas 18 deleções parciais no gene que a codifica para observar que pelos resultados obtidos do ponto de vista catalítico, esta enzima tem 875 aminoácidos. A remoção de 490 aminoácidos da porção carboxi terminal resulta em uma proteína monomérica, estável e que apresenta síntese do aminoaciladenilato, mostrando que esta síntese não depende da formação de tetrâmeros e que cada um dos peptídeos em separado apresenta esta atividade. Deste modo pode ser notado também que a síntese do aminoacil adenilato está posicionada na direção da porção amino terminal de proteína (Schimmel, 1987).

A atividade aminoaciladora também foi estudada por meio da técnica de deleção de genes. Esta atividade está localizada entre o aminoácido 385 e 468 para a alanil-tRNA sintetase. A atividade aminoaciladora ocorre mesmo sem a formação de tetrâmeros, embora

deste modo ocorra diminuição da mesma. Sequências importantes para a formação do tetrâmero foram localizadas entre os aminoácidos 699 e 808. A formação de tetrâmeros não requer o domínio catalítico funcional (Putney e col, 1981). Estes dados permitiram a construção de um modelo hipotético para o funcionamento catalítico da enzima. Este modelo compreende uma porção da cadeia polipeptídica denominada enzima central à qual partes dispensáveis à catálise, mas que têm outras funções poderiam ser adicionadas. A enzima central seria então, constituída de unidades funcionais ao longo da cadeia polipeptídica tal que a síntese do aminoaciladenilato seja feita por sequencias localizadas perto da porção amino terminal da molécula e o reconhecimento do tRNA é feito por estas sequências e por aquelas localizadas adiante destas na direção da porção carboxi terminal (Schimmel, 1983).

A tirosil-tRNA sintetase de B. stearothermophilus foi estudada do ponto de vista estrutura-catálise. É constituída de um dímero de duas subunidades de peso molecular 37000 que ligam apenas um mol de tirosina e um mol de tRNA e formam rapidamente um mol de tirosiladenilato. Graças ao fato da enzima ser termoestável, sua purificação e clonagem foram facilitadas. Foram obtidos inclusive cristais analisados por difração de raios X.

As ligações complementares entre o tirosiladenilato e o sítio ativo da enzima foram estabelecidos com base em pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos de aminoácidos do sítio ativo e porções com alguma densidade de carga elétrica do substrato. Os resíduos do sítio ativo que se ligam com a cadeia

lateral da tirosina através de pontes de hidrogênio e também os resíduos que se ligam à ribose do AMP foram estabelecidos, reforçando a idéia mostrada anteriormente segundo a qual a síntese do adenilato está situada na porção inicial da cadeia polipeptídica. Um mecanismo químico foi proposto para a ativação de tirosina. Este mecanismo envolve o ataque do íon carboxilato da tirosina - que atua como nucleófilo - ao grupo  $\alpha$  fosforil do ATP, para gerar um intermediário pentacoordenado que elimina pirofosfato de magnésio, que funciona como grupo de saída. (Fersht, 1987)

Para a tirosil tRNA sintetase de *B. stearothermophilus* e para a metionil-tRNA sintetase de *E. coli* (Zelwer, 1976) foram obtidos dados cristalográficos evidenciando a presença da dobra do nucleotídeo. (Rossman e col., 1974) Esta estrutura, composta por pregas  $\beta$  e  $\alpha$  hélices associadas, começa perto da porção amino terminal da molécula e se estende por 200 aminoácidos. Esta porção estrutural é útil na purificação de proteínas ao ser utilizada a cromatografia de afinidade Blue Sepharose CL 6B devido à afinidade que o grupo cromóforo desta resina tem possivelmente pela dobra do nucleotídeo. (Thompson e col., 1975)

Outra característica importante relacionada com a porção catalítica da enzima e a dobra do nucleotídeo é a sequência de sinalização. Esta sequência aparece em várias ARS e situa-se perto da porção amino terminal.

A sequência é composta por histidina, isoleucina, glicina e histidina (HIGH) para a tirosil-tRNA sintetase de *E. coli* e de *B.*

stearothermophilus e isoleucil - e glutaminil - tRNA sintetases de E. coli.

Outras sintetases possuem a sequência HIGN, onde a histidina do final da sequência está substituída por asparagina. Pode também ocorrer a substituição da histidina inicial por treonina, as quais (cum ou outro) podem estar sendo responsáveis pela fixação do grupo  $\gamma$  fosforil do ATP no estado de transição (Schimmel, 1987).

Quanto à estrutura terciária foi demonstrado que as subunidades da tirosil-tRNA sintetase de B. stearothermophilus e a aspartil-tRNA sintetase têm forma elipsoidal. Os dados foram obtidos por cristalografia de raios X sendo que as subunidades são associadas de maneira simétrica. (Irwin e col, 1976, Dietrich e col, 1980).

O significado da estrutura quaternária  $\alpha_2\beta_2$  não está claro ainda. Para a glicil-tRNA sintetase nenhuma subunidade sózinha tem atividade. Misturando-se ambas as subunidades é obtida tanto a aminoacilação quanto a síntese do adenilato, sendo que a cadeia  $\beta$  isoladamente liga o tRNA. O sítio ativo, neste caso, pode ter sido criado pela interface das subunidades em uma junção das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Esta junção promove mudanças conformacionais e faz com que os domínios funcionais fiquem perto uns dos outros, gerando a atividade catalítica completa. (Schimmel, 1987).

#### d) O reconhecimento do tRNA

O reconhecimento do tRNA pela enzima é um dos fatores mais explorados através de métodos como difração de raios X,

comparação de sequências, modificações químicas, mutações sítio dirigidas, digestão de tRNAs livres ou complexados a sintetases (Schimmel, 1979, 1989).

O fato dos tRNAs apresentarem estruturas tridimensionais muito parecidas, com diferenças muito pequenas em tamanho torna complicado o trabalho de dedução dos sítios necessários para o reconhecimento do tRNA pela enzima.

Comparando-se dois sistemas de reconhecimento inter-moleculares como DNA-proteínas gene-regulatórias e tRNA-ARS podem ser notadas diferenças interessantes. Para complexos tRNA-ARS as constantes de dissociação são da ordem de  $10^{-6}$  M, em pH 7,5 (Schimmel, 1979) enquanto que para DNA-proteínas gene-regulatórias estas constantes situam-se em  $10^{-12}$  M. O rápido "turn-over" de que a enzima necessita explica o tempo de vida curto do complexo enzima-tRNA, mas limita o grau de discriminação que deve ser obtido na etapa de ligação.

Esta discriminação é conseguida na segunda etapa da ligação do tRNA à enzima no estado de transição da aminoacilação (Fasiolo e col, 1981, Beresten e col, 1983).

Uma única ARS reconhece todos os tRNA isoceptores existentes para cada aminoácido. A existência dos tRNA isoceptores é devida à degenerescência do código genético onde cerca de seis sequências trinucleotídeos podem codificar para um mesmo aminoácido. Isto mostra que o anticódon não é fundamental para a especificidade de reconhecimento enzima-tRNA (Schulman, 1985).

Recentemente foram obtidos dados sobre a interação do tRNA específico para a alanina de *E. coli* com a sintetase correspondente mostrando que o terminal 3' deste tRNA liga-se ao domínio da síntese do adenilato na enzima. Este domínio está situado nos primeiros 368 aminoácidos da enzima sendo que a Lisina 78 é o principal sítio da ligação (Hill e col., 1989).

Oligômeros de DNA correspondentes ao tRNA específico para fenilalanina e tRNA específico para lisina foram sintetizados com as desoxirriboses e as conclusões obtidas levam a crer que a ribose não é fundamental para a aminoacilação do tRNA (Khan e col., 1988).

#### e) Mecanismo de Reação

A cinética de reação das ARS pode ocorrer de várias maneiras.

A treonil-tRNA sintetase de fígado de rato apresenta um mecanismo ordenado do tipo Bi Uni Uni Bi Ping Pong (Cleland 1967). A reação de aminoacilação ocorre em duas etapas com a formação do treonil adenilato na primeira etapa. Este intermediário está ligado à enzima. A enzima sozinha, liga-se ao ATP na presença de íons magnésio e a ligação da Treonina só ocorre depois que a mesma estiver ligada ao ATP. A presença do tRNA decresce a afinidade da enzima pelo ATP (Allende e col., 1969).

A arginil-tRNA sintetase de *Neurospora crassa* (Nazario e col., 1974) mostra um mecanismo sequencial ordenado diferente onde o tRNA entra inicialmente no sítio ativo da enzima seguido pela

arginina e depois pelo ATP. O pirofosfato e o AMP podem sair ao acaso e o arginil-tRNA é o último a sair da enzima.

A arginil-, glutamil- e glutaminil-tRNA sintetases não formam o aminoaciladenilato como composto intermediário. A reação de aminoacilação ocorre somente em um passo e este mecanismo é chamado de concomitante porque os três substratos entram no sítio ativo da enzima simultaneamente (Loftfield, 1972).

A reação de intercâmbio ATP-PPi catalizada pela maioria das ARS não é afetada pela presença de seus tRNAs enquanto que outras são absolutamente dependentes de sua presença. A glicil-tRNA sintetase tem a velocidade de intercâmbio ATP-PPi aumentada duas a três vezes quando o tRNA se liga à enzima (Ostrem e col, 1974).

#### f) Outras funções das Aminoacil tRNA sintetases

Na presença da enzima, ATP mais AMP formam o Ap<sub>4</sub>A, que consiste de dois nucleosídeos de adenina unidos por uma sequência de quatro grupamentos fosfato (Randerath e col, 1966). O nível de Ap<sub>4</sub>A dobra quando as células de mamíferos passam do estado de repouso para o estado proliferativo (Zamecnik e col, 1982).

A triptofanil-tRNA sintetase já foi encontrada associada à DNA polimerase  $\alpha$  de germen de trigo nas etapas iniciais de purificação. A triptofanil-tRNA sintetase estimula a atividade da DNA polimerase  $\alpha$  neste caso e o Ap<sub>4</sub>A é produzido neste sistema.

Estes dados sugerem uma correlação entre o processo de síntese de proteínas e a duplicação do DNA (Castroviejo e col, 1982).

É conhecido também o fato do Ap<sub>4</sub>A complexar íons Zn<sup>2+</sup>, que são essenciais para a atividade de sintetases classificadas como metaloenzimas, como a triptofanil-tRNA sintetase bovina. Na ausência de Zn<sup>2+</sup> esta enzima não produz triptofaniladenilato mas passa a hidrolisar ATP a ADP e Pi, sendo que o GTP também serve como substrato para esta reação. Quando a enzima é reincubada com zinco a atividade catalítica é restaurada. (Kovaleva e col, 1989).

Esta mesma enzima forma um complexo ternário com a enzima gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase e o RNA ribossomal. Sabe-se que a triptofanil-tRNA sintetase não é encontrada em complexos multienzimáticos com outras ARS e também não se liga ao RNA ribossomal. Pode-se atribuir então um papel adaptador à gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase para auxiliar na compartimentalização da triptofanil-tRNA sintetase aos polirribossomos (Filomenko e col, 1989).

#### g) Complexos Multienzimáticos

As ARS de germen de trigo já foram encontradas como complexos multi enzimáticos contendo arginil -, leucil -, metionil - e fenilanyl- tRNA sintetases (Quintard e col, 1978).

Os complexos de ARS são geralmente encontrados com outros elementos do aparelho de tradução como tRNA, fatores de alongação, ou mesmo lipídeos. Como as ARS apresentam em sua estrutura regiões altamente carregadas e domínios hidrofóbicos, podem ser propostos modelos onde estas regiões sirvam para formar complexos multienzimáticos e os domínios hidrofóbicos atuem ligando os complexos às membranas do retículo endoplasmático

(Srere, 1987).

Recentemente foram encontrados 9 ARS associadas em um complexo de células de eritroleucemia murina (Norcum, 1989).

Em fígado de coelho foi detectado um complexo contendo várias sintetases. Na presença deste complexo a caseína foi fosforilada, encontrando-se então uma atividade de caseína quinase I no complexo.

As ARS encontradas neste complexo também são fosforiladas por esta caseína quinase, o que diminui a atividade catalítica das enzimas, ressaltando o processo de fosforilação como regulador de mecanismos celulares (Eliazarov e col, 1989).

#### **h) Regulação da Biossíntese das ARS**

A alanil-tRNA sintetase liga-se a uma sequência específica do DNA e regula a transcrição do gene que a codifica. (Putney e col, 1981). Neste sentido, as sequências adicionais à porção catalítica da enzima podem estar implicadas nos processos de controle.

No caso da treonil-tRNA sintetase a regulação de sua biossíntese é feita por um mecanismo no qual uma parte da enzima liga-se ao mRNA e a tradução é inibida. As sequências do mRNA que são ligadas à enzima têm homologia com tRNA específico para a treonina (Springer e col, 1985).

A literatura relativa às ARS é extensa. Inicialmente as ARS foram estudadas principalmente do ponto de vista da cinética e dos mecanismos da reação. Com as técnicas de clonagem molecular, estudos mais aprofundados sobre a estrutura da enzima tem

surgido.

Outros autores têm localizado as ARS no contexto de situações alteradas do meio celular como neoplasias (Dang e col, 1986) e retroviroses (Sallafranque e col, 1989), pela influência da enzima ou pela influência que seu tRNA exerce no desenvolvimento destas patologias.

Ultimamente, com a descoberta da capacidade autocatalítica do RNA, propõe-se também uma atividade autoaminoaciladora para os tRNA primitivos, onde os mesmos poderiam eles próprios, promover a ligação do aminoácido ao seu terminal acceptor. Foi proposto também o surgimento do mRNA primitivo a partir da estrutura deste tRNA (Möller e col, 1990). A partir destas idéias, supõe-se que as ARS surgiram mais tardiamente na evolução da vida na terra.

