INCORPORAÇÃO DE AMINOÁCIDOS "IN VITRO" POR UMA FRAÇÃO MICROSOMAL

TESE DE DOUTORAMENTO APRESENTADA AO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - 1972

BAYARDO B TORRES

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo R. Brentani, pela orientação segura e apoio permanente.

Ao Dr. Luís Longhi, pelas micrografias eletrônicas.

À Dra. Augusta Takeda, pelas ultracentrifugações analíticas.

Ao Dr. Marcel Bouquet, pela participação na fase inicial deste trabalho.

A Clarice H. Oda e Lotte Wang, pela colaboração na parte experimental.

À FAPESP, CNPq e FORGE pelos auxílios concedidos.

ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS EMPREGADAS	4
INTRODUÇÃO	5
REAGENTES	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
1. Animais	18
2. Preparação de Membranas	18
3. Preparação de Microsomas	19
4. Preparação de Ribosomas	20
5. Preparação de enzima pH 5	20
6. Condições de incorporação	21
7. Extração do produto para medida de radioatividade	22
8. Medidas de radioatividade	22
a) por cintilador	22
b) por contador de fluxo de gás	23
9. Caracterização da fração de membranas	23
9.1 - Relação RNA/proteína	23
a) dosagem de proteína	23
b) dosagem de RNA	23
9.2 - Análise morfológica	23
9.3 - Ultracentrifugação analítica	24
10. Controle da contaminação bacteriana	24
a) com antibióticos	24
b) por plaqueamento	24
11. Características do produto	25
a) remoção de aminoácidos N-terminais	25
b) remoção de aminoácidos C-terminais	26
c) tratamento enzimático	26

Pág.

RESULTADOS 28

A - Características da partícula 28
1. Relação RNA/proteína 28
2. Morfologia 28
3. Ultracentrifugação analítica 33

B - Características do processo de incorporação 33
1. Efeito do tempo 33
2. Efeito da concentração de membranas 36
3. Efeito de temperatura 37
4. Efeito da concentração de Mg 38
5. Efeito do pH 40
6. Efeito do sistema regenerador de energia 41
7. Efeito de GTP 45
8. Efeito de enzima pH 5 46
9. Incorporação de diferentes aminoácidos 46
10. Efeito de inibidores 47
11. Controle bacteriológico 49

C - Características do produto 50
1. Ação de enzimas 50
2. Remoção de aminoácidos N-terminais 53
3. Remoção de aminoácidos C-terminais 54

DISCUSSÃO 55

RESUMO 65

BIBLIOGRAFIA 67

ABREVIATURAS

ADP	- adenosina 5'-difosfato
AMP	- adenosina 5'-monofosfato
ATP	- adenosina 5'-trifosfato
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DNase	- desoxirribonuclease
DNFB	- 2,4 dinitrofluorbenzeno
DOC	- desoxicolato de sódio
GMPPCP	- 5'-guanilil-metileno-difosfonato
GTP	- guanosina 5'-trifosfato
GTPase	- guanosina trifosfatase
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (forma reduzida)
PCA	- ácido perclórico
PEP	- ácido fosfoenolpirúvico
poli U	- ácido poliuridílico
POPOP	- 1,4-bis-2(4-metil-5-feniloxazolil) benzeno
PPO	- 2,5-difeniloxazol
RNA	- ácido ribonucleico
mRNA	- ácido ribonucleico mensageiro
rRNA	- ácido ribonucleico ribosômico
tRNA	- ácido ribonucleico de transferência
RNase	- ribonuclease
TCA	- ácido tricloroacético
Tris	- tris (hidroximetil) aminometano

INTRODUÇÃO

Quando SANGER apresentou os primeiros resultados do estudo sobre a sequência de aminoácidos constituintes da insulina (SANGER, 1950), foram descartadas as hipóteses de serem as proteínas simples repetições de certas sequências de aminoácidos, sintetizadas por um processo inverso ao da proteólise (BERGMANN,1942). Deveria, portanto, existir um conjunto de enzimas específicas para a formação da cadeia polipeptídica, diferentes daquelas utilizadas em sua degradação (LOFTFIELD, GROVER & STEPHENSON, 1953).

Como os modelos propostos até então (LIPMANN, 1949) não previam a alta especificidade de ordenação dos aminoácidos verificada para a insulina , passou-se à tentativa de obter um sistema sub-celular capaz de promover, "in vitro", a incorporação de aminoácidos em proteínas.

Os primeiros resultados foram obtidos com a utilização de homogenatos totais de tecidos, incubados com aminoácidos radioativos (WINNICK, FRIEDBERG & GREENBERG, 1948; BORSOOK, DEASY, HAAGEN-SMIT, KEIGHLEY & LOWY, 1949 e 1949a; ZAMECNIK, 1953).

Por outro lado, as tentativas de localizar a sede celular da síntese proteica, por meio da administração "in vivo" de precursores radioativos, indicavam que a fração denominada microsoma (CLAUDE, 1943) era a mais ativa nesse processo (HULTIN, 1950; BORSOOK, DEASY, HAAGEN-SMIT, KEIGHLEY & LOWY, 1950a; KELLER ,

1951). Posteriormente, os microsomas foram identificados como fragmentos de ergastoplasma (PALADE & SIEKEVITZ, 1956 e 1956a), descrito anteriormente (SJOSTRAND & HANZON, 1954; PORTER, 1955; PALADE, 1955).

Quando o microsoma era fracionado com DOC, após a injeção de aminoácidos marcados com C^{14} no animal, a radioatividade era preferencialmente encontrada na porção solúvel (LITTLEFIELD, KELLER, GROSS & ZAMECNIK, 1955), constituída por grânulos citoplasmáticos de constituição ribonucleoproteica, reconhecidos como sendo aqueles descritos por PALADE (1955) e que foram chamados de ribosomas (ROBERTS, 1958).

Localizada a sede da síntese proteica, a melhor compreensão de seu mecanismo só poderia ser alcançada pela reconstituição do processo "in vitro", o que permitiria a análise dos seus componentes ativos e das possíveis variáveis que nele interferem.

Foram feitas algumas tentativas de fracionamento do homogenato de tecidos (BORSOOK, DEASY, HAAGEN-SMIT, KEIGHLEY & LOWY, 1950), até que se pudesse chegar a um sistema onde se utilizassem frações celulares mais ou menos purificadas, como promotoras da incorporação de aminoácidos "in vitro" (SIEKEVITZ & ZAMECNIK, 1951 ; SIEKEVITZ, 1952).

A atividade das frações celulares está na dependência direta do processo adotado para o rompimento da estrutura histológica. Quando se estabeleceram técnicas adequadas para a homogenização do tecido (BUCHER, 1953), foi possível obter um sistema que apresentava um nível de incorporação muito mais alto que os anteriores e fornecia resultados reprodutíveis (ZAMECNIK, 1953). Verificou-se que, nessas condições, a incorporação de aminoácidos dependia da adição de ATP e de um sistema regenerador de ATP ao meio de incubação (ZAMECNIK & KELLER, 1954).

O sistema sub-celular assim constituído era formado de duas frações: o microsoma e uma porção solúvel, termolábil e não dialisável. O componente solúvel continha as enzimas capazes de catalisar a ativação específica dos aminoácidos (HOAGLAND, 1955). Quando a fração solúvel era substituída pelo seu componente precipitável a pH 5,2 - a chamada "enzima pH 5" - o sistema perdia a atividade, que podia, no entanto, ser restabelecida, se fosse adicionado GTP à mistura de incubação (HOAGLAND, KELLER & ZAMECNIK, 1956). Mais tarde, foi demonstrado que a enzima pH 5 continha um tipo de RNA, chamado RNA de transferência ou tRNA, ao qual o aminoácido se ligaria, antes de ser transferido para a proteína do microsoma (OGATA & NOHARA, 1957; HOLLEY , 1957; HOAGLAND, STEPHENSON, SCOTT, HECHT & ZAMECNIK , 1958). A enzima pH 5 passou a ser habitualmente empregada em estudos de incorporação de aminoácidos "in vitro", embora tenha sido demonstrado ser possível a sua substituição por uma solução de aminoacil-tRNA (ZAMECNIK, STEPHENSON & HECHT, 1958).

A integridade microsômica também não era indispensável à síntese, pois um dos componentes dessa fração, os ribosomas, demonstraram grande atividade sintética "in vitro" (LITTLEFIELD, KELLER, GROSS & ZAMECNIK, 1955 ; ZAMECNIK, KELLER, LITTLEFIELD & HOAGLAND, 1956).

Estava assim, basicamente caracterizado o sistema, atualmente clássico, de síntese proteica "in vitro".

A partir da constituição básica do meio de incubação necessário para a síntese proteica "in vitro", foram estabelecidos outros sistemas, utilizando variações de composição, segundo a necessidade da investigação pretendida. Descreveram-se inúmeros sistemas

acelulares, contendo como entidades promotoras da síntese proteica: mitocôndrias de levedo (WINTERSBERGER , 1965; CLARK-WALKER & LINNANE, 1966), mitocôndrias de mamífero (COLLI, 1966), núcleos vegetais (BIRNSTIEL , CHIPCHASE & HAYES, 1962) e animais (ALLFREY, 1963), subfrações nucleares (ZIMMERMAN, HACKNEY, NELSON & ARIAS , 1969; McCARTY, PARSONS, CARTER & LASZLO, 1966), ribosomas nucleares (FRENSTER, ALLFREY & MIRSKY, 1961; WANG , 1961), nucléolos vegetais (BIRNSTIEL & HYDE, 1963) e animais (REES, ROWLAND & VARCOE, 1963) e cloroplastos (STEPHENSON, THIMANN & ZAMECNIK, 1956).

Grande parte do conhecimento atual sobre o mecanismo de biossíntese proteica foi originado pela enorme quantidade de trabalhos realizados com microrganismos depois de ter sido obtido o primeiro sistema subcelular de Escherichia coli capaz de incorporar aminoácidos "in vitro" (LAMBORG & ZAMECNIK, 1960).

A contribuição que os estudos com partículas isoladas têm fornecido ao conhecimento dos mecanismos biossintéticos é, sem dúvida, excepcional. Apesar disso, pode-se discutir em que medida essa técnica reflete o processo fisiológico de síntese proteica.

Os sistemas acelulares apresentam apenas cerca de 1% ou 0,1% da capacidade sintética de uma célula integra (HENDLER, 1957; TISSIÈRES, SCHLESSINGER & GROSS, 1960). Pode ocorrer, portanto, que as propriedades examinadas "in vitro" não sejam totalmente representativas da atividade da célula intacta.

Nos sistemas acelulares, o aminoácido radioativo, cuja incorporação é sempre o parâmetro da capacidade sintética, tem acesso direto à partícula promotora da síntese, acarretando um aparecimento de proteína marcada, cuja concentração cresce linearmente com o tempo. Tal não parece ser a situação "in vivo", onde

existe um "pool" de aminoácidos, do qual o marcador deve obrigatoriamente participar, antes de alcançar a maquinária enzímica de síntese. Essa condição foi verificada tanto para mamífero (KIPNIS, REISS & HELMREICH, 1961) quanto para levedo (HALVORSON & COHEN, 1958) e bactéria (COWIE & McCLURE, 1959). Uma vez que a habilidade de ativação de aminoácidos por um tecido não reflete a composição em aminoácidos das proteínas por ele sintetizadas, pode-se admitir a existência de um controle ao nível do acesso do aminoácido ao local de sua utilização para síntese (HENDLER, 1962).

Realmente, os estudos que pretendam reproduzir mais fielmente a atuação fisiológica dos ribosomas, por exemplo, quanto ao processo biossintético, devem levar em consideração a íntima associação verificada "in vivo", entre essas organelas e as membranas lipoproteicas do retículo endoplasmático.

Trabalhos de microscopia eletrônica feitos em fígado e pâncreas de rato demonstraram que, nesses tecidos, podem ser observados ribosomas em duas situações diferentes: associados a membranas lipoproteicas ou livres, formando pequenos aglomerados (PALADE & SIEKEVITZ, 1956 e 1956a) presumivelmente ligados por RNA mensageiro (BARONDES & NIREMBERG, 1962),constituindo o agregado chamado polirribosoma ou polisoma (WARNER , KNOPF & RICH, 1963). Essas duas populações de ribosomas constituem dois compartimentos celulares diferentes.