#### 1) Objetivos da Tese

O objetivo da tese foi centrado principalmente no trabalho de purificação da treonil tRNA sintetase de germen de trigo e também na obtenção de alguns dados sobre a cinética da reação catalisada por esta enzima.

Muitas ARS de germen de trigo já foram purificadas.

Em 1963, partindo do germen de trigo foi obtida uma valil-tRNA sintetase purificada cerca de 300 vezes (Moustafa e Lyttleton).

Outras ARS de germen de trigo têm sido purificadas desde então, como a metionil tRNA sintetase que foi purificada tanto proveniente do citoplasma quanto do cloroplasto.

Também foram purificadas a fenilalanil-tRNA sintetase (Carias e Julien, 1976), a glutamil-tRNA sintetase que foi isolada de mais de um compartimento celular apresentando diferentes formas (Ratinaud e Thomas, 1983) e a leucil - e arginil-tRNA sintetases que também foram estudadas sob efeito de soluções contendo ribossomos (Carias e Mouricot, 1978).

Mais recentemente foi obtida a tirosil-tRNA sintetase de germen de trigo, purificada cerca de 5000 vezes, utilizando cromatografia de afinidade (Quivy e Chroboczek, 1987).

Nesta tese foi obtida uma enzima purificada cerca de 180 vezes utilizando cromatografias como DEAE-celulose, fosfocelulose e Blue Sepharose CL 6B. Foram obtidos também alguns dados sobre a cinética da reação relacionados à influência da concentração de substratos, alguns cátions, pH, tempo, e análogos de ATP, na velocidade da reação.

Foi também testada a capacidade aminoaciladora da enzima. Estes dados foram comparados com dados obtidos no mesmo laboratório, porém com treonil-tRNA sintetases de mamíferos como fígado de rato (Aoyama, 1974) e fígado bovino (Barbosa, 1981).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Material

- DEAE - celulose, Fosfocelulose, Germen de Trigo, ATP e seus análogos, tRNA de Germen de Trigo e Treonina são de procedência da Sigma Chemical Company (USA).
- Carvão ativo e a resina Dowex 1ag 1x8 (Cl<sup>-</sup>) são de procedencia Merck.
- Blue Sepharose CL 6B foi de procedência da Pharmacia.
- ( <sup>14</sup>C ) L Treonina foi adquirida de Shwartz/Mann (USA)
- ( <sup>32</sup>p ) Fosfato de sódio foi obtido da CNEN (São Paulo)
- POPOP e PPO foram obtidos da Beckman
- Papel de filtro 3MM foi obtido da Whatmann Biochemicals
- Filtros de nitrocelulose (HAWP) porosidade 0,45 m foram obtidos da Millipore Filter Corporation (USA)
- Os demais reagentes utilizados são de pureza analítica

## TAMPÕES UTILIZADOS

### Tampão A

Tris-HCl	0,05 M	pH 7,5
KCl	0,06 M	
Mg Cl	0,01 M	
GSH	0,001 M	
PMSF	0,001 M	

### Tampão B

Tris-HCl	0,05 M	pH 7,5
$\beta$ mercaptoetanol	0,005 M	
Mg Cl <sub>2</sub>	0,01 M	

### Tampão C

K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,01 M	pH 7,2
Mg Cl <sub>2</sub>	0,007 M	
$\beta$ mercaptoetanol	0,005 M	

### Tampão D

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,005 M	pH 7,0
$\beta$ mercaptoetanol	0,01 M	

### Tampão E

ídem tampão D contendo NaCl 0,025 M

Tampão F

Ídem tampão D contendo acetato de magnésio 0,005 M

Tampão G

Ídem tampão F contendo ATP 0,004 M

#### APARELHAGEM

Espectrofotômetro Zeiss PMQ II

pHmetro Ambriex

Coletor de frações Incibrás

Contador de Cintilação Líquida Beckman LS100C

Centrífuga Refrigerada Internacional IEC

Ultracentrífuga Beckman LS 65

## MÉTODOS

### A) - PREPARAÇÃO DO CARVÃO ATIVO

O método utilizado foi uma modificação do método descrito por Kornberg e Stadtman (1957).

HCl 6N foi adicionado ao carvão na proporção de 10ml/g de carvão.

A mistura foi agitada com bastão de vidro e deixada sedimentar. Após duas horas foi retirado o sobrenadante ácido.

O carvão foi ressuspensão em água destilada, deixado sedimentar e a água sobrenadante foi desprezada. Este procedimento foi repetido até que a água sobrenadante não contivesse mais acidez.

Foi preparada uma solução contendo 30g de carvão em 100ml de água.

O carvão deve ser padronizado em relação à sua capacidade de adsorver ATP e para isso uma solução de ATP de concentração conhecida foi adicionada ao carvão ativo. A mistura foi agitada, centrifugada e a concentração de ATP do sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente em 260 nm. A solução de carvão foi adicionada até que no sobrenadante não fosse mais observado ATP. Desta maneira foi possível determinar qual a quantidade de ATP suficiente para absorção de ATP contido no ensaio enzimático.

### B) - PREPARAÇÃO DO PIROFOSFATO RADIOATIVO

Foi empregado o método descrito por Bergman (1962).

A 1ml de ( $^{32}\text{P}$ ) fosfato dibásico de sódio (1 a 3 mCi) são

adicionados 30  $\mu$  moles de fosfato dibásico de sódio como carregador. Esta mistura foi colocada para evaporar em uma estufa a 70°C, durante uma noite em cadinho de porcelana. Este material foi então colocado em uma mufla a 400°C durante uma hora.

Após o resfriamento o material foi dissolvido em aproximadamente 15 ml de água. A solução obtida foi filtrada através de uma coluna de Dowex 1 (forma Cloreto)(6cm<sup>3</sup>) e lavada com 20 a 30 ml de água. A coluna foi depois lavada com H Cl 0,01 M contendo Li Cl 0,05 M e frações de 15 ml são coletadas. O fosfato inorgânico foi eluído nos três primeiros tubos e o pirofosfato foi eluído entre os tubos 14 e 28. Os tubos contendo o pirofosfato são recolhidos, sendo o pH acertado para 7,5 com hidróxido de sódio. Amostras de 20 ml foram guardados a -20°C.

### C) - ATIVAÇÃO DA DEAE-Celulose

A DEAE-celulose foi ativada de acordo com Peterson e Sober(1962). A resina foi tratada com hidróxido de sódio 1N e filtrada até que não houvesse mais coloração no filtrado.

A resina foi lavada com água destilada até que o pH estivesse próximo ao da água. Em seguida H Cl foi adicionado até que a suspensão estivesse fortemente ácida, a resina foi filtrada e lavada rapidamente até a eliminação total do ácido.

A resina foi então novamente ressuspensa com hidróxido de sódio, filtrada e lavada até a eliminação da alcalinidade, guardada a 5°C em presença de algumas gotas de n-butanol como conservante.

#### D) - ATIVAÇÃO DE FOSFOCELULOSE

A fosfoceleulose foi tratada da mesma maneira que a DEAE-celulose.

#### E) - PREPARAÇÃO DE HIDRÓXIAPATITA

A hidróxiapatita foi preparada de acordo com o método de Levin(1962).

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5M e  $\text{CaCl}_2$  0,5M foram gotejados através de dois funis de separação em um bequer de 5 litros, ao qual era adaptado um agitador mecânico com uma velocidade de 80 rpm; no bequer iniciou-se a formação de um precipitado. Assim que as soluções dos funis acabaria osobrenadante foi decantado com o auxílio de uma trompa de água. O precipitado foi então lavado quatro vezes com água destilada.

Em cada lavagem foram empregados 3 litros de água que foram eliminados após a completa deposição do precipitado.

A seguir, mais três litros de água e 100 ml de NaOH 0,5N foram adicionados sob agitação e aquecimento suave, durante uma hora. O fosfato de cálcio então formado foi deixado decantar e o sobrenadante foi retirado. Lavou-se com água destilada novamente, como descrito acima por três vezes. Após este procedimento, tampão fosfato 0,01M pH 6,8 (3 a 4l) foi adicionado com aquecimento e agitação até o início da ebulição. O precipitado foi deixado sedimentar e o sobrenadante foi retirado. Esta operação foirepetida mais duas vezes com o tampão 0,01M e duas vezes com tampão 0,001M durante 15 minutos cada vez. A hidróxiapatita então obtida foiarmazenada em tampão fosfato 0,001M pH 6,8 a 5°C, contendo algumas gotas de clorofórmio como conservante.

## F) - PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

### 1. Extração:

O Germen de trigo foi macerado em almofariz, a 4°C, com quatro porções de tampão A para uma porção de Germen e filtrado em gaze. O filtrado foi centrifugado a 12000xg durante 10 minutos a 4°C para eliminação de núcleos, restos celulares e mitocôndrias.

Todas as etapas que se seguem foram realizadas a 4°C.

O sobrenadante obtido foi submetido a uma centrifugação a 105.000xg durante 60 minutos para eliminação da fração microsomal. O sobrenadante resultante desta centrifugação (fração 1) foi submetido à saturação com sulfato de amônio entre 20 e 70% da seguinte maneira: o sobrenadante foi colocado em um bequer e foi iniciada a adição de sulfato de amônio sólido, sob agitação, até que fosse obtida uma solução 20% saturada. Duas horas após o início da adição do sulfato de amônio o extrato foi submetido a uma centrifugação a 12000xg durante 10 minutos. O precipitado obtido a partir desta centrifugação foi desprezado e ao sobrenadante foi adicionado, sob agitação, sulfato de amônio até que se obtivesse 70% de saturação. Duas horas após o início da adição do sulfato de amônio, o extrato foi centrifugado a 12000xg durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso no menor volume de tampão B (fração 2).

## 2. Cromatografia em DEAE-Celulose

A fração 2 foi colocada para dialisar em tampão B durante uma noite. Quando não havia mais sulfato de amônio (teste com solução de Bário em meio ácido) a fração foi aplicada em uma coluna de DEAE-Celulose(5x25cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. Após a aplicação do material a coluna foi lavada com tampão B até que a absorvância em 280 nm estivesse inferior a 0,1. A enzima foi eluída através da aplicação de um gradiente contínuo de K Cl entre 0 e 0,5M em tampão B, com volume final de 1000 ml. Nas frações coletadas, a atividade enzimática e a concentração de proteínas ( $A_{280}$ ) foram determinadas. As frações que apresentam atividade enzimática foram reunidas e precipitadas com sulfato de amônio até 70% de saturação.

O precipitado obtido foi dissolvido no menor volume de tampão C. (fração 3).

## 3. Cromatografia em Fosfocelulose

A fração 3 foi dialisada em tampão C e foi então aplicada em coluna de fosfocelulose(3x12cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi então lavada com tampão C até que a absorvância em 280 nm estivesse inferior 0,1.

Um gradiente contínuo de K Cl entre 0 e 0,5M em tampão C com volume final de 300 ml foi aplicado na coluna para eluição da enzima.

Foram coletadas frações de 15ml e a atividade enzimática e a absorvância a 280 nm foram determinadas. As frações que

apresentaram atividade enzimática foram reunidas e precipitadas com sulfato de amônio a 70% de saturação. O precipitado foi dissolvido em tampão C (fração 4).

#### 4. Cromatografia em hidroxiapatita:

A fração 4 foi dialisada em tampão C e colocada em um bequer contendo 50 ml de hidroxiapatita que foi deixado sob agitação em banho de gelo durante 30 minutos. A hidroxiapatita foi então centrifugada a 10.000xg durante 10 minutos.

A atividade enzimática de sobrenadante foi determinada; não existindo mais atividade enzimática significa que toda a enzima contida na fração 4 foi adsorvida pela hidroxiapatita. Se acaso ainda existisse atividade, mais hidroxiapatita deveria ser adicionada e o processo de agitação e centrifugação foi repetido. Para eluição da enzima, ao precipitado obtido foi adicionado, em etapas, tampão fosfato de sódio pH 7,5 contendo  $\beta$  mercaptoetanol 0,005M e acetato de magnésio 0,007M em concentrações crescentes. Entre 0,1M e 0,3M.

O precipitado de hidroxiapatita contendo atividade enzimática foi ressuspense no tampão, deixado sob agitação por 30 minutos e centrifugado a 12000xg por 10 minutos.

Esta operação foi repetida para as diferentes concentrações do tampão. A atividade enzimática e a absorbância em 280 nm foram determinadas nos sobrenadantes de cada tratamento.

As frações com atividade enzimática foram reunidas e submetidas à precipitação com sulfato de amônio a 70% de saturação. O precipitado obtido foi ressuspense em tampão C

contendo 20% de glicerol e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (fração 5)

## 5. Cromatografia em Blue Sepharose CL 6B

A fração 4 obtida a partir da cromatografia em fosfocelulose foi dialisada em tampão D e aplicada em uma coluna de Blue Sepharose CL 6B que foi previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi então lavada com os tampões E, F, G e D nesta ordem. Foi aplicado então, um gradiente contínuo de ATP entre 0 e 20 mM em tampão D, com volume final de 20 ml. Foram coletadas frações de 2 ml cada onde foi determinada a atividade enzimática. As frações que apresentava atividade foram reunidas e submetidas a precipitação com sulfato de amônio. O precipitado obtido foi ressuspensão em tampão D contendo glicerol 20% e acetato de magnésio suficiente para que a solução resultando-se em 0,005M neste sal. Foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . (fração 6)

## G - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 1. Método de Intercâmbio Isotópico ATP-Pirofosfato

Este método descrito por acordo com Papas e Mehler (1970) foi utilizado para determinação de atividade enzimática durante a purificação e também nos experimentos feitos com finalidade de determinação dos parâmetros cinéticos da enzima.

O meio de reação para um volume final de 1ml continha  
Tris/HCl pH 7,5 0,01M;  $\text{Mg}(\text{Ac})_2$  0,015M; ATP 0,002M.  
L-Treonina 0,01M e  $(^{32}\text{P}) \text{Na}_4 \text{P}_2 \text{O}_7$  0,002M (30.000 cpm de radioatividade).

A reação foi iniciada pela adição de 0,2 ml de enzima. Após 10 minutos de incubação a 37°C a reação foi paralisada pela adição de 0,5 ml de ácido perclórico 7%.

Foram então adicionados 0,5 ml de carvão ativo 5% p/v e 1 ml de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,1M. A mistura foi agitada e filtrada sobre discos de papel Whatmann 3MM com ajuda de uma bomba de vácuo. O material retido nos filtros foi lavado com  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0,01M.

Os filtros foram então secos e sua radioatividade foi contada em um cintilador (Beckman, LS-100C). A atividade enzimática foi expressa em nmoles de ( $^{32}\text{P}$ ) pirofosfato incorporados ao ATP nas condições do ensaio.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para incorporar 1n mol de ( $^{32}\text{P}$ )PPi ao ATP.

A velocidade de reação enzimática (V) apresentada nas figuras expressa a quantidade de pirofosfato incorporada ao ATP nas condições da reação.

## 2. Método de aminoacilação do tRNA

Este método, de acordo com Allende e col (1970), foi utilizado para testar a capacidade aminoaciladora de enzima.

O meio de reação para um volume final de 30  $\mu\text{l}$  continha Tris pH 7,5 0,030M; KCl  $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ; MgCl 0,0025M; GSH 0,005M, ATP 0,0025M, 100mg de tRNA e ( $^{14}\text{C}$ ) Treonina  $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$  (160mC/mMol).

A reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu\text{l}$  de enzima. Após 15 minutos de incubação a 37°C a reação foi paralisada pela adição de 1ml de TCA 10% e filtrada em filtros de nitrocelulose.

Os filtros foram lavados com TCA 5%, secos e colocados em líquido de cintilação, ea radioatividade foi contada em um cintilador. A atividade da enzima foi expressa em n moles de (<sup>14</sup>C) treonina incorporada ao tRNA. Foram usados 226 µg de enzima nos ensaios.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a incorporação de 1 n mol de (<sup>14</sup>C) Treonina ao tRNA.

#### H - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a realização das tabelas de purificação foi usado o método de Warburg e Cristian(Layme, 1957). No caso da determinação de proteínas em amostras contendo ATP provenientes da cromatografia em Blue Sepharose CL 6 B foi usado o método de Lowry modificado por Hartree (1972).

### 3 - RESULTADOS

#### A. Purificação Enzimática

Foram realizados três tipos de purificação enzimática onde eram variadas as cromatografias utilizadas, na tentativa de obtenção de uma enzima o mais homogênea possível.

Nestes três tipos de purificação os procedimentos de extração da enzima não variavam exceto para a quantidade de germen de trigo utilizada.

Na primeira purificação foram utilizadas cromatografias em

DEAE-celulose e em hidroxiapatita sendo obtida uma enzima purificada cêrca de 20 vezes com rendimento de 14% (tabela 1)

TABELA DE PURIFICAÇÃO - I

Fração	Volume (mL)	Prot. Total (mg)	Unidades Totais	a.e U/mg	Purif.	Rend. (%)
Ext. Bruto 12000 g	130	12454	14300	1,14	1	100
1	115	7314	14950	2,04	1,85	104
2	100	4940	11500	2,30	2,09	80,4
3	45	714	3375	4,70	4,29	23,6
5	40	93,2	2000	21,4	19,5	13,9

com este material foi realizado um teste de especificidade para os 20 L aminoácidos (tabela 2).

TABELA 2

Teste de Especificidade Enzimática em Relação aos L-Aminoácidos na Reação de Intercâmbio ATP-PPi

Aminoácido	n moles de PPi incorporados	Aminoácido	n moles de PPi incorporados
Prolina	62,2	Glicina	42,0
Isoleucina	126,0	Asparagina	47,0
Cisteína	87,0	Glutamina	56,0
Lisina	98,0	Histidina	160,0
Alanina	128,0	Treonina	208,0
Metionina	122,0	Fenilalanina	68,0
Valina	190,0	Ác. Glutâmico	42,0
Arginina	260,0	Triptofano	45,0
Leucina	180,0	Tirosina	48,0
Serina	144,0	Ác. Aspártico	50,0

Para o trabalho de tese, basendo-se nesta tabela, foi escolhida a enzima específica para a treonina, pois foi uma das enzimas que apresentou maior atividade. Nesta purificação como nas demais, o perfil cromatográfico apresentado quando foi aplicado o gradiente de K Cl entre 0 e 0,5M na coluna de DEAE-celulose mostrou picos quase que coincidentes para a atividade enzimática e para a concentração de proteínas. (fig. 1)

O perfil cromatográfico apresentado pela eluição em gradiente descontínuo das proteínas retidas no gel de hidroxiapatita demonstrou que a eluição de maior quantidade de proteínas não coincidiu com o pico de atividade enzimática. O pico de proteínas ocorreu com uma concentração 0,1M de tampão fosfato pH 7,5 e o pico de atividade enzimática ocorreu na

concentração 0,2M do mesmo tampão (fig. 2). Também apresentou alguma atividade enzimática a fração eluída com tampão fosfato 0,15M.

No segundo tipo de purificação realizado, foram utilizadas cromatografias em DEAE-celulose, fosfocelulose e Hidroxiapatita. A quantidade de germen de trigo foi aumentada na extração.

O volume da coluna de DEAE-celulose e a quantidade de gel utilizadas para a realização da cromatografia em hidroxiapatita também foram aumentadas proporcionalmente ao aumento de proteínas totais aplicadas em cada cromatografia. Entre estas duas cromatografias foi introduzida a cromatografia em fosfocelulose.

Embora o volume da coluna de DEAE-celulose tenha sido aumentado em relação à purificação anteriormente descrita, o perfil cromatográfico manteve-se inalterado. Através da coluna de fosfocelulose foi obtido um perfil cromatográfico que mostra um pico de proteínas coincidente com o pico de atividade durante a passagem do gradiente de KCl (0 - 0,5M) embora a concentração de proteínas tenha caído menos abruptamente do que a atividade enzimática. (fig. 3)

A enzima obtida neste passo foi submetida à cromatografia em hidróxiapatita, cujo perfil de eluição com gradiente descontínuo de tampão fosfato (0,1 - 0,3M) manteve-se inalterado em relação à purificação anteriormente realizada. (fig. 2)

Ao final desta purificação foi obtida uma enzima purificada 50 vezes com rendimento de 13%. (tab. 3)

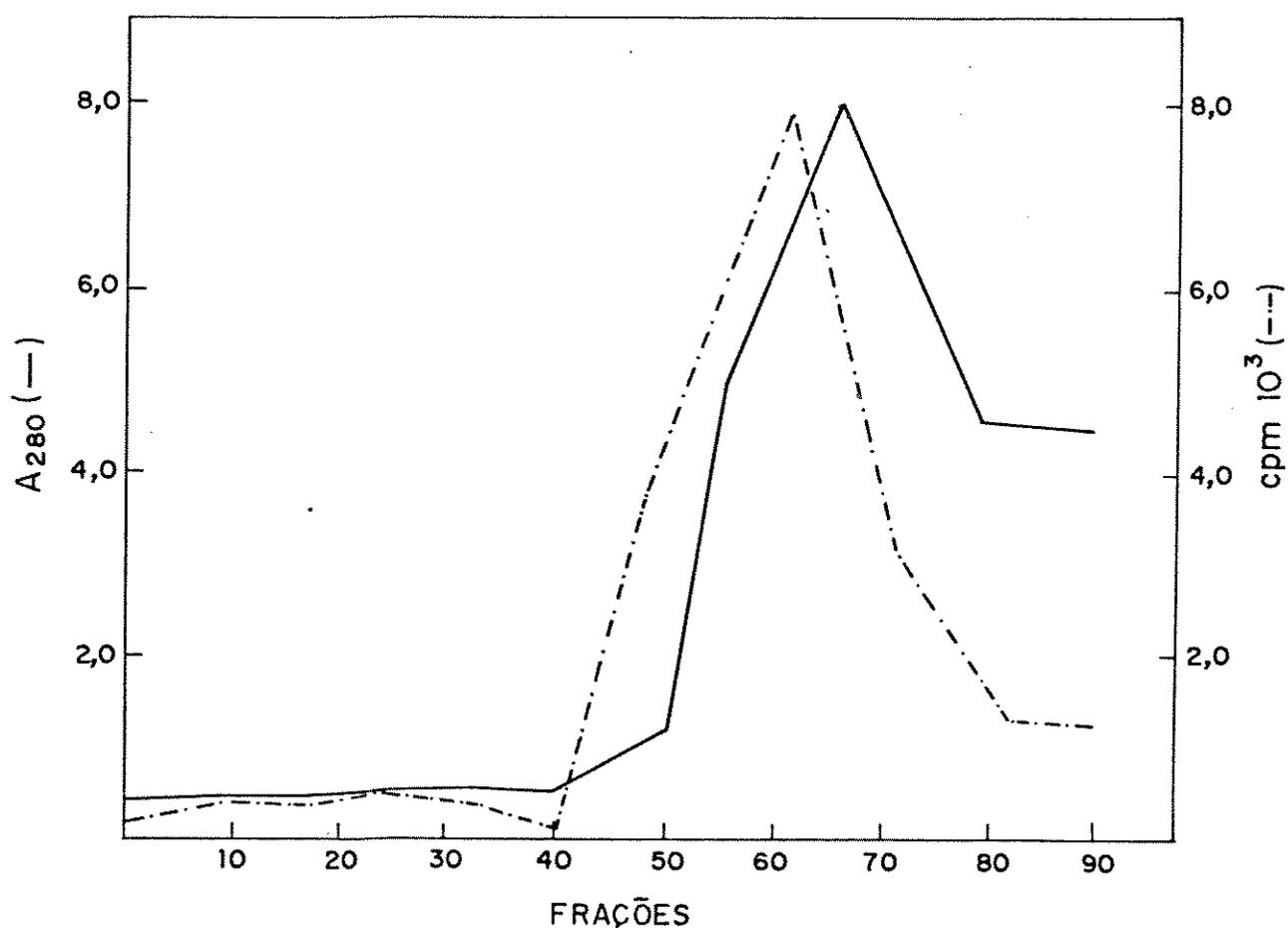


Fig. 1 Cromatografia em DEAE-celulose. O material dialisado conforme descrito em métodos foi aplicado à coluna de DEAE-celulose. A concentração de proteínas foi determinada pela leitura de absorvância a 280 nm ( - ) e a atividade enzimática ( - ) foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-PPi.

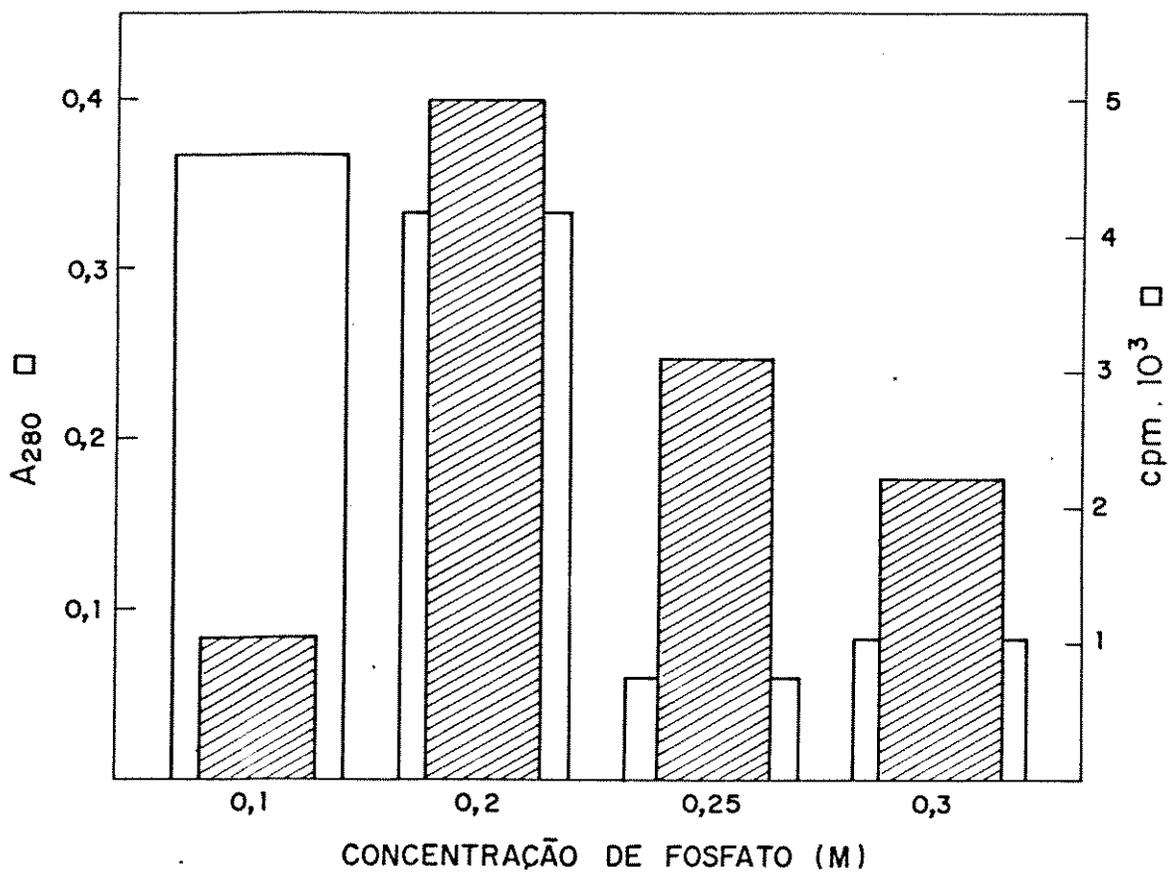


Fig. 2 Cromatografia em Hidroxiapatita. O material proveniente da cromatografia em fosfocelulose foi submetido a extração em hidroxiapatita. A enzima foi eluída em gradiente descontínuo de tampão fosfato pH 7,2 entre 0,1 e 0,3 M. A concentração de proteínas (p) foi acompanhada pela leitura de absorvância a 280 nm e a atividade enzimática (P) foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-PPi (métodos g-1)