As preparações de ribosomas, quando testadas "in vitro", nas condições necessárias à síntese de proteínas, algumas vezes mostram-se inativas. Tal é o caso de preparações de ribosomas de fígado de rato que são virtualmente inertes na incorporação de fenilalanina. Essa inatividade não indica uma deficiência da partícula, mas é devida somente à ausência de RNA mensageiro, pois esses ribosomas atingem níveis altos de incorporação na presença de poli U (HENSHAW, BOJARSKI & HIATT, 1963). Realmente, as partículas com pequena atividade endógena

respondem sempre à adição do mensageiro externo (GROS et alli, 1961; BRENNER, JACOB & MESELSON , 1961 ; ARNSTEIN, COX & HUNT, 1962).

Portanto, a atividade apresentada pela preparação "in vitro" e a capacidade de resposta à adição de poli U são, respectivamente, funções direta e inversa do conteúdo de RNA endógeno carregado pelas partículas durante o seu processo de isolamento (FLORINI & BREUER, 1965).

Em células desprovidas de retículo endoplasmático, como os reticulócitos, o trabalho sintéti - co é cumprido por polisomas isolados, como ficou demonstrado para a fabricação de uma proteína específica, a hemoglobina (WARNER, RICH & HALL, 1962).

Os compartimentos celulares constituídos por ribosomas livres e ribosomas associados à membrana do retículo endoplasmático não são inteiramente independentes, havendo um equilíbrio dinâmico entre as duas situações em que podem ser encontradas as partículas ribonucleoproteicas (MANGANIELLO & PHILLIPS, 1965). Sendo assim, não haverá diferença constitutiva entre as membranas do retículo rugoso (às quais encontram-se agregados os ribosomas) e do retículo liso (carentes daquela partícula), tratando-se, apenas, de dois estados funcionais da mesma entidade. Apoiando essa idéia,existem numerosos dados experimentais que indicam a uniformidade estrutural das membranas componentes do retícu - lo endoplasmático (HINNAN & PHILLIPS, 1970).

Sabe-se, entretanto, que a atividade fisiológica dos ribosomas pode estar na dependência de sua ligação ao componente de membrana do retículo. A capacidade sintética relacionada à produção de uma proteína específica, pode ser encontrada como uma particularidade de um dos tipos de ribosomas. Por exemplo: os

ribosomas associados de fígado de rato parecem ter a capacidade de sintetizar proteína sérica (GANOZA & WILLIAMS, 1969), identificada como albumina (TAKAGI & OGATA, 1968; TAKAGI, TANAKA & OGATA, 1970), enquanto que ribosomas livres não exibem essa atividade. Por outro lado, a síntese de ferritina está ligada à atividade de ribosomas livres (HICKS, DRYSDALE & MUNRO,1969; REDMAN , 1969).

Ainda que algumas proteínas, como NADPH-citocromo c redutase, possam ser produzidas em mais do que um compartimento celular (RAGNOTTI, LAWFORD & CAMPBELL, 1969), isto talvez possa ser explicado pela hipótese que prevê a existência de iso-enzimas, naturalmente codificadas por diferentes mRNAs, como verificado para o caso da catalase (TAKAGI, TANAKA & OGATA , 1970).

A essas indicações de diferenças funcionais entre as duas classes de ribosomas, soma-se a sensibilidade diferencial que apresentam frente a vários inibidores de síntese proteica, mostrando-se sempre uma diminuição mais severa no processo sintético dos ribosomas associados (GLAZER & SARTORELLI, 1972).

A identificação de proteínas diferentes feitas em compartimentos diversos e a verificação de seu destino metabólico, levou à hipótese de que os ribosomas associados estariam relacionados com a produção de proteínas de exportação, enquanto que os livres sintetizariam proteínas de consumo interno pela célula produtora (HICKS, DRYSDALE & MUNRO, 1969).

Ainda que confirmada, essa proposição deve apresentar exceções, pois mesmo em tecidos não secretores, como o tecido nervoso de cérebro, há ribosomas associados que sintetizam proteínas ativamente (ANDREWS & TATA, 1968; MURTHY, 1972).

Também em organismos bacterianos, onde não existe um retículo endoplasmático diferenciado, as membranas, representadas unicamente pela membrana plasmática , continuam exercendo papel importante no processo de síntese proteica (BUTLER, CRATHORN & HUNTER, 1958; HALLBERG & HAUGE, 1965). De fato, em tais células, os ribosomas tendem a justapor-se à superfície interna das membranas (HENDLER, BANFIELD, TANI & KUFF, 1964), constituindo polirribosomas associados (SCHLESSINGER, 1963). Embora possam ser encontrados também polisomas livres, os associados constituem a fração mais ativa na incorporação de aminoá - cidos (HENDLER & TANI, 1964). Essa diferença de atividade acentua-se quando a medida da captação do precursor radioativo é feita em tempos curtos. Nessas condições, obtém-se resultados indicando que o local inicial da síntese proteica restringe-se aos polirribosomas associados (HAUGE & HALVORSON, 1962).

Um fator possível de resultados artificiais nessas investigações parece ser o método usado no rompi - mento do tecido ou células em estudo. Quanto menos drás - ticas são as operações realizadas no rompimento das células e na manipulação das partículas, maior parece ser a capacidade sintética dos ribosomas associados, em relação aos livres (TANI & HENDLER, 1964).

Todos esses resultados levantam a questão de como seriam "programados" os polisomas que se ligariam à membrana para fazer proteínas de exportação, enquanto os outros permanecem livres. Ora, a informação para o tipo de proteína a ser sintetizada está contida no mRNA. Portanto, a situação livre ou associada do poliso - ma também é determinada pelo mRNA. Podemos prever que essa determinação seja cumprida de uma entre duas manei - ras.

Ou os polisomas formados no citoplasma (e que contem um mRNA para proteínas de exportação) podem re

conhecer pontos de ligação às membranas que outros polisomas não identificam ou o próprio mRNA está ligado à membrana (REDMAN, 1969).

A presença de RNA na membrana do retículo endoplasmático foi sugerida a partir das primeiras tentativas de caracterização desse componente celular (CHAUVEAU, MOULÉ & ROUILLER, 1957; REID & STEVENS, 1958). As controvérsias posteriores, em relação à existência dessa espécie de RNA, parecem ter sido causadas pelos métodos empregados na sua extração. As técnicas clássicas de isolamento de RNA de tecidos ou frações celulares propõem uma extração preliminar, a frio, de compostos solúveis em ácidos diluídos, seguida pela solubilização de lipídios em solventes orgânicos. A partir do resíduo insolúvel, faz-se a dosagem do RNA (SCHMIDT & THANNHAUSER, 1945; SCHNEIDER, 1945). Essa método, entretanto, parece fornecer um rendimento insatisfatório, pois vários autores descrevem uma solubilização parcial de RNA no solvente orgânico acidificado (VENKATARAMAN & LOWE, 1959; VENKATARAMAN , 1960 ; HALLINAN, FLECK & MUNRO, 1963; STEELE, OKAMURA & BUSCH , 1964) e é, talvez por essa razão, que a procura de RNA em membranas teve, algumas vezes, resultados negativos (SHAPOT & DAVIDOVA, 1971).

Pela adoção de métodos mais apropriados, a presença de RNA em membranas está, hoje, bem documentada , tanto para células de mamíferos (SACHS, 1958; GOSWAMI , BARR & MUNRO, 1962; SHAPOT & PITOT, 1966; RODIONOVA & SHAPOT, 1966; GARDNER & HOAGLAND, 1968; TULEGENOVA , RODIONOVA & SHAPOT, 1968) como para células bacterianas , onde pode-se encontrar uma fração intimamente associada à membrana plasmática (VENNES & GERHARDT, 1956, WEIBULL & BERGSTRÖM, 1958; GODSON, HUNTER & BUTLER, 1961; ABRAMS & McNAMARA, 1962). Há também evidências da presença de RNA em membranas nucleares (KASHNIG & KASPER, 1969).

Os estudos de caracterização do RNA de mem-

brana mostram que se trata de uma fração especial, não encontrável em outros compartimentos celulares (GARDNER & HOAGLAND, 1968) e diferente, portanto, de RNA ribosômico ou RNA transportador (TULEGENOVA, RODIONOVA & SHAPOT , 1968). A hipótese de uma possível contaminação da fração de membrana por rRNA é afastada pela verificação da existência de RNA em membranas do retículo liso (SHAPOT & PITOT, 1966) e pela insensibilidade que esse particular RNA apresenta à ação de RNase (SHAPOT & PITOT, 1966; ITO & SATO, 1968). Além disso, por centrifugação em gradiente de sacarose, o RNA de membrana resolve-se em três picos, nenhum dos quais se superpõe aos de rRNA usado como marcador (SHAPOT & DAVIDOVA, 1971).

A atividade biológica do RNA de membrana não está esclarecida. Algumas tentativas de isolamento de mRNA de microrganismos forneceram indicações de que uma fração desse RNA é encontrado em íntima associação com a membrana plasmática de células em fase de crescimento (YUDKIN & DAVIS, 1965) ou de esporos (ARONSON, 1965) . Essa RNA apresenta também intensa atividade metabólica, a julgar pela atividade específica que apresenta quando é isolado de uma cultura bacteriana, à qual foi dado um pulso de precursor radioativo (SUIT, 1962; SUIT , 1963; ABRAMS, NIELSEN & THAEMERT, 1964). Em células de mamífero, o RNA de membrana, associado ao retículo endoplasmático, também caracteriza-se por ser rapidamente marcado (PETROVIĆ, BEĆAREVIĆ & PETROVIĆ, 1965). E, tanto em procariotos quanto em eucariotos, a proporção das bases constituintes dessa espécie de RNA assemelha-se à proporção das bases do DNA (SUIT, 1963; YUDKIN & DAVIS, 1965; PETROVIĆ, BEĆAREVIĆ & PETROVIĆ, 1965).

Em todos os casos estudados, há sempre a indicação da grande estabilidade obtida pela associação do RNA a membranas lipoproteicas mas não se tem ainda dados suficientes para verificar se esta estabilidade é devida aos mesmos fatores que mantém estáveis os mRNAs componentes de polisomas associados ao retículo endoplasmático (WILSON, HILL & HOAGLAND, 1967).

Uma indicação mais significativa da atividade biológica dessa fração de RNA foi obtida pelo estudo de sua influência sobre um sistema acelular de síntese proteica. Em condições adequadas à síntese "in vitro", a adição de RNA de membrana provoca uma estimulação de até 100% na capacidade de incorporação de aminoácidos radioativos por uma preparação de ribosomas (KING & FITSCHEN, 1968) ou de microsomas (BRENTANI, BRENTANI, BOUQUET & RAW, 1968).

É importante notar que uma preparação de microsomas conserva a capacidade de incorporação de aminoácidos, mesmo na ausência de enzima pH 5 (RAPPOPORT & MURTHY , 1964), constituindo esse fato uma clara indicação da existência de enzimas de ativação do aminoácido intimamente / associadas a membranas do retículo. A presença de aminoacil sintetases em membranas é fortemente sugerida também pelo fato de ser a fração rica em membranas a única, das frações obtidas após o rompimento da estrutura celular, capaz de promover a ativação dos 21 aminoácidos normalmente constituintes das proteínas (McCORQUODALE & ZILLIG, 1959). A ativação de aminoácidos por membranas parece ser, de fato, um fenômeno natural tanto em procariotos (HUNTER, BROOKES , CRATHORN & BUTLER, 1959; ROBERTS, BENSCH & CARTER, 1964 ; BUBELA & HOLDSWORTH, 1966) quando em eucariotos (RAPPOPORT & MURTHY, 1964; NORTON, KEY & SCHOLES, 1965).

Pelos dados apresentados e pelas hipóteses propostas pelos autores que têm trabalhado nesse campo, torna-se claro que todas as investigações até aqui realizadas realçam enfaticamente a importância de membranas, sob o aspecto qualitativo ou quantitativo na produção de proteínas pela célula viva.

Partindo desse enfoque e tendo em vista a constatação da existência de um RNA particular associado a membranas, a sugestão de sua função como mensageiro, a capacidade de ativação de aminoácidos que a membrana parece ter e as sugestões da capacidade sintética desta fração isolada (GALE & FOLKES, 1955; BUTLER, CRATHORN & HUNTER, 1958 ;

WACHSMANN, FUKUHARA & NISMAN, 1960; HALLINAN & MUNRO , 1965), o objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade de incorporação de aminoácidos por uma fração purificada de membranas derivadas do retículo endoplasmático de fígado de rato.

REAGENTES

L-leucina, L-fenilalanina (uniformemente marcadas com C^{14}) e L-glicina, L-prolina e L-lisina (uniformemente marcadas com H^3) e apresentando atividade específica de 175 mC/mM foram fornecidas por Schwarz BioResearch.

Proteínas hidrolisadas de levedo (com marcação uniforme por C^{14}) também fornecidas por Schwarz BioResearch.

L-leucina, L-fenilalanina, L-prolina, ATP, GTP, albumina, piruvato quinase tipo II, DNase, lipase, I, lecitinase A, pronase e tripsina foram adquiridos de Sigma Chem. Corp.

Ribonuclease e α-amilase foram obtidas de Worthington Biochemical Corp.

Fosfato de creatina e creatinofosfoquinase foram adquiridos de C.F. Boehringer & Soehne.

GMPPCP foi proveniente de Miles Laboratories, Inc.

Ácido fusídico e anisomicina foram fornecidos por Cancer Chemotherapy National Service Center.

DOC foi proveniente de Merck (Darmstadt).

PPO e POPOP foram obtidos de Packard Inst. Co.

Os demais reagentes empregados foram todos pró-análise.

Os solventes orgânicos e a água utilizada no preparo de soluções foram bidestiladas no laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos da raça Wistar, de ambos os sexos, fornecidos pelo biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O peso médio dos animais era de 200 gramas.

2. Preparação de Membranas

Os animais eram sacrificados por concussão cerebral e os fígados rapidamente removidos, colocados em um banho de gelo e picados com tesoura de pontas finas. Todas as operações subsequentes eram efetuadas entre 0 e 4°C. Os fígados eram homogeinizados / com 5 volumes de sacarose 0,25 M com o auxílio de um homogeinizador tipo Potter, equipado com pistilo de teflon, adaptado a um motor elétrico de baixa rotação. No momento da homogeinização, não se faziam mais do que 5 movimentos com o copo do homogeinizador. A suspensão assim obtida era centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g em uma centrífuga Sorvall RC-2B e o precipitado, desprezado. A porção superior do sobrenadante, contendo uma camada gordurosa era retirada por meio de uma pipeta de Pasteur adaptada a uma trompa de vácuo e também descartada. O restante do sobrenadante era transferido do tubo de centrífuga para um béquer, depois de ter sido medido o seu volume. A este sobrenadante era adicionado o volume conveniente de uma solução de desoxilato de sódio (DOC) 2,6% - recém preparada por dissolução do sal em sacarose 0,25 M - de modo a obter-se concentração final de 0,26% em DOC. A adição era feita vagarosamente e sob agitação contínua. A suspensão assim obtida era, a seguir, centrifugada em rotor 50 Ti, a

105.000 x g, por 120 minutos na centrífuga Spinco, modelo L. Obtinha-se, após a centrifugação, um precipitado compacto (fração P) recoberto por uma camada gelatinosa (fração Mb) e um sobrenadante de aspecto homogêneo, cuja porção superior era constituída por uma camada flutuante de lipídios. Novamente com auxílio de uma pipeta de Pasteur acoplada a uma bomba de vácuo, o sobrenadante era retirado e a camada gelatinosa, cuidadosamente decantada, de modo a não arrastar parte da fração P.

Esta operação era facilitada pelo fato, já mencionado, de ser a fração P bastante compacta e aderida às paredes do tubo, enquanto a fração Mb apresentava-se pouco agregada e pouco aderida à primeira. Como medida de precaução, retiravam-se apenas os 2/3 superiores da camada gelatinosa. Esta porção era homogeinizada em homogeinizador manual, tipo Potter, em meio A (Tris-HCl 0,03 M, pH 7,4 com $MgCl_2$ 5 mM, KCl 80 mM e NaCl 50 mM), adicionado até restabelecer o volume do sobrenadante original, a partir do qual se obteve a fração Mb. Esta suspensão era novamente centrifugada no rotor 50 Ti, por 90 minutos, a 105.000 x g na centrífuga Spinco, modelo L e dava origem a um sobrenadante que era desprezado e a um precipitado constituído por membranas. Este precipitado era suspenso em meio B (Tris-HCl 0,045 M, pH 7,5 com $MgCl_2$ 7,5 mM, KCl 120 mM e NaCl 75 mM) em volume correspondente à concentração desejada para os diferentes testes a serem realizados.

O método de preparação adotado é uma modificação do procedimento descrito por ERNSTER, SIEKEVITZ & PALADE (1962).

3. Preparação de Microsomas

A homogeinização dos fígados era feita nas mesmas condições descritas para o preparo de membranas. O homogenato era centrifugado a 10.000 x g em uma

centrífuga Sorvall RC-2B por 10 minutos. O sobrenadante obtido (desprezando-se o terço superior, constituído por uma camada gordurosa) era centrifugado no rotor 50 Ti, por 60 minutos, a 105.000 x g em uma centrífuga Spinco, modelo L. O precipitado formado constituía a fração de microsomas, que era suspensa em meio B, em volume conveniente para obter-se a concentração deseja - da.

A técnica adotada é baseada também no método de ERNSTER, SIEKEVITZ & PALADE (1962).

4. Preparação de Ribosomas

O procedimento inicial era análogo ao adotado para o preparo de membranas e microsomas. O sobrenadante resultante da centrifugação a 10.000 x g era tratado com solução de DOC a 5%, de volume conveniente para obter-se a concentração final igual a 0,5%. A suspensão assim obtida era centrifugada por 120 minutos no rotor 50 Ti, a 105.000 x g em centrífuga Spinco, modelo L. O precipitado era suspenso manualmente em meio A, em um volume igual ao do sobrenadante de 10.000 x g e a seguir novamente centrifugado por 90 minutos, em condições semelhantes às anteriores. O precipitado obtido era então suspenso em meio B, para a concentração desejada.

Esta foi a técnica adotada por Brentani (1969).

5. Preparação de enzima pH 5

A homogeinização dos fígados era feita nas mesmas condições descritas para o preparo de membranas. O homogenato era centrifugado em uma centrífuga Sorvall RC-2B por 10 minutos. O sobrenadante obtido era então centrifugado no rotor 50 Ti, por 60 minutos, a 105.000 x g, em uma centrífuga Spinco, modelo L. O precipitado era desprezado e o sobrenadante, levado a pH 5,2 por adição lenta e sob agitação de ácido acético 1 N. Nessa acidificação formava-se um precipitado, re-

colhido centrifugando-se a suspensão a 5.000 x g em Sorvall RC-2B por 10 minutos. O sobrenadante era desprezado. O precipitado constitui a chamada "enzima pH 5", que antes de ser utilizada, era suspensa em solução de sacarose 0,25 M, de modo a obter-se a concentração desejada. O método adotado é, com pequenas alterações, o descrito por KELLER & ZAMECNIK (1956).

6. Condições de incorporação

Para os estudos de incorporação de aminoácidos marcados, "in vitro", a fração de membranas , salvo especificação em contrário, era suspensa em meio B e incubadas em volume final de 1 ml a 37° C, em um banho tipo Dubnoff, com agitação constante. A composição do meio de incubação variava de acordo com o tipo de investigação pretendida. Quando o teste a ser realizado não se referia a nenhum dos componentes da mistura (como no caso do efeito de temperatura, remoção de aminoácidos terminais, etc.), o meio de incubação tinha a seguinte composição, por ml: 3,75 umoles de Tris, 0,5 umoles de ATP, 6 umoles de $MgCl_2$, 20 umoles de fosfato de creatina, 1 mg de creatinofosfoquinase, 31,25 umoles de sacarose, 12 umoles de KCl, 7,5 umoles de NaCl, 1 mg de proteína e o aminoácido marcado, geralmente leucina C^{14}, em quantidade equivalente a 0,1 uMol. Muitas incorporações foram realizadas utilizando proteínas hidrolisadas de levedo, marcadas também com C^{14}, em lugar de apenas um aminoácido. Em vários testes foram usados, como sistema regenerador de ATP , 1,5 mg de ácido fosfoenolpirúvico e 0,005 ml de suspensão de piruvatoquinase, em lugar do conjunto fosfato de creatina + creatinofosfoquinase.

Da mistura de incubação tomavam-se a intervalos regulares, em geral de 5 minutos, alíquotas de 0,12 ml, que eram pipetadas sobre discos de papel Whatman 3M.

7. Extração do produto para medida de radioatividade

As amostras retiradas do meio de incubação eram recebidas sobre discos de papel Whatman 3M, presos a alfinetes de cabeça. Os discos eram expostos a jato de ar quente por 30 segundos e a seguir, imersos em uma solução de TCA 10%, contendo 0,2 % do isótopo não radioativo do aminoácido marcado que havia sido utilizado na mistura de incubação. Depois de um intervalo aproximado de 12 horas, os filtros recebiam uma série de lavagens, seguindo a seguinte ordem:

a. TCA 5%, a 0 °C, por 15 minutos
b. TCA 5%, a 90 °C, por 30 minutos
c. TCA 5%, a 0 °C, por 5 minutos
d. mistura álcool-éter (1:1, v/v), a 37°C por 30 minutos
e. mistura álcool-éter (1:1, v/v), a temperatura ambiente por 5 minutos
f. éter, a temperatura ambiente, por 15 minutos

Todas as lavagens eram feitas em volumes de ácidos ou solventes orgânicos equivalentes a 3 ml por filtro.

Este método foi descrito por MANS & NOVELLI (1961).

8. Medidas de radioatividade

a) Por cintilador

Os discos de papel, contendo as amostras do meio de incubação, depois de terem sofrido as lavagens descritas, eram colocados em frascos de cintilação, aos quais acrescentavam-se 5 ml de líquido de cintilação (tolueno contendo 0,01% de POPOP e 0,4% de PPO). O tolueno utilizado na solução era previamente resfriado a -20°C e filtrado em lã de vidro para remover a água

contaminante. A radioatividade era medida em um cintilador Beckman, cuja eficiência era aproximadamente de 60% para H^3 e 90% para C^{14}.

b) Por contador de fluxo de gás

As amostras, dissolvidas em água, éter ou ácido fórmico, eram colocadas em placas de plástico e levadas a uma estufa a 150° C para secar. Algumas vezes, a secagem era feita sob lâmpada. A radioatividade dessas placas era medida em um contador Nuclear-Chicago, com fluxo de gás.

9. Caracterização da fração de membranas

9.1 - Relação RNA/proteína

a) Dosagem de proteínas

O conteúdo em proteínas das suspensões particuladas e de enzima pH 5 foi determinado pelo método de LOWRY, ROSEBROUGH, FARR & RANDALL (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão.

b) Dosagem de RNA

As dosagens de RNA foram feitas pelo método de DISCHE & SCHWARZ (1955), utilizando-se ribose como padrão.

9.2 - Análise morfológica

Os precipitados de fração Mb foram retirados dos tubos de centrífuga e rapidamente mergulhados em glutaraldeído 2,5% pH 7,2, contendo sacarose e mantidos gelados durante 2 horas. Após lavagem em salina-sacarose, o material, reduzido a pequenos fragmentos, foi colocado em solução de tetróxido de ósmio 1%, contendo sacarose, durante 30 minutos. Depois de lavado em água destilada, foi mergulhado em solução de acetato de urâ-

nio 2% e mantido em geladeira durante 18 a 20 horas. O material foi desidratado na série crescente de álcoois (50-70-90-95-absoluto), mergulhado em óxido de propileno e incluído em araldite, segundo técnica de rotina em microscopia eletrônica. Obtiveram-se cortes finos que foram corados em citrato de chumbo e acetato de uranila e observados em microscópio Zeiss, modelo EM 9 e fotografados com 20.000 e 40.000 aumentos.