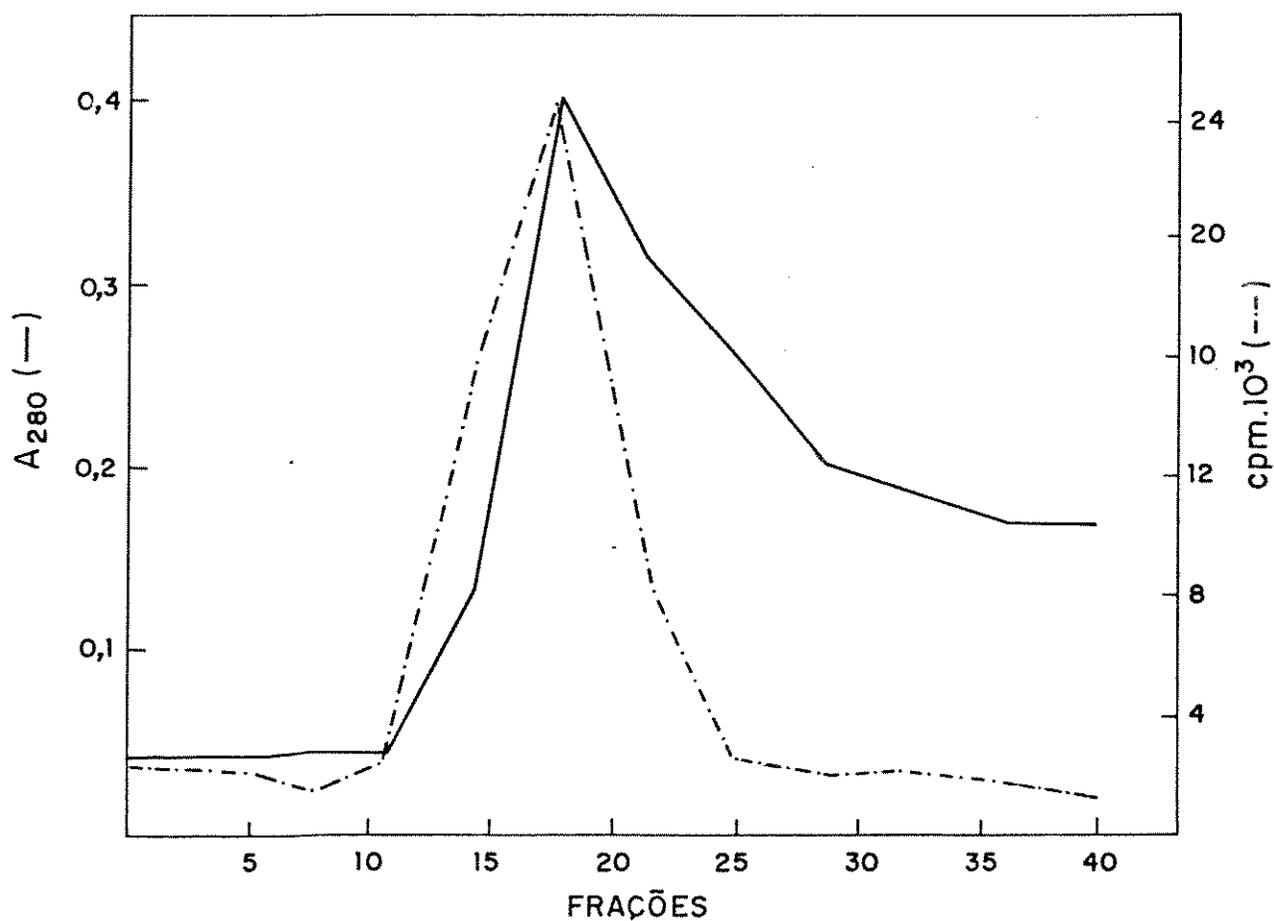


Fig. 3 Cromatografia em fosfocelulose. O material proveniente da cromatografia em DEAE-celulose foi aplicado em uma coluna de fosfocelulose. A concentração de proteínas foi determinada pela leitura da absorbância em 280 nm (—) e a atividade enzimática (---) foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-Pi (métodos g-1)

TABELA DE PURIFICAÇÃO 3

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA total mg	UNIDADES totais	ae U/mg	PURIF.	RENDIMENTO %
1	300	49.461	666000	13,4	1	100
2	135	10.869	133550	21,5	1,6	35
3	125	1.137	356250	314	23,4	53,4
4	18,6	219.4	101370	462	34,4	15,2
5	12	136	86400	635	47,3	13

No terceiro tipo de purificação realizado foi retirada a cromatografia em hidroxapatita e foram mantidas as cromatografias em DEAE-celulose e fosfocelulose cujo perfil cromatográficos mantiveram-se inalterados. (fig 1 e 3)

Além destas colunas, foi incluída como terceiro passo cromatográfico a coluna em Blue Sepharose CL 6B. Não houve detecção de atividade enzimática na passagem dos tampões de lavagem pela coluna (tampões D, E, F e G). A enzima foi eluída apenas quando foi aplicado o gradiente contínuo de ATP (0 a 0,02M).

A enzima começa a ser eluída quando a concentração de ATP encontra-se por volta de 0,008M e o pico de eluição ocorre em 0,012M de ATP. (fig. 4)

Ao final desta purificação foi obtida uma enzima 180 vezes purificada com rendimento de 5% (tabela 4)

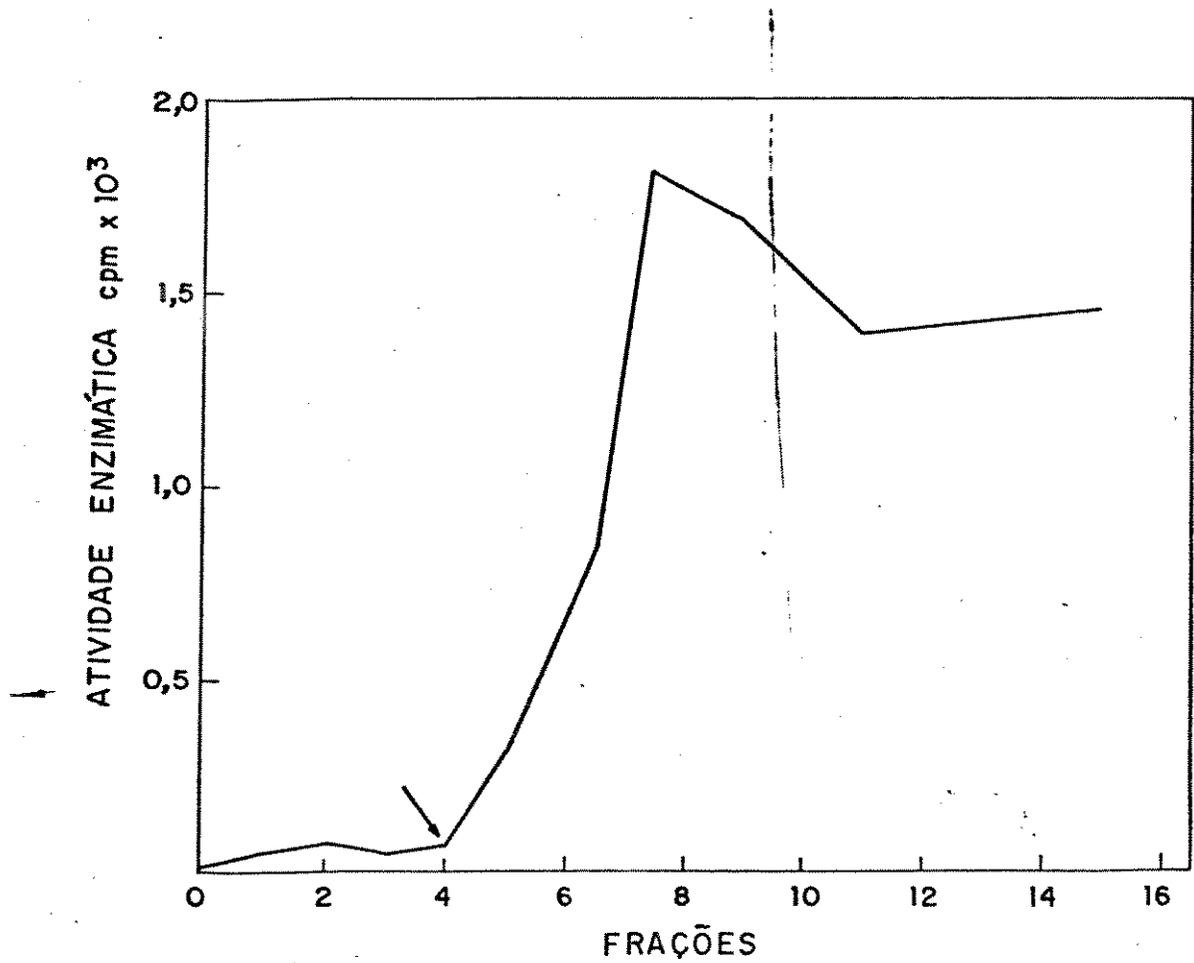


Fig. 4 - Cromatografia em Blue Sepharose CL6B. O material proveniente da cromatografia em fosfocelulose foi aplicado na coluna de Blue Sepharose CL 6B. A atividade enzimática foi determinada pelo método de intercâmbio ATP-PPi (métodos g-1). A seta indica a fração onde foi aplicado o gradiente ATP.

TABELA DE PURIFICAÇÃO 4

FRACÇÃO	VOLUME (ml)	PROTEÍNA total (mg)	UNIDADES totais	ae U/mg	PURIF.	RENDIMENTO %
2	130	12.659	124.586	9,8	1	100
3	15	192	11.430	59	6,0	9,1
4	15	159.7	6825	42,7	4,3	5,4
6	3,9	3.94	6848	1738	177	5,4

## B. DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

### 1 - Determinação da velocidade de reação em função da variação da concentração de enzima

Este experimento foi feito para que fosse escolhida a concentração de enzima ideal para ser usada na determinação dos demais parâmetros cinéticos. A concentração escolhida de 226  $\mu$ g de enzima (fig 5) foi utilizada nos demais experimentos de determinação de parâmetros cinéticos.

### 2 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação do tempo de reação

Através deste experimento foi obtida uma curva mostrando que a velocidade de reação começa a decrescer com o tempo de incubação da reação enzimática. Foi escolhido para ser usado nos demais ensaios o tempo de 10 minutos de reação (fig. 6).

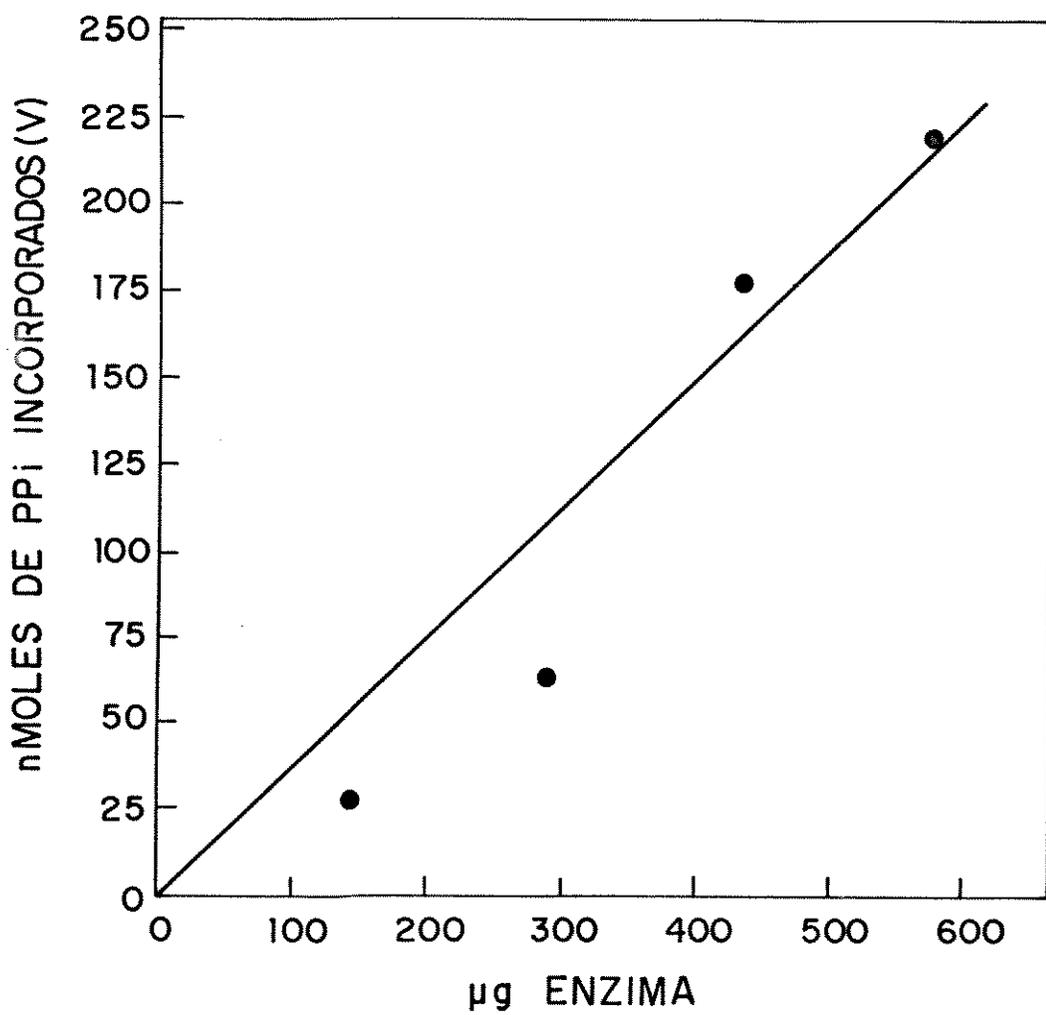


Fig. 5 Efeito da concentração da enzima. A atividade enzimática foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-PPi.

**3 - Determinação da influência da influência do pH na velocidade de reação enzimática.**

Foi obtida uma curva mostrando uma velocidade alta de reação em pH 7,5, a qual foi adotada nos demais experimentos. Foi obtido também outro ponto com velocidade enzimática maior em pH 9,0. (fig. 7)

**4 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação de Treonina.**

A velocidade enzimática aumentou até a concentração de aproximadamente 8 mM de Treonina e depois tendeu a ficar constante com o aumento da concentração de Treonina. A concentração de 10 mM de foi escolhida para os demais ensaios. A  $K_M$  determinada pelo método de Lineweaver-Burk corresponde a  $2,7 \times 10^{-9}$  M. (fig. 8).

**5 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação da concentração de ATP.**

A velocidade de reação enzimática aumentou até que a concentração de ATP chegasse a 2 mM e depois manteve-se constante. A concentração de 2mM foi utilizada nos demais ensaios. A  $K_M$ , determinada pelo método de Lineweaver-Burk corresponde a  $5 \times 10^{-5}$  M. (fig. 9)

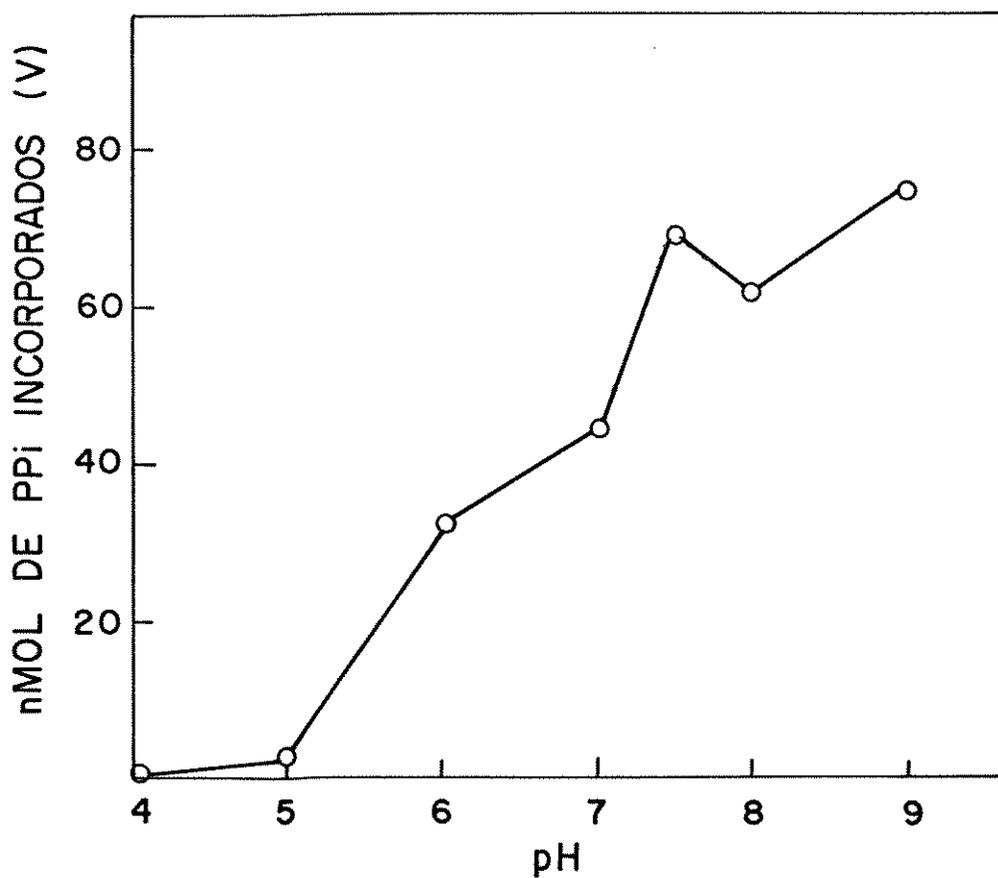


Fig. 7 Efeito do pH na atividade enzimática: A atividade enzimática foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-PPi. Os tampões utilizados foram tampão Acetato (pH 4 e 5), tampão fosfato (pH 6) e Tris-HCl (pH 7, 7,5, 8 e 9). Todos os tampões tinham a mesma força iônica (métodos g-1).

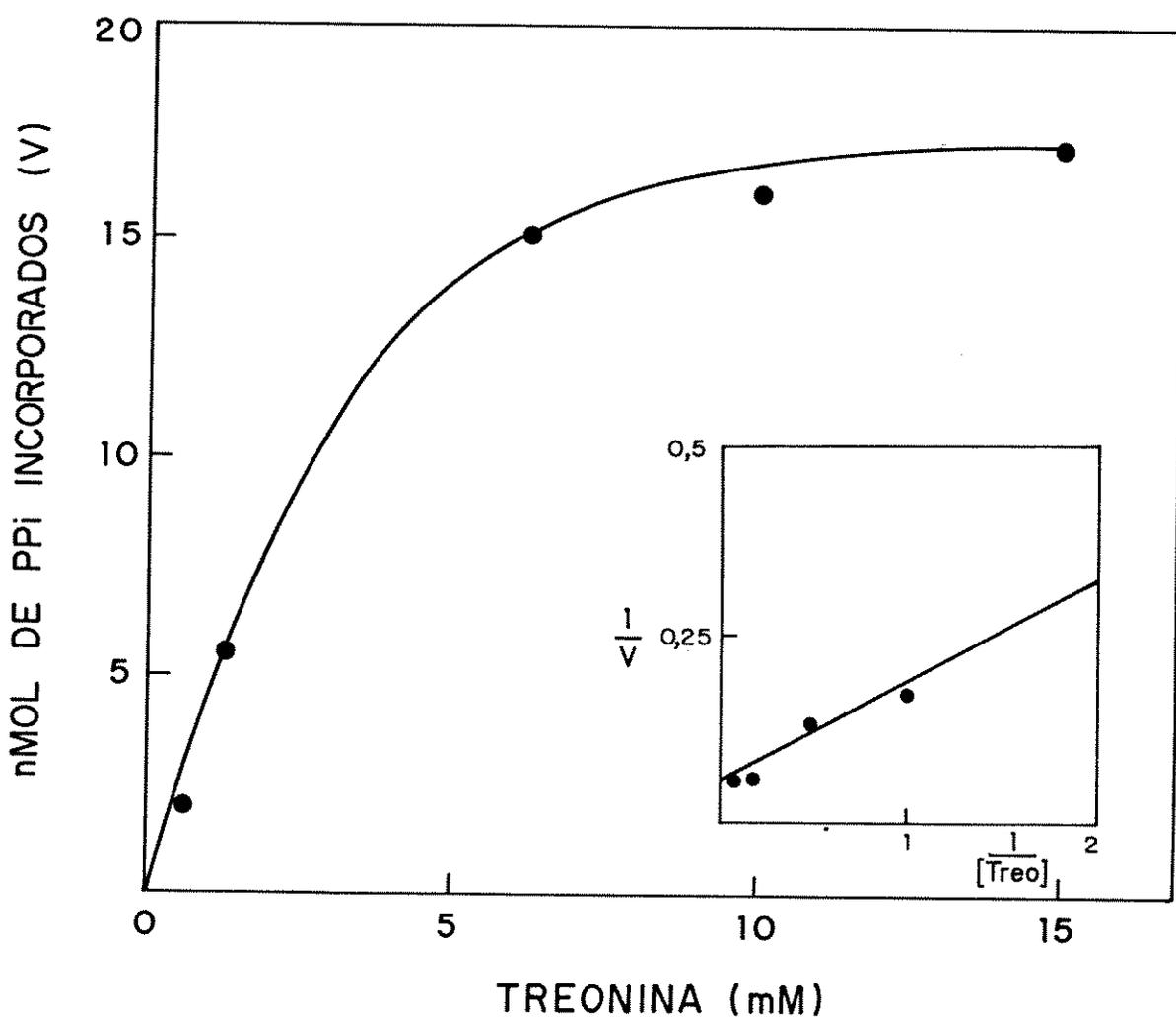


Fig. 8 Efeito da concentração de Treonina na atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada como descrito (métodos g-1). A figura interna representa o gráfico de Lineweaver e Burk

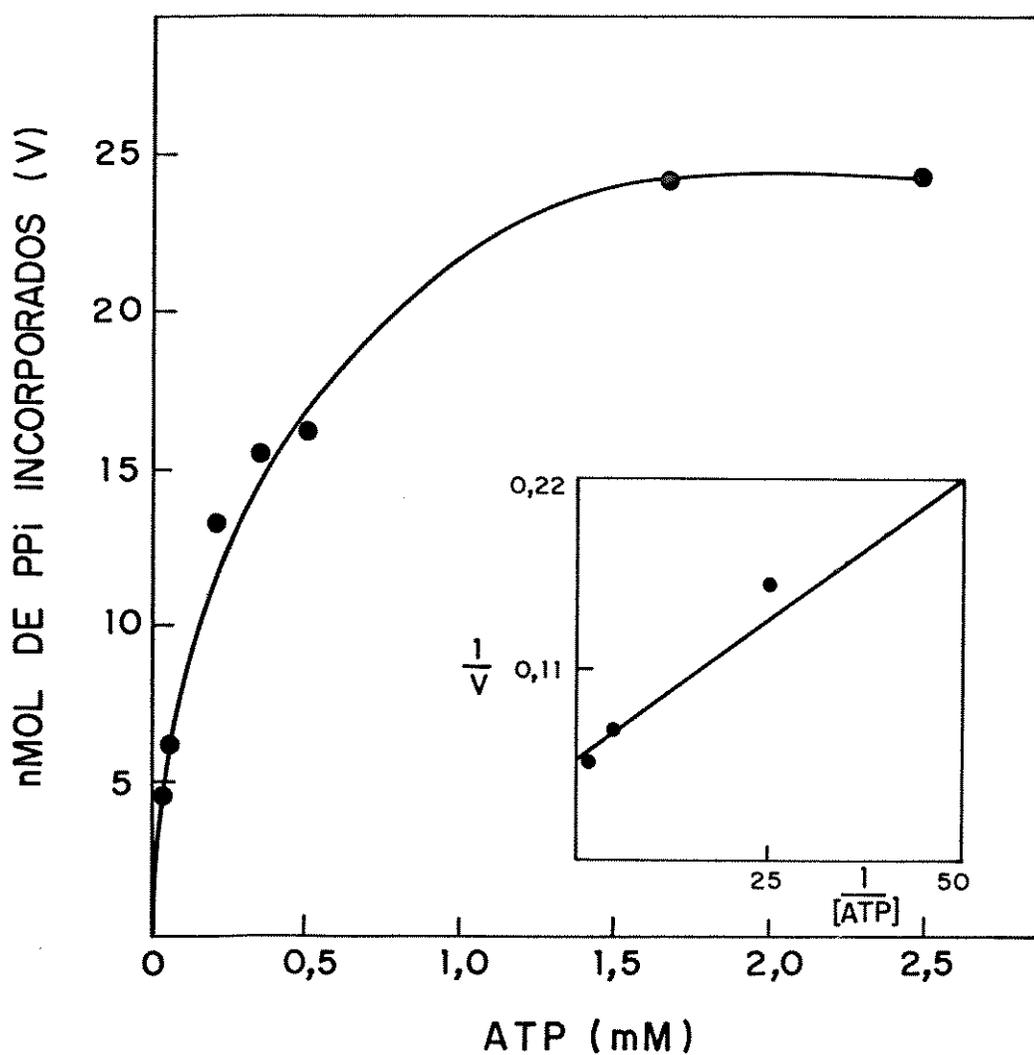


Fig. 9 Influência da concentração de ATP na atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada como descrito (método g-10). A figura interna representa o gráfico de Lineweaver e Burk.

#### 6 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da variação da concentração de pirofosfato.

O gráfico obtido mostra que a velocidade de reação aumentou até que a concentração de pirofosfato chegasse a 2mM, passando então a diminuir. A concentração de 2 mM foi utilizada nos demais ensaios. A  $K_M$  determinada pelo método de Lineweaver-Burk corresponde a  $1,6 \cdot 10^{-5}$  M (fig. 10).

#### 7 - Determinação da velocidade de reação enzimática em função da concentração de magnésio

A velocidade de reação enzimática aumentou até que a concentração de magnésio chegasse a 15 mM. A partir desta concentração, a velocidade manteve-se constante. A concentração de 15 mM foi adotada para os demais ensaios. A  $K_M$ , determinada pelo método de Lineweaver - Burk corresponde a  $1,3 \cdot 10^{-9}$  M. (fig. 11)

#### 8 - Influência de ions Cálcio na reação enzimática

O cálcio não pôde substituir o magnésio na reação enzimática, na concentrações empregadas, funcionando como inibidor da reação. Na concentração de 20 mM 100% da reação enzimática estava inibida.