9.3 - Ultracentrifugação analítica

Para a corrida na ultracentrífuga analítica, a fração Mb foi suspensa em meio B sem conter Mg. A essa suspensão foi adicionado DOC 13%, de modo a obter-se concentração final da solução igual a 10 mg para proteína e 1,3% para DOC. Como controle, utilizou-se uma suspensão da fração P, que recebeu idêntico tratamento. As centrifugações foram realizadas em uma Ultracentrífuga analítica Beckman, modelo E, no rotor An-D, a 19.160 rotações por minuto.

10. Controle de contaminação bacteriana

a) Incubação em meio contendo antibióticos

A fração de membranas foi incubada, em presença do aminoácido radioativo, no meio habitualmente utilizado acrescido de 150 U de penicilina por ml e estreptomicina na proporção de 200 ug por ml.

b) Por plaqueamento

Em tempos diferentes, durante a incubação, foram retirados 0,1 ml de amostra do meio de incubação e diluídos em 9,9 ml de água. Desta suspensão, foram retirados volumes de 0,1 ml que foram plaqueados em placas de agar-comum. Depois de 24 horas de incubação em estufa a 37 ^{o}C, foram contadas as colônias desenvolvidas.

11. Características do produto

a) Remoção de aminoácidos N-terminais

Após permanecer por 30 minutos a 37 °C, a mistura de incubação foi precipitada em PCA 7,5% a 0 °C contendo 0,2% do isótopo não radioativo do aminoácido marcado utilizado no meio de incubação. O precipitado foi lavado com TCA 5% a frio, TCA 5% a 90 °C por 30 minutos, TCA 5% a frio, mistura álcool-éter (3:1, v/v) e éter. O resíduo obtido foi seco em estufa a 40 °C por 12 horas. 10 mg deste resíduo foram dissolvidos em KOH 1 N e o pH, ajustado para 8,0 com H_2SO_4. A essa mistura, adicionaram-se 2 ml de etanol, 100 mg de $NaHCO_3$ e 0,1 ml de 2,4 dinitrofluor-benzeno. A mistura permaneceu por 24 horas, no escuro, sob agitação. Depois, foi precipitada com 0,5 ml de TCA 50% e o precipitado, lavado em etanol, éter e seco em estufa a 40 °C. A seguir, foi dissolvido em 0,1 ml de ácido fórmico e à solução acrescentaram-se 5 ml de HCl 6 N. A mistura foi colocada em ampola de vidro, selada a vácuo, que permaneceu a 105 °C, por 24 horas. O hidrolisado foi diluído com 5 ml de água e extraído 3 vezes com 10 ml de éter. As fases aquosa e etérea foram concentradas sob lâmpada e finalmente secas em placas de plástico para contagem de radioatividade.

Quando o volume da fase etérea estava reduzido a cerca de 0,5 ml, foi retirada uma amostra para cromatografia em camada delgada. A cromatografia foi realizada em placa de vidro de 20x20 cm, recoberta com uma camada de 0,25 mm de espessura de Silica Gel G. Foi aplicado nessa placa um volume de 30 ul. A cromatografia ascendente foi desenvolvida usando-se como solvente, uma mistura de clorofórmio, metanol e ácido acético, na proporção de 95:5:1. O tempo de desenvolvimento foi aproximadamente de 40 minutos. As placas foram secas a temperatura ambiente e o cromatograma foi revelado por iluminação com luz ultravioleta. O método utilizado para a remoção de aminoácidos N-terminais é, basicamente, o descrito por SUTTIE (1962).

b) Remoção de aminoácidos C-terminais

Após permanecer por 30 minutos a 37 °C, a mistura de incubação foi precipitada com PCA 7,5%, contendo 0,2% do isótopo não radioativo do aminoácido marcado utilizado na mistura de incubação. O precipitado foi lavado com TCA 5% a 0 °C, TCA 5% a 90 °C por 30 minutos, TCA 5% a 0 °C, mistura álcool-éter (3:1, v/v) e éter. 10 mg do resíduo foram dissolvidos em 0,5 ml de ácido fórmico e 3,8 ml de anidrido acético. Metade do volume obtido foi separado para contagem da radioatividade, servindo essa medida como controle da experiência.

À outra metade, foram adicionados 5 mg de tiocianato de amônio e a solução foi colocada em estufa a 54 °C por 5 horas, em tubo de Thunberg. Decorrido esse tempo, o solvente foi evaporado sob vácuo, em presença de pastilhas de KOH no ramo lateral do tubo de Thunberg. O resíduo foi lavado com 5 ml de TCA 5%, dissolvido em 1,5 ml de NaOH 1 N e aquecido a 50 °C por 5 minutos. Depois dessa incubação, foram adicionados à solução 0,3 ml de TCA 50% e 10 ml de TCA 5%. O precipitado formado foi lavado 2 vezes com 10 ml de acetona e uma vez com 10 ml de éter. Depois de seco em estufa, foi dissolvido em ácido fórmico, colocado em placas de plástico e novamente seco para contagem de radioatividade.

O método adotado é uma adaptação daquele descrito por WALEY & WATSON (1951). Foram retiradas amostras do material tratado e não-tratado, para dosagem de proteínas pelo método de WARBURG & CHRISTIAN (1941).

c) Tratamento enzimático

Para o tratamento enzimático, foi feita uma incorporação da maneira habitual, durante 30 minutos. A seguir, o volume incubado foi dividido por vários tubos, contendo cada um cerca de 2 mg de proteína. A cada tubo foi adicionado um volume de DOC 0,5% de modo a estabelecer concentração final de 0,1% e 500 ug de determinada enzima. O volume final foi de 2 ml. A mis-

tura foi incubada a 37 °C e após 80 minutos foram adicionados a cada tubo 500 ug de albumina e 3 ml de TCA 10% . O precipitado resultante foi filtrado em Millipore GSWP 02500, 0,22 um e a radioatividade dos filtros, determinada por contagem em cintilador.

RESULTADOS

A - Características da partícula

1. Relação RNA/proteína

Tomando uma suspensão de fração Mb com concentração de proteína igual a 12 mg/ml, o teor de RNA encontrado foi de 1,4 mg/ml.

Esse resultado, que se refere à média de 4 dosagens, permite calcular a relação RNA/proteína como sendo igual a 0,11. Este valor é um pouco superior ao encontrado por ERNSTER, SIEKEVITZ & PALADE (1962), que obtiveram valores de 0,07 e 0,08 para a relação discutida.

2. Morfologia

Como mostra a Figura 1, a fração de Mb é constituída por membranas que aparecem principalmente como uma série de vesículas de diâmetros variados. Algumas formações filamentosas, mais raras, podem ser originadas pelo rompimento das vesículas. As estruturas menores e mais densas parecem ser constituídas por vesículas muito pequenas, totalmente incluídas na espessura do corte fotografado, pois apresentam um aspecto heterogêneo quando observadas em maior aumento, como na Figura 2.

A fração Mb tem, assim, um aspecto bastante homogêneo quanto à sua composição morfológica e a contaminação por outras organelas celulares, se existe, é praticamente desprezível.

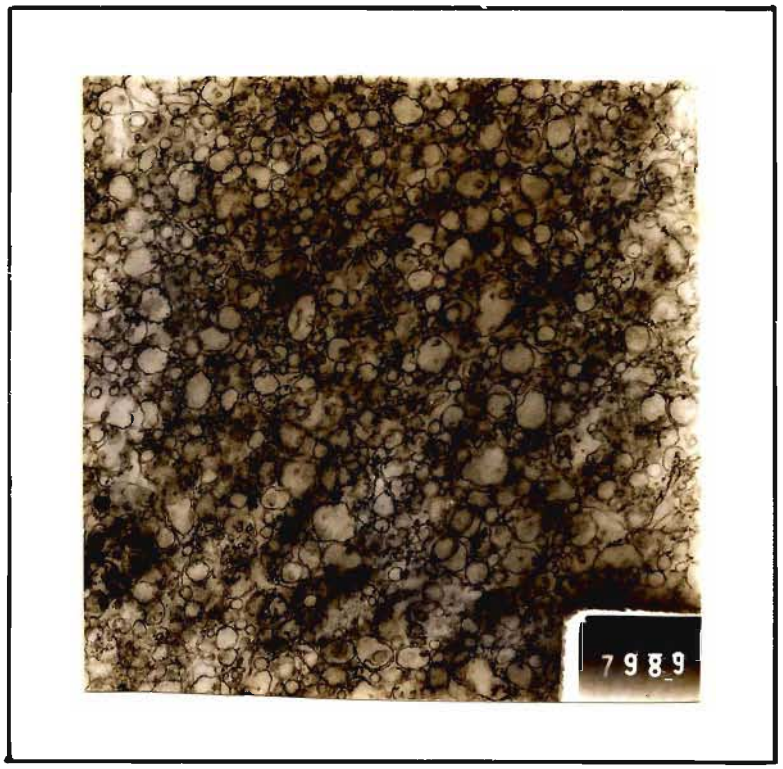

Figura 1 - Aspecto da fração Mb fotografada com 20.00 aumentos.

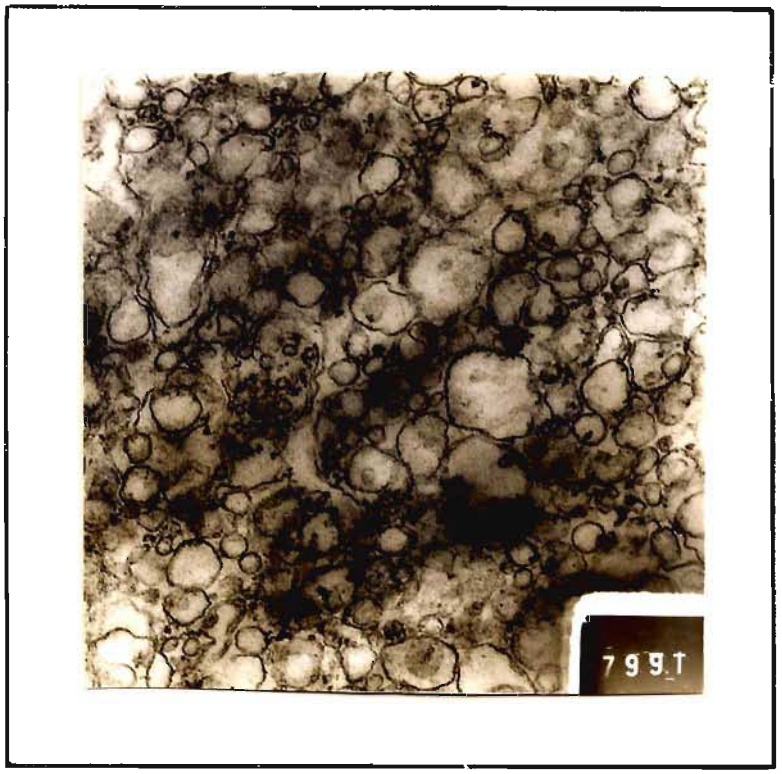

Figura 2 - Aspecto da fração Mb fotografada com 40.000 aumentos.

a b

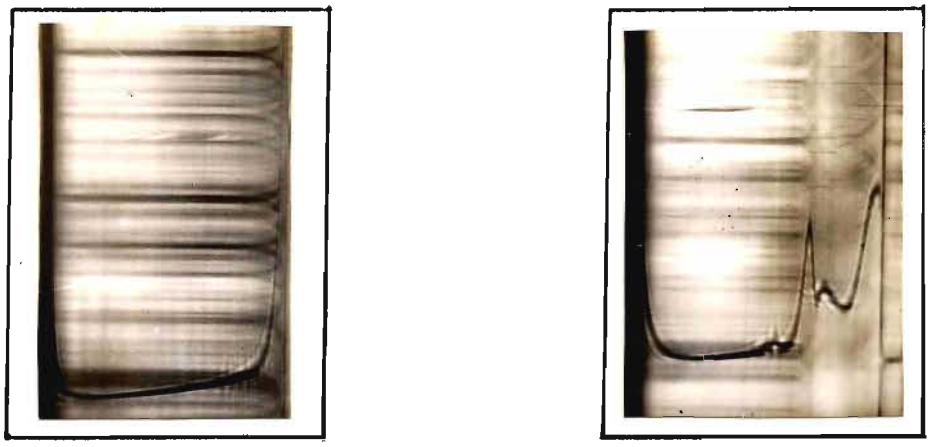

Figura 3 - Aspecto da ultracentrifugação analítica da fração P tratada com DOC. As fotografias foram tomadas 8 (3a) e 80 (3b) minutos depois de atingida a velocidade de 19.160 rpm.

a b

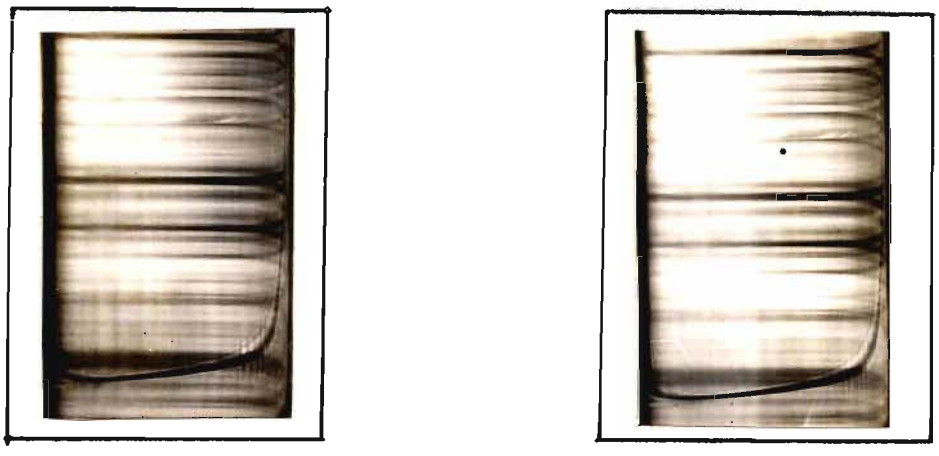

Figura 4 - Aspecto da ultracentrifugação analítica da fração Mb tratada com DOC. As fotografias foram tomadas 8 (4a) e 80 (4b) minutos depois de atingida a velocidade de 19.160 rpm.