100% de atividade enzimática correspondem a 69 nmoles de pirofosfato incorporado. Atividade enzimática foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-pirofosfato.

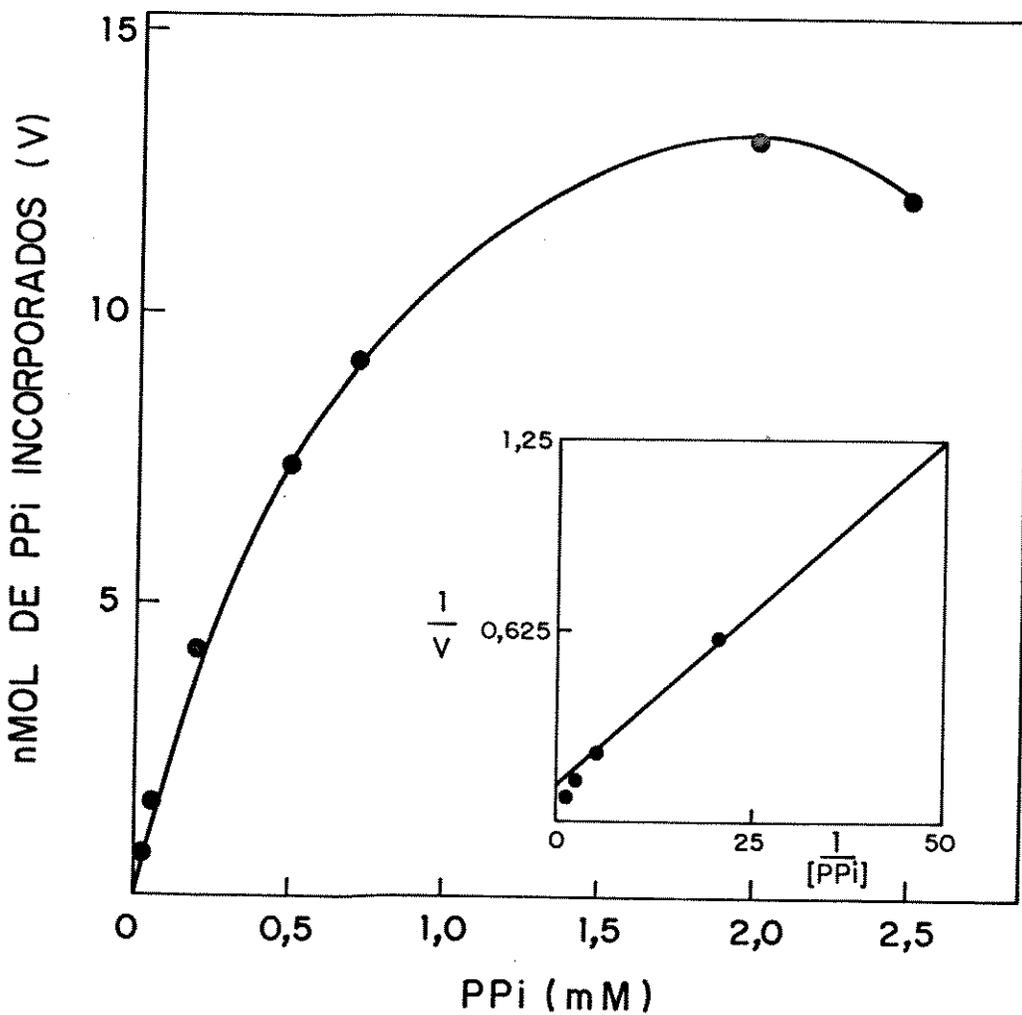


Fig.10 Influência da concentração de de pirofosfato na atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada como descrito (métodos g-1). A figura interna representa o gráfico de Lineweaver e Burk.

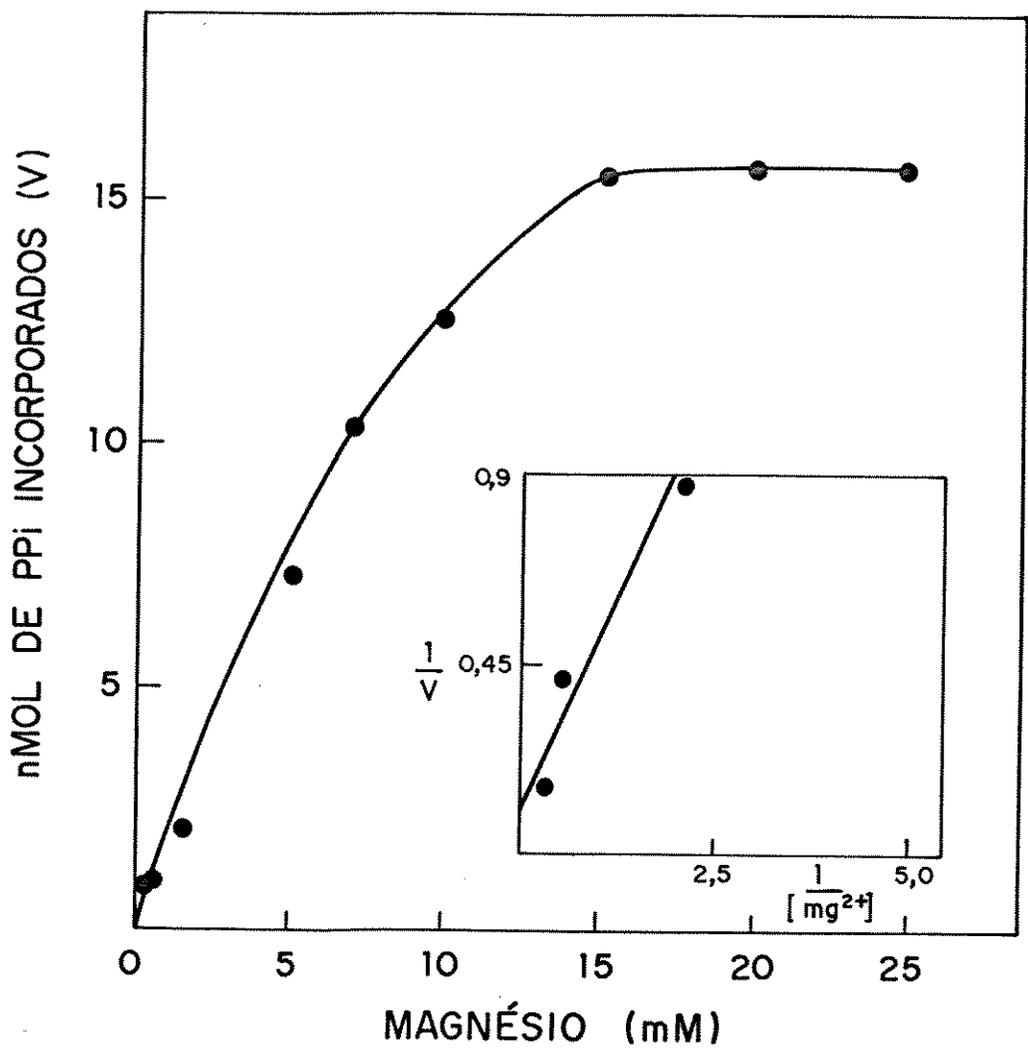


Fig.11 Influência da concentração de magnésio na atividade enzimática. A atividade enzimática foi determinada como descrito em (métodos g-1). A figura interna representa o gráfico de Lineweaver e Burk.

TABELA 5

CONCENTRAÇÃO DE CALCIO (mM)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	
	- Mg <sup>2+</sup>	+ Mg <sup>2+</sup>
0	-	100
0,02	0	93
0,05	0	82
0,5	0	57
10	0	35
15	0	15
20	0	0

### 9 - Influência de íons zinco na atividade enzimática.

O zinco inibe a reação no meio que contém magnésio e não substitui o mesmo na reação enzimática em todas as concentrações usadas no experimento.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-PPi (métodos g-1). 100% da atividade enzimática correspondem a 69 nmoles de pirofosfato incorporado.

TABELA 6

CONCENTRAÇÃO DE ZINCO (mM)	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (%)	
	+ Mg <sup>2+</sup>	- Mg <sup>2+</sup>
0	100%	-
5,0	0	0
10,0	0	0
15,0	0	0

#### 10 - Influência de íons potássio na reação enzimática:

O potássio inibe mas não totalmente a reação enzimática nas concentrações usadas nos ensaios.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de intercâmbio isotópico ATP-pirofosfato. (métodos g-1). 100% de atividade enzimática corresponde a 69 nmoles de pirofosfato.

TABELA 7

K <sup>+</sup> (M)	Atividade Enzimática (%)
0	100
0,1	57
0,25	45
0,5	36
0,75	32
1	25

### 11 - Influência de análogos de ATP.

A reação foi realizada conforme descrito em métodos g-1 variando o substrato usado no caso do ATP ou seus análogos, nas concentrações indicadas. O  $\alpha\beta$  metileno ATP não substitui o ATP na reação de intercâmbio ATP-PPi, nas concentrações empregadas. O  $\beta\gamma$  metileno ATP funciona como substrato para reação no lugar do ATP embora a reação tenha ocorrido em menor extensão do que ocorre quando é empregada a mesma concentração de ATP.

TABELA 8

Substrato	Concentração (mM)	PPi incorporado (nMoles)
ATP	4	63
$\alpha\beta$ metileno ATP	2	3,5
	4	6,6
$\beta\gamma$ metileno ATP	2	7,7
	4	30

## 12 - Capacidade aminoaciladora da enzima

A enzima apresentou atividade catalítica para aminoacilação do tRNA de germen de trigo.

Foram testadas frações enzimáticas provenientes de algumas etapas de purificação segundo métodos g-2

TABELA 9

FRAÇÃO	<sup>14</sup> C treonil tRNA formado (U/ml)
1	6,7
2	14,4
3	3,7

## 5 - DISCUSSÃO

### a) Purificação

Através de purificação utilizando DEAE-celulose e Hidróxiapatita foi obtida uma enzima purificada cerca de 20 vezes. (tab 1) Esta enzima foi utilizada para verificar, através da especificidade com relação aos aminoácidos (tabela 2), qual das sintetases estaria tendo maior atividade.

A treonil tRNA sintetase foi escolhida pelo fato de estar aparecendo entre as enzimas que apresentaram maior atividade e também pelo fato de já haverem sido realizados trabalhos com estas enzimas, obtidas de tecidos de mamíferos em nosso laboratório. (Aoyama, 1974, Barbosa, 1981)

Com a inclusão da cromatografia em fosfocelulose entre a cromatografia em DEAE-celulose e a cromatografia em hidroxiapatita, foi obtida uma enzima purificada cerca de 50 vezes com rendimento de 13% (tabela 3). Com esta enzima foram determinados os parâmetros cinéticos da reação enzimática na sua primeira etapa, ou seja na reação de intercâmbio isotópico ATP-pirofosfato.

Retirando a cromatografia em Hidroxiapatita e colocando a cromatografia em Blue Sepharose CL 6B foi obtida uma enzima purificada cerca de 180 vezes com rendimento de 5% (tabela 4). Esta substituição ocorreu porque, através da tabela de purificação (tabela 3), não foi notado aumento significativo na purificação na passagem da cromatografia em fosfocelulose para a hidroxiapatita.

A cromatografia em Blue Sepharose CL 6B tem sido empregada na purificação de proteínas que apresentam a dobra do dinucleotídeo. (Rossman et col 1974) Esta resina consiste de um gel agarose ao qual está ligado o cibacron Blue F 3G.

O cibacron Blue F 3G é uma molécula com características estruturais muito semelhantes às características dos nucleotídeos de piridina e por isso retém moléculas que têm afinidade pelo mesmo. Estas moléculas apresentam a dobra do dinucleotídeo.

Outras aminoacil-tRNA sintetases foram purificadas utilizando esta técnica cromatográfica. (Moe e col 1976, Quivy e col 1987).

Pela passagem dos tampões de lavagem através da coluna Blue Sepharose CL 6B não houve eluição da enzima (métodos f-5) apesar da Isoleucil tRNA sintetase de E. coli haver sido eluída com NaCl 0,1M. (Moe e col 1979). A Treonil tRNA sintetase de germen de trigo também não é eluída com ATP quando este se encontra na presença de magnésio.

Mol e Col (1979) testaram o efeito da molécula da Cibacron Blue F 3G na reação catalisada pela Isoleucil tRNA sintetase. Foi observado que o Cibacron Blue F 3G é um inibidor competitivo com relação ao tRNA na reação de aminoacilação catalisada por esta enzima, havendo inibição do tipo misto com relação ao ATP.

Como o tRNA é constituído de nucleotídeos de piridina a inibição competitiva pode ser compreensível.

A enzima é eluída da resina com gradiente de ATP sem magnésio. Como o ATP eluente não está na forma apropriada para a

catálise, ou seja na forma complexada com o magnésio, pode-se supor que a presença do ATP sem magnésio induz a não ligação da enzima ao tRNA. No caso da cromatografia, o tRNA está substituído pela resina de Blue Sepharose CL 6B, então o ATP sem magnésio retira a enzima da resina. Como o ATP na presença do magnésio tem efeito alostérico positivo na ligação da enzima ao tRNA (Allende e col 1970) então o mesmo deve manter a enzima ligada ao cibacron Blue quando ligado ao magnésio, porque o cibacron Blue F 3G por sua vez, estaria mimetizando o papel do tRNA, já que é inibidor competitivo deste.