3. Ultracentrifugação analítica

Quando se submete as frações Mb e P à ultracentrifugação analítica, obtem-se os resultados representados pelas Figuras 3 e 4.

Na Figura 3a vê-se o aspecto inicial da centrifugação da fração P, tomado 8 minutos após ser atingida a velocidade pré-estabelecida. Nota-se apenas o aparecimento de um pico que ainda não "descolou" do topo da célula da centrífuga. Após 80 minutos de corrida, o aspecto apresentado pelo sistema é o da Figura 3b, onde podem-se notar vários picos, indicativos da heterogeneidade da fração em estudo. As diferentes bandas de migração correspondem a populações de ribosomas liberados da associação com as membranas pelo tratamento com DOC e que se encontram aglutinados como trímeros, dímeros ou apresentam-se isolados, como monômeros. Nota-se também a permanência de uma banda ainda no topo do tubo, provavelmente constituída pela porção solubilizada de membranas. Essa suposição é reforçada pelos resultados da centrifugação da fração Mb, apresentados através das Figuras 4a e 4b. Na fotografia 4a, tomada após 8 minutos de centrifugação, o aspecto é bastante semelhante ao da Figura 3a. A fotografia 4b revela o aspecto da fração Mb após 80 minutos de corrida. Verifica-se que o material apresenta-se ainda perfeitamente homogêneo, notando-se o mesmo componente na parte superior da célula, sem o aparecimento dos picos característicos de ribosomas.

B - Características do processo de incorporação

1. Efeito do tempo

Na Figura 5 observa-se que a radioatividade incorporada na fração insolúvel em TCA a quente aumenta com o tempo de incubação.

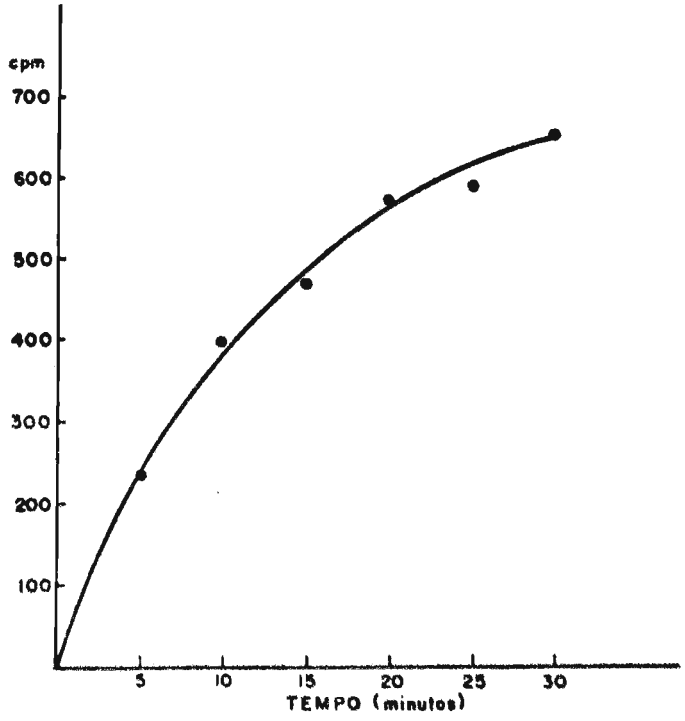

Figura 5 - Membranas (7,8 mg) incubadas a 37 °C em meio contendo 3,75 umoles de Tris, 0,5 umoles de ATP, 6 umoles de $MgCl_2$, 1,5 mg de PEP, 0,005 ml de piruvato quinase, 31,25 umoles de sacarose, 12 umoles de KCl, 7,5 umoles de NaCl, 1 mg de proteína de enzima pH 5 e 0,05 ml de proteína hidrolisada de levedo marcada com C^{14} com atividade de 175.000 cpm/0,1 ml, em volume final de 1 ml, com pH 7,4.

Para algumas preparações, obtinha-se uma correlação linear entre a radioatividade e o tempo (ver Figuras 11 e 15) mas a cinética mais comumente observada é a representada na Figura 5. O nível de incorporação obtido é também bastante variável e não foi possível uma padronização desse aspecto. As diferentes preparações

apresentavam sensíveis variações na capacidade de incorporação de aminoácido e, por isso, cada experiência fornece dados comparáveis somente aos outros obtidos no mesmo ensaio. Deve-se notar, entretanto, que a diversidade apresentada pelas preparações refere-se tão somente ao nível de radioatividade obtida, não incluindo sobre a proporcionalidade da resposta a todos os fatores testados, que se manteve sempre constante.

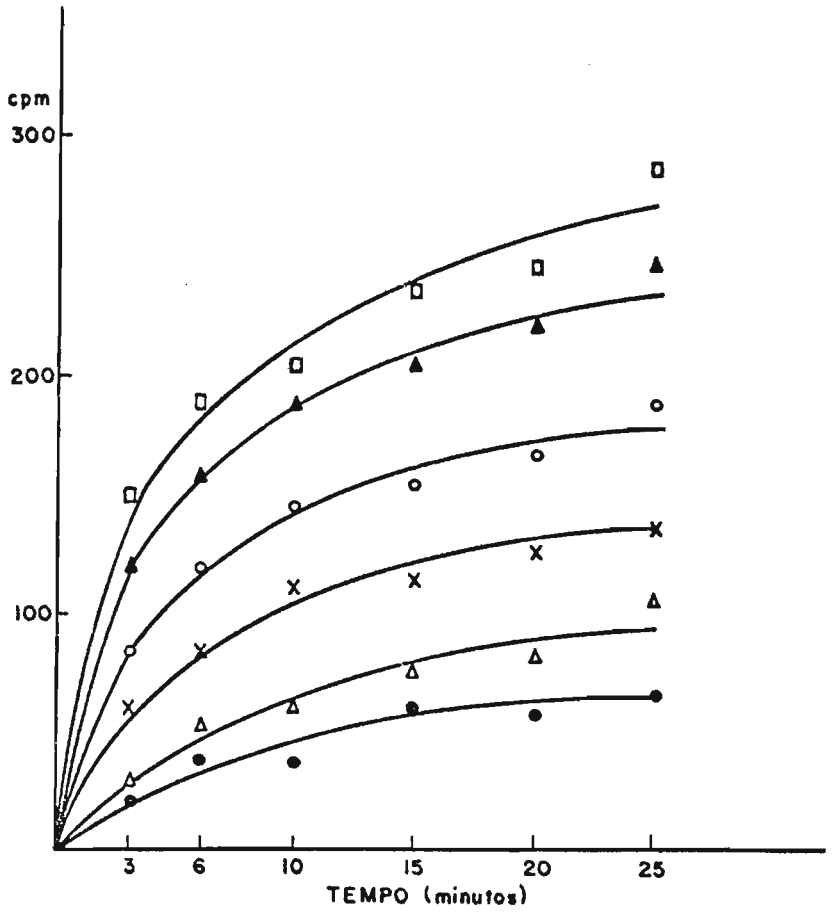

Figura 6 - Membranas incubadas a 37 °C em diferentes concentrações: ●——● 2 mg, Δ——Δ 4 mg, x——x 5,3 mg, o——o 8 mg, ▲——▲ 12 mg, □——□ 16 mg. O meio de incubação, de pH 7,4, contem: 3,75 umoles de Tris, 0,5 umoles de ATP, 6 umoles de $MgCl_2$, 10 umoles de fosfato de creatina e 250 ug de creatinofosfoquinase, 31,25 umoles de sacarose, 12 umoles de KCl, 7,5 umoles de NaCl, 1 mg de proteína de enzima pH 5 e 0,05 ml de leucina C^{14} com atividade de 175.000 cpm/0,1 ml.

2. Efeito da concentração de fração Mb

A radioatividade incorporada é proporcional à concentração de fração Mb usada no ensaio. As curvas apresentadas na Figura 6 referem-se a concentrações de 2, 4, 5.3, 8, 12 e 16 mg de proteína de fração Mb. Embora fosse desejável operar com a concentração que fornece um rendimento maior em radioatividade incorporada, isto é, aquela de 16 mg de proteína, isso não foi possível em vista do baixo rendimento obtido no isolamento da fração, limitado também pela capacidade do rotor 50 Ti, normalmente empregado na preparação da partícula.

TABELA I

Efeito da Temperatura

	TEMPO (MINUTOS)						
	5	10	15	20	30	40	45
Preparação 1							
37 °C	-	-	122	-	248	-	405
80 °C (1)	-	-	15	-	20	-	7
0 °C (2)	-	-	0	-	0	-	0
Preparação 2							
37 °C	24	38	-	64	92	121	-
60 °C (3)	0	0	-	12	21	33	-

As condições experimentais são idênticas às da Figura 6. (1) a fração Mb foi pré-incubada a 80 °C por 15 minutos, (2) temperatura mantida durante a incubação , (3) a fração Mb foi pré-incubada a 60 °C por 30 minutos.

3. Efeito da temperatura

Quando se incuba a fração Mb com aminoácidos radioativos a 0 °C, a incorporação obtida é nula. A temperatura habitualmente usada para a incubação foi de 37 °C e os dados comparativos entre as incubações a diferentes temperaturam acham-se apresentados na Tabela I. A partícula é termolábil no que se refere à sua capacidade de incorporação de aminoácidos. Assim, se antes da incubação a partícula é submetida a um tratamento térmico de 80 °C por 15 minutos, a incorporação é praticamente nula. Uma incubação da partícula por 30 minutos a 60 °C acarreta uma diminuição de 73% na incorporação, quando comparada ao controle. Esses resultados reforçam a hipótese da natureza enzimática do processo.

TABELA II

Efeito da Concentração de Mg

umoles de $MgCl_2$	TEMPO (MINUTOS)					
	5	10	15	20	25	30
-	86	123	192	243	336	329
1	129	239	379	491	595	693
2	130	261	451	517	660	771
4	220	345	492	621	787	828
6	204	374	569	764	744	934
10	199	334	464	568	688	844
20	83	228	450	451	586	691
40	89	234	255	328	427	483

As condições experimentais são idênticas às da Figura 5, exceto quanto à concentração de $MgCl_2$, que se encontra assinalada na própria tabela.