Enquanto que, para eluir a Isoleucil-tRNA sintetase de E. coli da coluna de Blue Sepharose CL 6B foi necessária uma concentração de cerca de 3mM de ATP. (Moe e col 1976), para eluir a Treonil-tRNA sintetase de Germen de trigo da mesma coluna foi usada uma concentração bem maior de ATP. Estas diferenças podem ser explicadas com base nos mecanismos de alosteria negativa do ATP na ligação da enzima com o tRNA e conseqüentemente na ligação da enzima com a resina de Blue Sepharose, cada sintetase possui diferentes afinidades por seus substratos e a forma como um substrato influi na afinidade da enzima por outro substrato da reação é diferente.

O grau de purificação alcançado com a cromatografia em Blue Sepharose é alto quando comparado com outras técnicas cromatográficas. Além desta vantagem, esta técnica oferece a informação adicional sobre a presença de dobra do dinucleotídeo na molécula que se liga à resina.

## b - Propriedades Cinéticas

A variação da velocidade enzimática em função do tempo mostra uma curva típica para a maioria das enzimas, onde a velocidade inicial da reação cai com o passar do tempo. (Fig. 6)

No caso da enzima em estudo, após 15 minutos de reação, a velocidade começa a diminuir. Após 30 minutos de reação a velocidade tende a ficar constante.

Isto pode ser devido a muitos fatores tais como degradação enzimática pela temperatura, inibição da enzima pelos produtos da reação (figura 6).

O pH ótimo para a reação de intercâmbio ATP-pirofosfato foi encontrado em dois pontos; no pH 7,5 e no pH 9,0. (Fig. 7) As aminoacil tRNA sintetases geralmente apresentam pH ótimo de reação na faixa alcalina. Nesta faixa de pH, os grupos fosfato do pirofosfato e do ATP formam complexos com magnésio, provavelmente os verdadeiros substratos da reação (Cole, 1970) Em relação ao pH ótimo mais estudos devem ser feitos pois a relação do pH com a temperatura de reação para a enzima é importante, assim o estudo do pH em várias temperaturas pode fornecer informações importantes. (Klibanov e col, 1987)

Através dos gráficos de Michaelis-Menten pode ser observada a variação da velocidade de reação em função da variação das concentrações dos substratos, e também do cofator que é o magnésio, envolvidos na reação.

As concentrações necessárias para que fosse alcançada a velocidade máxima de reação foram 10 mM para a Treonina, 2 mM para o ATP 2 mM para o pirofosfato e 15 mM para o magnésio.

A concentração de Treonina necessária para que seja alcançada a velocidade máxima está aumentada em relação a outras Treonil-tRNA sintetases. (Aoyama, 74, Barbosa 81)

No caso do ATP, o verdadeiro substrato para a reação deve ser o complexo formado entre o ATP e o  $Mg^{+2}$  ( $Mg\ ATP$ )<sup>-2</sup> (Cole e col, 1970<sup>a</sup>).

O ATP compete com o pirofosfato porque este forma também um complexo com o  $Mg^{+2}$  ( $Mg\ P_{27}O_7$ )<sup>-2</sup> na reação inversa (Cole e col, 1970<sup>b</sup>).

Para a Treonil-tRNA sintetase de germen de trigo a velocidade da reação é máxima quando a proporção entre magnésio e ATP é de 7:1 a mesma proporção é válida entre as concentrações de magnésio e pirofosfato. (fig 9, 10, 11)

Os gráficos de Lineweaver e Burk (figuras internas - fig 8, 9, 10 e 11) permitiram calcular as constantes aparentes de Michaelis (KM). Neste caso a constante é chamada de constante aparente pois é obtida através de reação de intercâmbio ATP-pirofosfato, onde os produtos de reação estão ligados à enzima. Para que fosse calculada a verdadeira constante de Michaelis deveria ser usada a reação enzimática em suas duas etapas, até a formação do aminoacil tRNA, que é o produto final e se encontra separado da enzima.

As KM aparentes obtidas foram de  $5,0^{-5}$  M para o ATP,  $1,6.10^{-5}$  M para o pirofosfato;  $3,3.10^{-3}$  M para o magnésio e  $2,7.10^{-3}$  M para a Treonina. O ATP mostra maior afinidade pela enzima que a Treonina.

Para a Treonil-tRNA sintetase de E. coli o ATP é o primeiro substrato a entrar no sítio ativo da enzima na ordem da reação e a treonina não se liga à enzima na ausência de ATP. (Allende e col., 1969)

Em contraste com a Treonil-tRNA sintetase de fígado de boi e de fígado de rato, as KM obtidas para a Treonil-tRNA sintetase de Germen de trigo estão aumentadas. (Aoyama 1974, Barbosa 1988).

As aminoacil-tRNA sintetases podem estar em baixas concentrações no germen de trigo porque este é um organismo em estado latente. A baixa afinidade dos substratos pelas enzimas desta classe pode estar relacionada a este fato. Outro fator mencionado é que os vegetais tem menos proteínas que os animais por isso tem menos enzimas responsáveis por sua síntese. (Allende, 1969).

Dados atuais sobre a organização das enzimas em estruturas intracelulares propõe que as condições em que as enzimas são estudadas in vitro diferem muito das condições em que as mesmas são estudadas in vivo. Isto porque a concentração da enzima in vivo é muito superior à concentração de seus substratos, mudando a concepção segundo a qual as enzimas são catalisadores presentes em pequenas concentrações e catalizam reações onde o substrato está presente em excesso ou seja, as condições da equação de Michaelis e Menten. A organização celular cria, então, condições para que as reações que ocorrem em especial em complexos multienzimáticos - o que ocorre com as aminoacil-tRNA sintetases de alguns organismos - se processem de acordo com um mecanismo através do qual os metabólitos são transferidos de uma enzima

para outra como se os mesmos estivessem sendo passados "de uma mão para outra". Isto diminuiria a necessidade de altas concentrações de substrato para que a reação enzimática ocorresse. (Ryazanov, 1989, Kurganov, 1989, Srere e Ovadi, 1990). Pode-se pensar então que os dados obtidos através da equação e dos gráficos de Michaelis e Menten são inaplicáveis à célula viva e a utilidade dos dados de Michaelis e Menten fica então relacionada ao estudo dos mecanismos da reação ou seja, ordem de entrada e saída de substratos, efeito de inibidores (Burk, 1984) não mostrando a quantidade real de substrato que a enzima utiliza in vivo.

Quanto à influência de cátions foi obtido que os íons cálcio e zinco não substituem o magnésio na reação de intercâmbio ATP-pirofosfato. Além de não substituir o magnésio na reação enzimática, o zinco inibe totalmente a reação, mesmo quando o magnésio é adicionado ao meio em concentrações ótimas para a reação.

Esta inibição foi observada nas três concentrações de zinco empregados (tabela 6). O interesse em estudar o efeito do íon zinco deve-se ao fato de algumas aminoacil-tRNA sintetases serem metaloenzimas que contém íons zinco ligados em sua molécula (Plateau e col, 1981; Kovaleva e col, 1989). A remoção deste metal por hidrólise prolongada faz com que a enzima perca sua atividade.

O cálcio não substitui o magnésio na reação enzimática nas concentrações em que o magnésio atua como cofator (tabela 5) e inibe 100% da reação na concentração de 2mM que é uma

concentração muito mais baixa que a concentração de magnésio utilizada para que seja alcançada a velocidade máxima de reação, que é de 15 mM. (tabela 5)

Os íons potássio, embora sejam essenciais na reação de aminoacilação, a partir da concentração de 0,1 M são inibidores da reação de intercâmbio isotópico ATP-pirofosfato. (tabela 7)

Deve ser levado em conta que tanto o potássio quanto o cálcio e o zinco também formam complexos com o ATP e o pirofosfato. Como estes complexos não são úteis à catálise (Cole e col., 1970<sup>ae b</sup>) a quantidade de substratos disponível diminui, diminuindo a velocidade da reação enzimática.

A influência dos íons potássio foi testada principalmente porque um gradiente de KCl entre 0 e 0,5 M foi usado como eluente da enzima nas cromatografias em DEAE-celulose e Fosfocelulose. (métodos f-2, f-3)

Era necessário saber se nas concentrações mais altas do gradiente a atividade enzimática diminuía porque a enzima deixava de sair da coluna ou porque as concentrações mais altas de potássio inibiam a atividade enzimática.

Foi verificada também a influência de dois análogos de ATP na reação enzimática.

O  $\alpha\beta$  metileno ATP tem um grupamento metileno inserido entre o fosfato  $\alpha$  e o fosfato  $\beta$  da molécula de ATP. Isto impede que a enzima se ligue ao ATP para remover o pirofosfato formado pelos fosfatos  $\beta$  e  $\gamma$  da molécula, não ocorrendo então nenhuma reação enzimática. (tabela 8).

O  $\beta\gamma$  metileno ATP apresenta o grupo metileno ligado entre os fosfatos  $\beta$  e  $\gamma$  da molécula do ATP. Neste caso ocorre a reação enzimática, mas em menor extensão que ocorreria caso as mesmas concentrações de ATP fossem utilizadas. (tabela 8)

Pode ser que neste caso a enzima consiga liberar o AMP, mas o grupamento restante que apresenta dois grupos ortofosfato unidos por um metileno não pode ser utilizado pela enzima para a formação do ATP que é obtido na reação reversa. Como é adicionado pirofosfato ao meio reacional, forma-se uma pequena quantidade de ATP que é então detectada.

A capacidade aminoaciladora da enzima foi testada com a finalidade de verificar se com o processo de purificação esta capacidade não havia sido perdida. (tabela 9)

Em alguns processos de purificação a capacidade aminoaciladora pode ser perdida porque a enzima é separada em suas subunidades ou porque é perdido algum peptídeo. (Lapointe e Soll 1972).

O teste realizado mostrou que a enzima está íntegra do ponto de vista catalítico, embora isto não prove que exista integridade do ponto de vista estrutural porque peptídeos que têm outras funções que não sejam a catálise propriamente dita podem ter sido perdidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allende, J. E. (1969) "Protein Biosynthesis in Plant Systems In Techniques in Protein Biosynthesis. Academic Press (London) V. 2, 55-99.

Allende, C., Chaimovich, H., Gatica, M., Allende, J. (1969) The Aminoacyl Transfer Ribonucleic Acid Synthetases. The properties of an adenosine triphosphate - Threonyl transfer ribonucleic acid synthetase complex. J. Biol. Chem. 245, 93-101.

Aoyama, H. (1974) Tese de doutoramento USP, IQ

Attwood, M. M., Cocking, E. C. (1965) The purification and properties of the Alanyl-transfer Ribonucleic acid synthetase of tomato roots. Biochem. J. 96, 616-625.

Baldwin, A. N., Berg, P. (1966) Purification and properties of Isoleucyl. Ribonucleic acid Synthetase from E. coli J. Biol. Chem. 241, 831-839.

Barbosa, N. M., (1981) Tese de Mestrado - UNICAMP, IB

Beresten, S., Scheinker, U., Favorova, O., Kisselev, L., (1983) Mutual conformation changes of Tryptophanyl tRNA Synthetase and tryptophanyl tRNA in the course of their specific interaction. Eur. J. Biochem. 136, 559-570.

Berg, P. (1956) Acyladenilates: the interaction of ATP and L-methionine. *J. Biol Chem.* 222, 1025-1034.

Bergmann, F. H. (1962) Bacterial aminoacyl - tRNA synthetases. *Methods in Enzymology*. Vol. V, 708.

Burk, D. (1984) Enzyme Kinetic constants: the double reciprocal plot. *Trends. Biochem. Sci.* 100, 202-204.

Carias, J. R., Julien, R. (1976) Phenylalanyl tRNA synthétase des embryons de blé. Purification, masse molaire, structure, propriétés. *Biochimie*, 58, 253-259.

Carias, J. R., Mouricout, M., Quintard, B., Thomas, J. C., Julien, R. (1978) Leucyl-tRNA and Arginyl-tRNA. Synthetases of Wheat Germ. *Eur. J. Biochem.* 87, 583-590.

Castroviejo, M., Fournier, M., Gatus, M. Gandar, J. C., Labouesse, B., Litvak, S. (1982) Tryptophanyl tRNA synthetase is found closely associated with and stimulates DNA polymerase  $\alpha$ -like activity from wheat embryos. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 107, 294-301.

Chazal, P., Thomas, J. C., Julien, R. (1977) Methionyl tRNA synthétase des embryons de blé: dissociation en sous unités. *Eur. J. Biochem.* 73, 607-615.

Clark, J. M. Jr. (1958) Amino Acid Activation in plant tissues J. Biol. Chem. 233, 421-424.

Cleland, W. W. (1967) Enzyme Kinetics. Ann. Rev. Biochem. 36, 77-112.

Cole, F. X., Schimmel, P. R. (1970<sup>a</sup>). On the Rate Law and Mechanism of the Adenosine Triphosphate Pyrophosphate Isotope Exchange Reaction of aminoacyl transfer Ribonucleic Acid Synthetases Biochemistry. 9, 480-489.

Cole, F. X., Schimmel, P. R. (1970<sup>b</sup>) Isoleucyl Transfer Ribonucleic Acid Synthetase. The role of Magnesium in Amino Acid Activation. Biochemistry, 9, 3141-3148.

Dang, C. V., Dang, C. V. (1986) Higher eukaryotic aminoacyl tRNA synthetases in physiologic and pathologic states. Mol. Cell. Biochem. 71, 107-120.

Dietrich, A. Giegé, R., Comarmond, M. B., Thierry, J. C., Moras, D. (1980) Crystallographic studies on the aspartyl tRNA Synthetase tRNA aspareryl system from yeast - The crystalline aminoacyl tRNA synthetase. J. Mol. Biol. 138, 129-135.