4. Efeito da concentração de Magnésio

Para testar o efeito de Magnésio sobre o sistema de incorporação de aminoácidos, as membranas foram preparadas pelo sistema habitual, omitindo-se esse íon nos tampões utilizados na preparação e suspensão da partícula. Obtinha-se, assim, uma suspensão da partícula isenta de Magnésio exógeno. Essa suspensão foi incubada da maneira habitual, em presença de várias concentrações de $MgCl_2$ e o resultado desse ensaio encontra-se apresentado na Tabela II. Vê-se que a incorporação pode ocorrer a níveis discretos em ausência de magnésio, mas a sua presença, em concentração adequada chega a estimular o processo em cerca de 300%. O ótimo de concentração é verificado mais claramente na Figura 7. Esse gráfico apresenta os valores obtidos para a radioatividade após 30 minutos de incubação em relação à massa de magnésio presente no ensaio. O nível máximo de atividade é encontrado quando a concentração é igual a 6 umoles por ml da mistura de incubação.

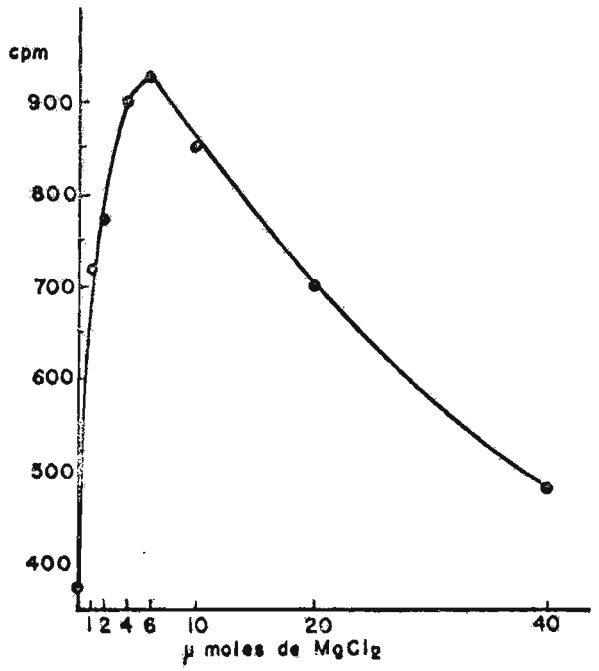

Figura 7 - As condições experimentais são idênticas às da Figura 5, exceto pela concentração de $MgCl_2$ que varia segundo os valores assinalados em abcissas. Radioatividade medida após 30 minutos de incubação.

Vários efeitos considerados como artefatos são obtidos em experimentos in vitro em que são utilizadas concentrações de magnésio muito altas, tidas como não fisiológicas. Sabe-se, por exemplo, que nessas condições, os ribosomas não traduzem mensageiros naturais, mas são capazes de traduzir polirribonucleotídios sintéticos (LENGYEL, 1969).

No caso da preparação de membranas, o fato de haver uma atividade maior em níveis baixos de magnésio é uma indicação de que a sua capacidade de incorporação de aminoácidos possa representar um processo fisiológico normal.

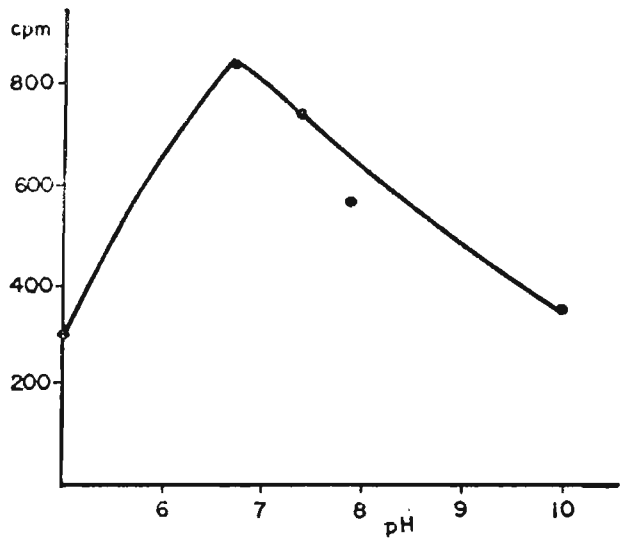

Figura 8 - Membranas (6,5 mg) incubadas a 37 °C em meio contendo 0,5 umoles de ATP, 6 umoles de $MgCl_2$, 1,5 mg de PEP, 0,005 ml de piruvato quinase, 31,25 umoles de sacarose, 12 umoles de KCl, 7,5 umoles de NaCl, 1 mg de proteína de enzima pH 5 e 0,05 ml de proteína hidrolisada de levedo marcada com C^{14} com atividade de 175.000 cpm/0,1 ml, em volume de 1 ml. Valores de radioatividade após 30 minutos de incubação. Tampão citrato para pH 5 e 6,6, Tris-HCl para 7,4 e 7,8 e borato para pH 10. Todos os tampões têm concentração 0,03 M.

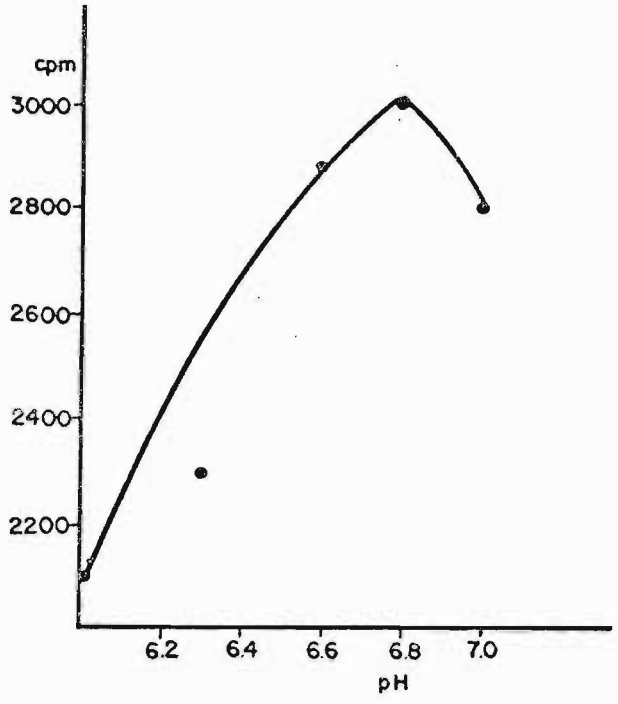

Figura 9 - Condições de incubação idênticas às da Figura 8, com concentração de membranas igual a 7,4 mg e utilizando tampão citrato.

5. Efeito do pH

A atividade de incorporação de aminoácidos pela fração Mb está na dependência do pH do meio de incubação, como mostram as Figuras 8 e 9. Apesar de serem obtidos níveis mais altos de incorporação em pH 6,6, o estudo de outras variáveis do processo foi realizado em pH 7,4, no qual a atividade do sistema também é alta e que representa melhor a situação fisiológica.

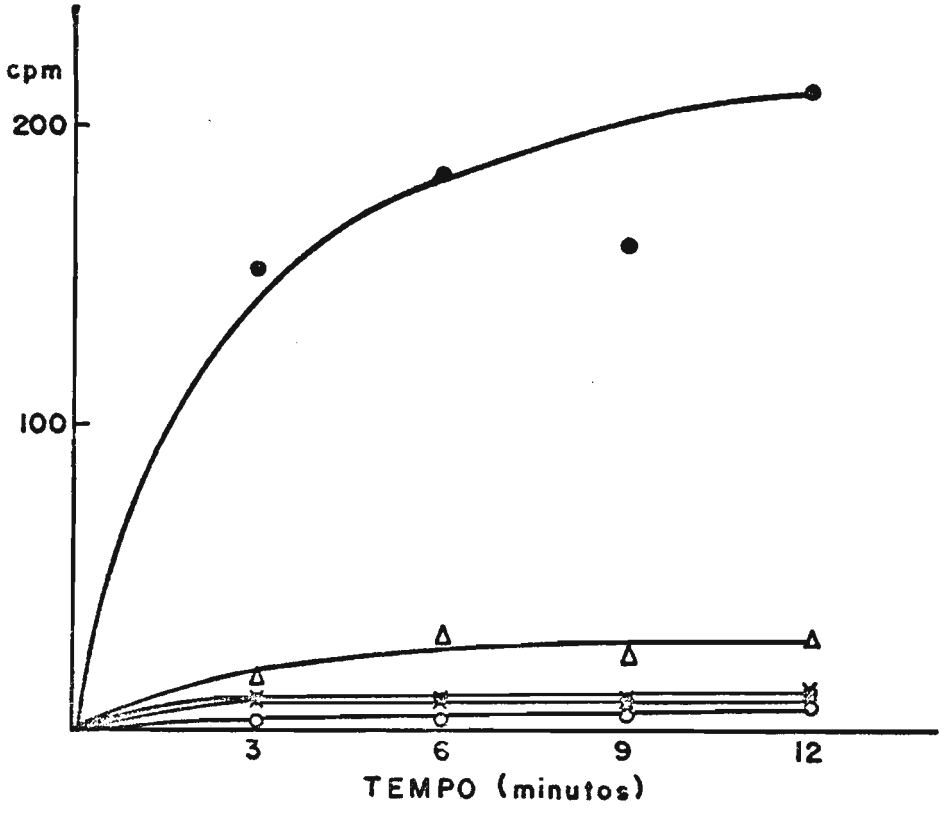

Figura 10 - ●——● Ribosomas (1,75 mg) incubados a 37 °C em Tris-HCl 0,03 M, pH 7,4, contendo 0,5 umoles de ATP, 0,05 umoles de GTP, 10 umoles de fosfato de creatina, 250 ug de creatinofosfoquinase, 1 mg de proteína de enzima pH 5, 31,25 umoles de sacarose e 0,05 ml de leucina C^{14} com atividade de 175.000 cpm/0,1 ml em volume final de 1 ml. Δ——Δ com adição de 100 ug de puromicina. ✖——✖ sem adição de ATP, fosfato de creatina e creatinoquinase ou sem adição de enzima pH 5. o——o com adição de 500 ug de RNase.

6. Efeito do sistema regenerador de energia

A capacidade sintética de uma preparação de ribosomas, "in vitro", mostra um requerimento ab

soluto de uma fonte energética exógena, habitualmente fornecida sob forma de ATP e de um sistema regenerador de ATP, como ácido fosfoenolpirúvico e piruvato quinase. Na ausência desse fornecimento, a incorporação é praticamente nula, como pode ser visto na Figura 10.

No caso de fração Mb, o requerimento energético é menos drástico. Para obter-se um nível ótimo de incorporação, o sistema regenerador de energia deve ser adicionado ao meio de incubação, pois em sua ausência há uma inibição do processo, tanto quando examinado em tempos curtos, e com o fornecimento de um só aminoácido marcador, como mostra a Figura 11, como quando observado em tempos mais longos e com uma mistura de aminoácidos marcadores, como é o caso do ensaio apresentado através da Figura 12.

Em vários ensaios realizados, a inibição da incorporação por deficiência do sistema energético exógeno oscilou na faixa de 45-70%.

Esses dados estão de acordo com as evidências anteriormente apresentadas a respeito da capacidade de ativação de aminoácidos pela fração de membranas (McCORQUODALE & ZILLIG, 1959; RAPPOPORT & MURPHY, 1964; NORTON, KEY & SCHOLES, 1965).

Em estudos com mitocôndrias de rato, tendo succinato como fonte de energia, foi demonstrado haver um bloqueio completo da incorporação de leucina em presença de antimicina A e de 2,4 dinitrofenol. Essa inibição, contudo, não era observada em presença de concentrações de oligomicina que impedem a formação de ATP. A presença de ADP ou AMP também inibe a incorporação e essa inibição é tida como uma competição estabelecida entre aquelas substâncias e o processo de síntese proteica pela energia derivada da oxidação do succinato. Ainda mais; o ácido tetraiodotiroacético, potente inibidor de fosforilação, praticamente faz dobrar a quantidade de leucina incorporada (BRONK, 1963).

Há fortes indicações, portanto, de que a capacidade de incorporação da fração Mb, mesmo em ausência de fornecimento energético, poderia estar na dependência de um conteúdo endógeno que se apresentasse ou diretamente na forma de ATP ou indiretamente na forma de compostos de alta energia, capazes de suprir o requerimento energético da reação catalisada por aminoacil sintetases.

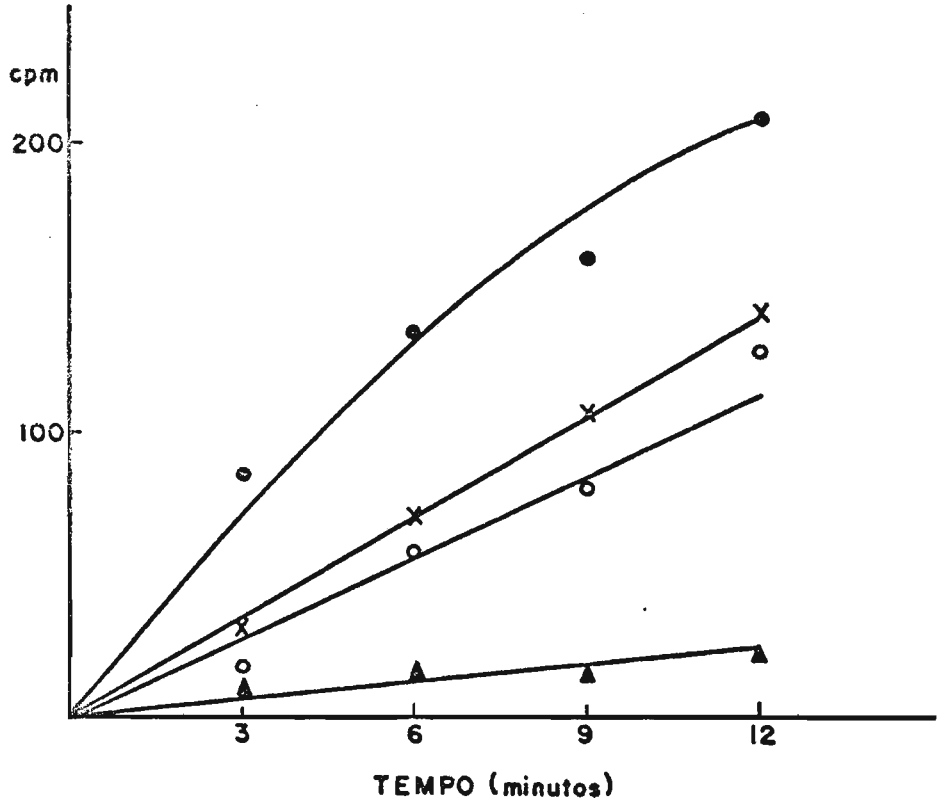

Figura 11 - ●——● Membranas (7,8 mg) incubadas a 37 °C em Tris-HCl 0,03 M, pH 7,4 contendo 0,5 umoles de ATP, 6 umoles de $MgCl_2$, 10 umoles de fosfato de creatina, 250 ug de creatinofosfoquinase, 31,25 umoles de sacarose, 12 umoles de KCl, 7,5 umoles de NaCl, 1 mg de proteína de enzima pH 5 e 0,05 ml de leucina C^{14} com atividade de 175.000 cpm/0,1 ml. X——X com omissão de enzima pH 5, o——o com omissão de ATP, fosfato de creatina e creatinofosfoquinase, ▲——▲ com omissão de membranas.

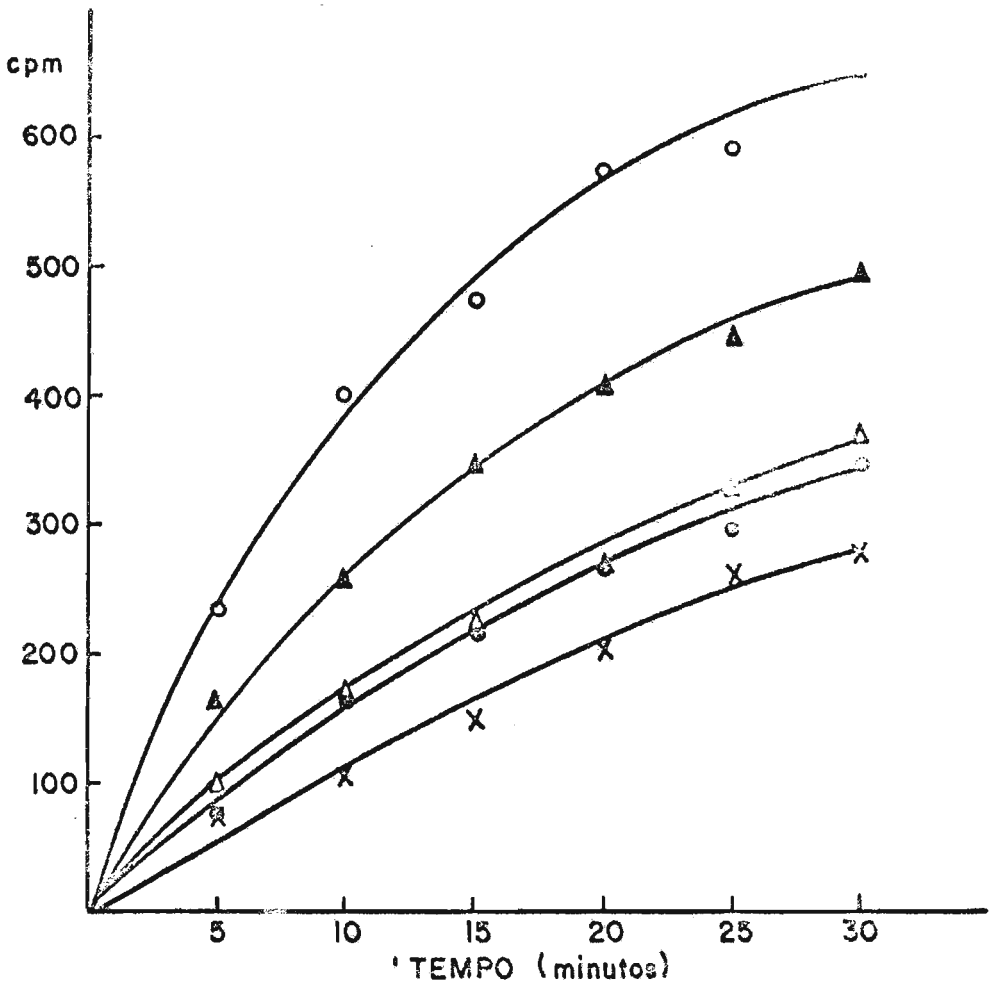

Figura 12 - Condições do ensaio idênticas às da Figura 11, com a substituição de leucina C^{14} por proteínas hidrolisadas de levedo, com a mesma atividade. o——o sistema completo, ▲——▲ com adição de 100 mg de puromicina, Δ——Δ com adição de 30 umoles de NaF, ●——● com adição de 500 ug de RNase, x——x com omissão de ATP, fosfato de creatina e creatinofos - foquinase.

7. Efeito de GTP

A verificação da necessidade de GTP para o processo de incorporação de aminoácidos por ribosomas foi conseguida nos primeiros estágios do conhecimento a respeito de síntese de proteínas promovidas por aquelas partículas (KELLER & ZAMECNIK, 1956).

No caso de incorporação pela fração Mb , os resultados indicam uma inteira independência do fornecimento de GTP exógeno, pelo menos até a concentração testada. A Figura 13 mostra o resultado da incorporação obtida em 30 minutos de incubação, em presença de quantidades de GTP variando de 0 a 200 umoles.

A partir desses resultados, poderiam ser feitas duas hipóteses: ou o processo de incorporação realmente independe de GTP, ou a partícula traz consigo um conteúdo de GTP endógeno capaz de suprir o requerimento do processo. A última hipótese parece ser verdadeira,pois a incorporação de aminoácidos é fortemente inibida pela presença de GMPPCP no meio de incubação (ver Tabela III). Essa inibição poderia ser explicada pela competição estabelecida entre o GTP endógeno e seu análogo pelo sítio ativo da GTPase.

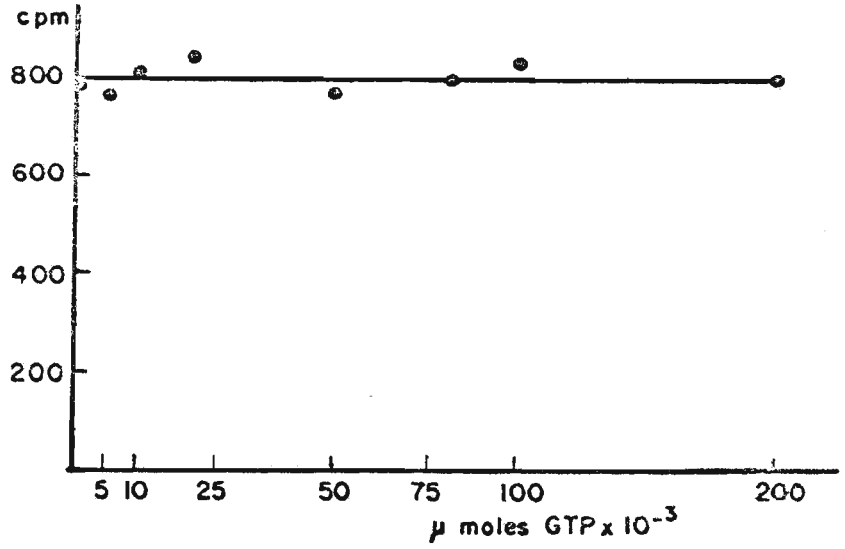

Figura 13 - Condições experimentais semelhantes às da Figura 8, com valor de pH igual a 7,4 e concentrações de GTP variando segundo os valores assinalados no gráfico.

8. Efeito de enzima pH 5

Como foi mencionado anteriormente, a fração de membrana parece ter capacidade de ativação de aminoácidos. Partindo dessa premissa, a contribuição de enzima pH 5 como fonte de aminoacil sintetases é teoricamente dispensável. Experimentalmente, entretanto, verifica-se uma elevação de cerca de 40% no nível de incorporação quando se fornece enzima pH 5 ao sistema, como pode ser verificado na Figura 11.

Não ficou esclarecido pelos resultados obtidos se esse estimulo é causado pelo fornecimento de outra via de ativação de aminoácidos ao sistema ou se a contribuição ocorre pela adição de tRNA contido também na enzima pH 5.

9. Incorporação de diferentes aminoácidos

A capacidade de incorporação que a fração de membranas apresenta é verificada para diferentes aminoácidos. Pôde ser testada para leucina, glicina, fenilalanina e lisina em experimentos isolados. Há indicações, entretanto, que um número maior de aminoácidos possa ser substrato das reações que levam à incorporação. Realmente, quando se utiliza um hidrolisado de proteínas marcadas de levedo em lugar de um único aminoácido, radioativo no meio de incubação, atingem-se níveis bastante altos de radioatividade, sugerindo a incorporação de muitos aminoácidos no produto insolúvel em TCA a quente. Em vários ensaios mencionados, como os das Figuras 6 e 11, foi utilizado um só aminoácido, radioativo, enquanto em alguns outros, utilizou-se hidrolisado de proteínas marcadas, como nas Figuras 5, 7 e 12, por exemplo.

Entre os aminoácidos testados separadamente, não foi possível detectar incorporação apenas para prolina, como se vê na Figura 14.

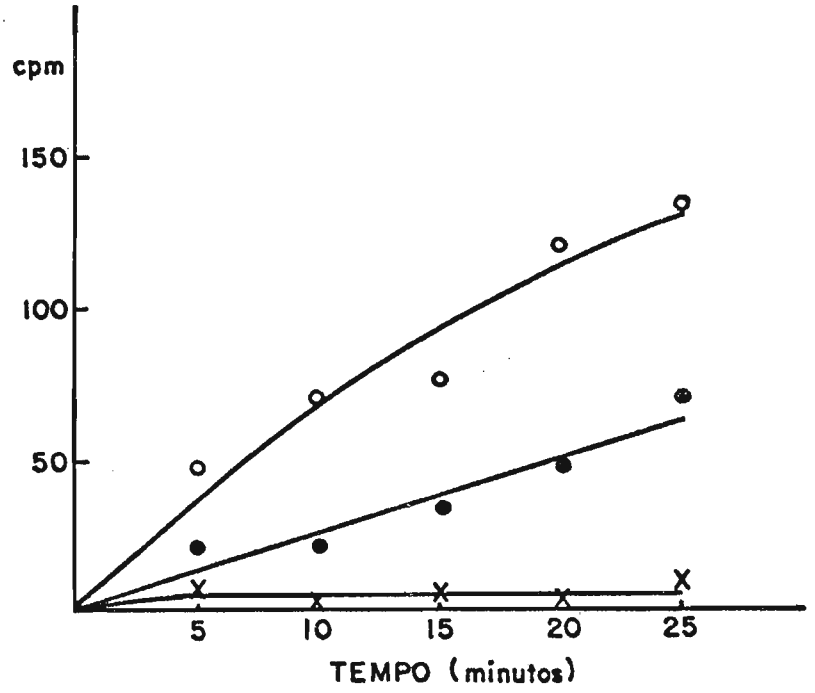

Figura 14 - Condições experimentais semelhantes às da Figura 5, substituindo o hidrolisado de proteínas de levedo por: o——o fenilalanina C^{14}, ●——● glicina H^3, x——x prolina H^3.