Elizarov, S. M., Volfson, A. D., Molosin, Yu. A. (1989) Phosphorylation of the components of the High-Molecular-Weight

Aminoacyl tRNA Synthetase Complex from the rabbit liver by associated type I casein kinase Biochemistry 54, 613-621.

Fasiolo, F. Remy, P., Holler, E. (1981) Phenylanyl tRNA synthetase of Baker's Yeast. Modulation of Adenosine Triphosphate Exchange by transfer-Ribonucleic Acid. Biochemistry 20, 3851-3856.

Fersht, A. R., Leatherbarrow, R. J. (1987) Structure and Activity of the Tyrosyl tRNA synthetase Protein Engineering. Alan R. Liss, Inc. cap. 24, 269-278.

Filonenko, V. V., Beresten, S. F., Rubikaite, B. I., Kisselev, L. L. (1989) Bovine Tryphophanyl tRNA synthetase and glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase form a complex. Biochem. Biophys. Res. Comm. 161, 481-488.

Hartree, E. F. (1972) Determination of protein. A modification of the Lowry method that give linear photometric response. Anal. Biochem., 48, 422-427.

Hill, K., Schimmel, P (1989) Evidence that the 3' end of a tRNA binds to a site in the adenylate synthesis domain of a Aminoacyl tRNA synthetase. Biochemistry 28, 2577-2586.

Hirsch, D. I. (1968) A study of the theory adenylate complex with threonyl tRNA synthetase and its reaction with

hidroxylamine. J. Biol. Chem., 243, 5731-5738.

Hoagland, M. B. (1955) An Enzymic mechanism for aminoacid activation in animal tissues. Biochim. Biophys. Acta, 16, 288-289.

Irwin, M. J., Nyborg, J., Reid, B. R., Blow, D. M. (1976) The crystal structure of tyrosyl-transfer RNA synthetase at 2.7 Å<sup>o</sup> resolution. J. Mol. Biol. 195, 577-586.

Kellerman, O., Viel, C., Waller, J. P. (1978) Methionyl tRNA synthetase from sheep mammary gland. Purification of a fully active monomeric enzyme derived from high-molecular-weight complexes by controlled proteolysis Eur. J. Biochem. 88, 197-204.

Khan, A., Roe, B. A. (1988) Aminoacylation of synthetic DNAs corresponding to Escherichia coli Phenylalanine- and lysine-tRNAs. Science, 241, 75-79.

Klibanov, A. M., Ahern, T. J. (1987) Thermal stability of proteins. Protein Engineering cap. 19, 213-218. Alan R. Liss, Inc.

Keller, E. B., Zamecnik, P. C. (1954) The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labeled aminoacids into proteins J. Biol. Chem.

Kornberg, A., Stadman, E. R. (1957) Preparation of coenzyme A. Methods in Enzymology, Vol. III, 909.

Kovaleva, G. K., Tarusova, N. B., Kiselev, L. L. (1989) Hydrolytic activity of Bovine Tryptophanyl tRNA synthetase Induced by removal of  $Zn^{2+}$  ion. J. Mol. Biol. 22, 1048-1055.

Kula, M. R. (1973) Structural studies on Isoleuvinyl tRNA synthetase from E. coli, FEBS Lett., 35, 299-302.

Kurganov, B. I., Lubarev, A. E. (1989) Principles of organization and functioning of the micro compartment of the metabolon Biochemistry 54 564-566.

Layne, E. (1957) Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzymology, III, 447-454.

Lapointe, J., Soll, D. (1972) Glutamyl transfer ribonucleic Acid synthetase Escherichia coli

I Purification and Properties

II Interaction with intact glutamyl tRNA

III Influence of the 46 K protein on the affinity of the 56 K glutamyl tRNA synthetase for its substrates.

J. Biol. Chem. 247, 4966-4982.

Lee, L. W., Ravel, J. M., Shive, W. (1967) A general involvement of acceptor Ribonucleic acid in the initial activation steps of

glutamic acid and glutamine Arch. Biochem. Biophys. 121, 614-618.

Levin, O. (1962) Column Chromatography of proteins in calcium phosphate. Methods in Enzymology V, 27-32.

Littlefield, J. W., Keller, E. B., Gross, J., Zamecnik, D. C. (1955) Studies on cytoplasmic Ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. J. Biol. Chem. 217, 111-123.

Moe, J. G., Piszkiwicz, D. (1976) Purification of Isoleucyl transfer Ribonucleic acid synthetase by affinity chromatography on Blue Dextran Sepharose. FEBS Lett. 72, 147-150.

Moe, J. G., Piszkiwicz, D. (1979) Isoleucyl transfer Ribonucleic acid synthetase - Competitive Inhibition with respect to transfer Ribonucleic acid by Blue Dextran. Biochemistry. 18, 2810-2814.

Möller, W., Jansen, G. M. C. (1990) transfer RNAs for primordial aminoacids contain remnants of a primitive code at position 3 to 5. Biochimie, 72, 361-368.

Moustafa, E. Lyttleton, J. W. (1963) Adenosine triphosphate-pirophosphate exchange in the aminoacyl ribonucleic acid formation catalized by aminoacid activating enzymes from wheat Germ. Biochim. Biophys. Acta 68, 45-51.

Nazario, M., Evans, J. A. (1974) Physical and Kinetic studies of Arginyl transfer Ribonucleic Acid Ligase of Neurospora. A sequential ordered Mechanism J. Biol. Chem. 249, 4934-4942.

Norcum, M. T., (1989) Isolation and Electron Microscopic Characterization of the High Molecular Mass Aminoacyl tRNA synthetase Complex from Murine Erytroleukemia Cells. J. Biol. Chem. 264 15043-15051.

Ostrem, D., Berg, P. (1974) Glycyl. Transfer Ribonucleic Acid Synthetase from Escherichia coli, Purification, Properties, and Substrate Binding. Biochemistry 13, 1338-1348.

Papas, J. S., Mehler, A. H. (1970) Analysis of the aminoacid binding to the proline tRNA synthetase of E. coli. J. Biol. Chem., 245, 1588-1592.

Peterson, E. A., Sober, H. A. (1962) Column chromatography of proteins: substituted celluloses Methods in Enzimology, vol. V. 3-27.

Plateau, P., Mayaux, J. F., Blanquet, S. (1981) Zinc(II) - Dependent synthesis of diadenosine 5',5''' - P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup> - Tetraphosphate by Escherichia coli and Yeast Phenylalany transfer Ribonucleic Acid synthetases. Biochemistry 20, 4654-4662.

Powers, D. M., Ginsburg, A. (1978) Monomeric Structure of Glutamyl tRNA synthetase in E. coli Arch. Biochem. Biophys. 191, 673-679.

Putney, D. S., Royal, N. J., Veygar, H. N., Herlitty, W. C., Schimmel, P., Biemann, K. (1981). Primary Structure of a Large Aminoacyl tRNA Synthetase. Science 213, 1497-1500.

Putney, S. D., Schimmel, P. (1981) An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription Nature 291, 632-635.

Quintard, B., Mouricout, M., Carias, J. R., Julien, R. (1978) Occurrence of aminoacyl tRNA synthetase complexes in quiescent wheat germ. Biochem. Biophys. Res. Comm. 85, 999-1006.

Quivy, J. P., Chroboczek, J. (1988) Tyrosyl tRNA Synthetase from wheat Germ. J. Biol. Chem. 263, 15.277-15.281.

Randerath, K., Janeway, C. M., Stephanson, M. L., Zamecnik, P. C. (1966) Isolation and characterization of dinucleotide tetra- and triphosphates formed in the presence of lysyl sRNA synthetase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 98-105.

Ratinaud, M. H., Thomas, J. C., Julien, R. (1983) Glutamyl-tRNA synthetases from wheat. Eur. J. Biochem. 135, 471-477.

Rossmann, M. G., Moras, D., Olsen, K. W. (1974) Chemical and biological evolution of a nucleotide binding protein. *Nature* 250, 194-199

Ryazanov, A. G., Sipirin, A. S. (1989) Organization of enzymes on intracellular structures - *Biochemistry* 54, 558-563.

Sallafranque, M. L., Robert, D., Barr, P., Fournier, M., Litvak, S., Cottin, L. S., Litvak, L. T. (1989) Human immunodeficiency virus reverse transcriptase expressed in transformed yeast cells. Biochemical properties and interactions with bovine tRNA<sup>lys</sup>. *Eur. J. Biochem.* 184, 367-374.

Schimmel, P. (1989) Parameters for the molecular recognition of transfer RNAs, *Biochemistry.* 28, 2748-2759.

Schimmel, P., Josin, M., Regan, L (1983) Aminoacyl tRNA synthetases: Structure-Function, Regulation and tRNA Recognition. Size Polimorfism and the structure of aminoacyl tRNA synthetases., 2987-2990.

Schimmel, P. (1979) Aminoacyl-tRNA synthetases. General Features and recognition of transfer RNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 601-648.

Schimmel, P. (1987) Aminoacyl-tRNA synthetases: general scheme of structure - function relationship in the polypeptides and recognition of tRNAs. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 125-158.

Siekevitz, P. (1952) Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. J. Biol. Chem. 195, 549-565.

Schulman, L. H., Pelka, H. (1985) In Vitro conversion of a Methionine to glutamine-Acceptor tRNA. Biochemistry 24, 7309-7314.

Springer, M., Plumbridge, J. A., Bluttler, J. S., Graffe, M., Dondon, J. (1985) Autogenous Control of Escherichia coli Threonyl tRNA synthetase expression in vivo. J. Mol. Biol. 185, 93-104.

Srere, P. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. Ann. Rev. Biochem. 56, 89-124.

Srere, P. A., Ovadi, J. (1990) Enzyme-Enzyme interactions and their metabolic role. FEBS Lett., 268, 360-364.

Thompson, S. T., Cass, K. H., Stellwagen, E. (1975) Blue dextran-Sepharose: An affinity column for the Dinucleotide fold in proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 72, 669-672.

Von der Haar, F. (1976) Purification of proteins by fractional interfacial salting-out on unsubstituted agarose gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. 70, 1009-1013.

Waterson, R. M., Clarke, S. J., Kousek, F., Konigsberger, W. H. (1973) Seryl transfer Ribonucleic Acid synthetase from

Escherichia coli. Substrate binding and chemical modification of cysteinyl residues. J. Biol. Chem. 248, 4181.

Webster, G. C. (1957) Amino Acid incorporation by intact and disrupted ribonucleoprotein particles. J. Biol. Chem., 229, 535-546.

Zamecnik, P. C., Rapaport, E., Baril, E. F. (1982) Priming of DNA synthesis by diadenosine 5', 5''', P<sup>1</sup>, P<sup>4</sup> tetraphosphate with a double stranded octadecamer as template and DNA polymerase  $\alpha$ . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 1791-1794.

Zelwer, C., Risler, J. L., Manteilhet, C. (1976) A Low resolution model of crystalline methionyl-transfer RNA synthetase from E. coli. J. Mol. Biol. 102, 93-101.

## RESUMO

As aminoacil tRNA sintetases são enzimas que catalisam o primeiro passo da síntese de proteínas, ou seja, a formação do aminoacil-tRNA. São usados como substratos da reação o L-aminoácido, ATP e o tRNA específico para o referido aminoácido. O íon magnésio participa como estabilizador dos fosfatos carregados negativamente.

O aminoacil-tRNA é o principal produto da reação, sendo também liberada uma molécula de AMP e uma de pirofosfato inorgânico.

Neste trabalho a treonil-tRNA sintetase foi purificada de germen de trigo através de centrifugações diferenciais, saturação com sulfato de amônio e cromatografias em DEAE-celulose, Fosfocelulose, Hidroxiapatita e Blue Sepharose CL 6B. Deste modo, foi obtida uma enzima purificada cerca de 180 vezes.

Usando a reação de intercâmbio isotópico  $\text{ATP-}^{32}\text{PPi}$  para determinação da atividade enzimática foram obtidas as condições ótimas de reação e os seguintes valores de KM aparente:

$$\text{KM ATP} = 5.10^{-5}$$

$$\text{KM Treonina} = 2,7.10^{-3} \text{ M}$$

$$\text{KM PPi} = 1,6.10^{-5}$$

$$\text{KM Mg}^{+2} = 3,3.10^{-3} \text{ M}$$

Foram estudados também os efeitos de análogos de ATP e de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{K}^{+}$  na reação de intercâmbio ATP-PPi.

A treonil-tRNA sintetase de germen de trigo mostrou atividade aminoaciladora em presença do tRNA.

## SUMMARY

Aminoacyl-tRNA synthetases are enzymes that catalyse the first step of protein biosynthesis, the aminoacyl-tRNA formation. The substrates of the reaction are the L-aminoacid, ATP and tRNA, specific for this L-aminoacid.

Magnesium ion participates as the cofactor of the reaction. The products of the reaction are aminoacyl-tRNA, AMP and inorganic pyrophosphate.

In this work, threonyl-tRNA synthetase was purified from wheat germ through differential centrifugations, ammonium sulfate saturation and chromatographies in DEAE-cellulose, Phosphocellulose, Hydroxylapatite and Blue Sepharose CL 6B. An 180-fold purified enzyme was obtained.

Using the ATP-<sup>32</sup>PPi isotopic exchange reaction to determine the enzyme activity, it was obtained the optimal conditions of the reaction, and the apparent KM values:

$$KM \text{ ATP} = 5.10^{-5} \text{ M}$$

$$KM \text{ Threonine} = 2,7.10^{-3} \text{ M}$$

$$KM \text{ PPi} = 1,6.10^{-5} \text{ M}$$

$$KM \text{ Mg}^{2+} = 3,3.10^{-3} \text{ M}$$

The effects of ATP analogues and  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  have also been studied in the ATP-PPi exchange reaction.

Wheat germ threonyl-tRNA synthetase showed an aminoacylation activity in the presence of tRNA.