10. Efeito de inibidores

A ação de puromicina, RNase e NaF foi apresentada através da Figura 12, onde pode-se verificar que essas substâncias têm sobre o sistema de membranas um efeito bem menos pronunciado do que o apresentado sobre uma incorporação promovida por ribosomas (comparar com a Figura 10).

A Tabela III apresenta o resultado obtido após 30 minutos de incubação em presença de inibidores de síntese proteica: ácido fusídico (TANAKA, KINOSHITA &

MASUKAWA, 1968) e anisomicina (GROLLMAN, 1967). Nota-se que o sistema é sensível à ação destas drogas, permitindo formular a hipótese de utilização pela fração de membranas de certos equipamentos enzimáticos característicos do sistema clássico de síntese proteica de riboso-mas.

TABELA III

Efeito de Inibidores

	RADIOATIVIDADE	% INIBIÇÃO
Sistema Normal	1600	-
+ GMPPCP	458	72
+ Ácido Fusídico	663	59
+ Anisomicina	784	51

Membranas (8 mg) incubadas em condições idênticas às descritas na Figura 11, usando proteínas hidrolisadas de levedo marcados com C^{14}. A radioatividade apresentada é a resultante de 30 minutos de incubação. Concentração de inibidores: GMPPCP = 10^{-4}M, ácido fusídico = 0,6 umoles/ml e anisomicina = 200 ug/ml.

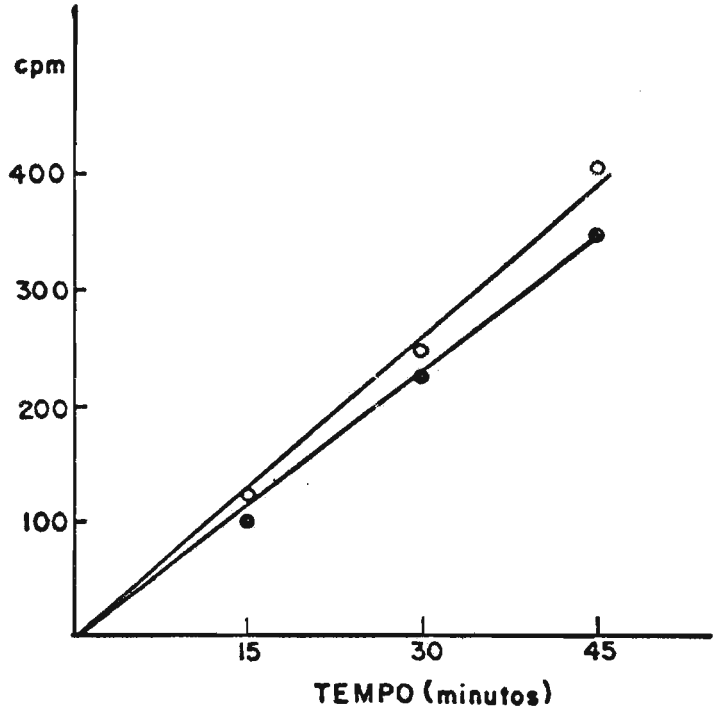

Figura 15 - Condições experimentais semelhantes às da Figura 6, usando 6,2 mg de membranas.
o——o sistema completo, ●——● com adição de 150 unidades de penicilina e 200 ug de estreptomicina.

11. Controle bacteriológico

A Figura 15 mostra o comportamento do processo em presença de 150 Unidades de penicilina e 200 ug de estreptomicina no meio de incubação, com volume final de 1 ml. Vê-se que não há interferência apreciável causada pelos antibióticos. Nesse ensaio, em particular, a incorporação foi medida até o tempo de 45 minutos, mas nos demais, restringiu-se a medida a 30 minutos.

Um outro controle da contaminação bacteriana foi feito retirando-se amostras no início e no fim do período de incubação e semeando essas alíquotas em meio de cultura. A contagem de colônias permitiu conhecer o número de bactérias viáveis contaminantes. Nas condições de incubação, o número de colônias variou em torno de 50.000 por ml, sem nunca ter ultrapassado 70.000 e sem haver duplicado a quantidade de elementos viáveis entre o início e o fim do ensaio.

LAMBORG & ZAMECNIK (1960) demonstraram não haver incorporação significativa de aminoácidos radioativos por uma população bacteriana menor do que 150.000 células por ml.

Aliando-se, portanto, o tempo de incubação aos resultados em presença de antibióticos e à contagem por plaqueamento, obtém-se uma boa margem de segurança quanto a resultados artificiais introduzidos pelo eventual desenvolvimento de microrganismos no meio de incubação.

C - Características do produto

1. Ação de enzimas

Um método possível para o exame do produto resultante da incorporação é verificar sua sensibilidade à ação de diferentes enzimas. O resultado dos tratamentos enzimáticos encontram-se expressos na Tabela IV.

Verifica-se que o tratamento com pronase resulta em diminuição de pouco mais de 60% da radioatividade precipitável com ácido. O tratamento com tripsina tem o mesmo efeito em cerca de 50%, enquanto que outras enzimas testadas têm efeitos muito pequenos. É in-

teressante notar que o efeito produzido por pronase ou tripsina não é estimulado pela presença de outras enzimas e que não se observa qualquer potencialidade na ação conjunta das enzimas efetivas na digestão, isto é, pronase e tripsina.

A Tabela V mostra os resultados de uma experiência semelhante à anterior, introduzindo testes com outras enzimas. Os dados aqui apresentados confirmam os resultados da Tabela IV e indicam a ineficiência de RNase e α-amilase na digestão do produto.

TABELA IV

Tratamento Enzimático do Produto da Incorporação

ENZIMAS	RADIOATIVIDADE (CPM)	RECUPERAÇÃO APÓS O TRATAMENTO (%)
-	6678	-
Pronase	2487	37
Lecitinase A	5862	87
Tripsina	3148	47
Lipase I	5572	83
Pronase + Lecitinase	2472	37
Tripsina + Lecitinase	3488	52
Pronase + Lipase	2616	39
Pronase + Tripsina + Lecitinase	2435	36

Radioatividade medida no produto insolúvel em TCA resultante do tratamento do material incorporado pela fração de membranas por enzimas relacionadas na própria Tabela. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

TABELA V

Tratamento Enzimático do Produto da Incorporação

Enzimas	RADIOATIVIDADE (CPM)	RECUPERAÇÃO APÓS O TRATAMENTO (%)
-	18285	-
Pronase	6027	33
Tripsina	10639	58
Lipase I	16075	88
RNase	18294	>100
α-Amilase	18817	>100

As condições do ensaio são idênticas às da Tabela IV e estão descritas em Materiais e Métodos

TABELA VI

Remoção de Aminoácidos N-Terminais com DNFB

FRAÇÃO		RADIOATIVIDADE (CPM)
Etérea	Microsoma	16
	Membrana	19
Aquosa	Microsoma	909
	Membrana	428

A radioatividade refere-se a contagem obtida após o tratamento do material incorporado pelas frações discriminadas por DNFB. As condições do ensaio estão descritas na parte de Materiais e Métodos.

2. Remoção de aminoácidos N-terminais

Pode-se verificar pela Tabela VI que , após a remoção de aminoácidos N-terminais, a radioatividade é recuperada praticamente apenas na fase aquosa.

Nesse particular, os resultados para membranas assemelham-se aos resultados-controle obtidos para uma imcorporação por microsomas.

A fase etérea foi cromatografada em camada delgada e o resultado está mostrado na Figura 16. O cromatograma revela a existência de vários aminoácidos dinitrofenilados, a maior parte dos quais é comum a preparação de membranas e a de microsomas.

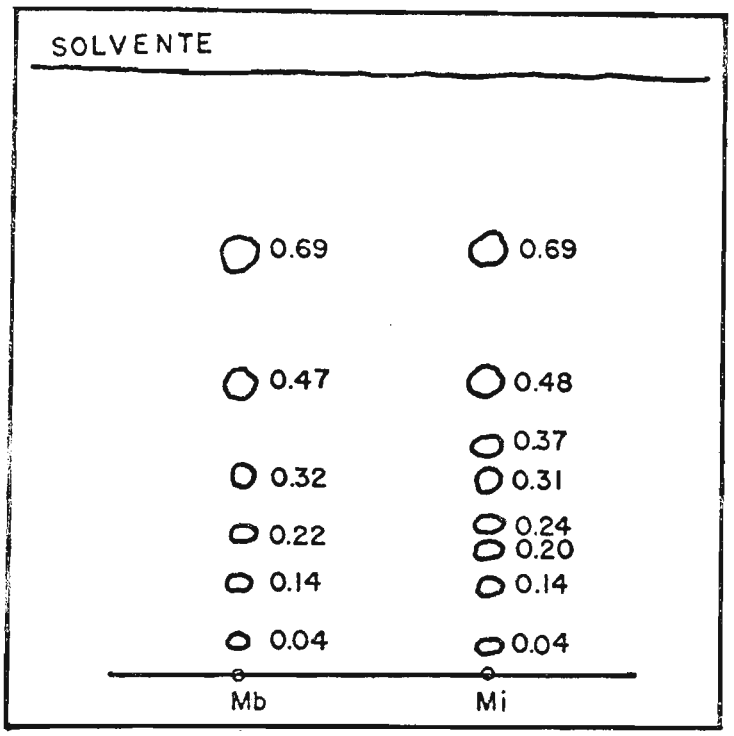

Figura 16 - Cromatografia da fase etérea obtida após o tratamento do material incorporado por membranas (Mb) e microsomas (Mi) com DNFB. Os números ao lado de cada mancha referem-se aos Rf absolutos dos derivados denitrofenilados dos aminoácidos.

3. Remoção de aminoácidos C-terminais

A Tabela VII apresenta os efeitos da remoção de aminoácidos COOH-terminais sobre a radioatividade do produto de incorporação. Em experiências separadas foram usados como controle ribosomas e microsomas. Vê-se que, em ambos os casos, a radioatividade recuperada após a remoção de aminoácidos C-terminais é da ordem de 75% para as preparações de membranas.

TABELA VII

Remoção de Aminoácidos C-Terminais

	FRAÇÃO	RADIOATIVIDADE (CPM)	RECUPERAÇÃO (%)
Experiência 1	Ribosoma	1081	-
	Ribosoma tratado	503	46,5
	Membrana	261	-
	Membrana tratada	199	76,2
Experiência 2	Microsoma	668	-
	Microsoma tratado	359	59,7
	Membrana	318	-
	Membrana tratada	240	75,4

A radioatividade refere-se às contagens antes e depois do tratamento de remoção de aminoácidos C-terminais. As condições de ensaio estão descritas no ítem Materiais e Métodos.

DISCUSSÃO

Vários métodos têm sido descritos para o isolamento do retículo endoplasmático. O princípio utilizado por esses métodos permite reuni-los em três grupos diferentes. O primeiro grupo de métodos baseia-se no tratamento do homogenato de microsomas, suspenso em sacarose 0,25 M, por isoctana e centrifugação posterior a 105.000 x g. Nessas condições, a fração de membranas aparece na interface formada pela solução de sacarose e de isoctana (HAWTREY & SCHIRREN, 1962). Um segundo tipo de procedimento é aquele introduzido por SACHS & WAELSCH (1956), que se fundamenta na adição de pirofosfato de sódio 0,1 M a uma suspensão de microsomas. O tratamento acarreta a desintegração e solubilização de ribosomas e as membranas são recuperadas como precipitado, após uma centrifugação a 105.000 x g.

O terceiro tipo de método está baseado no procedimento descrito originalmente por ERNSTER, SIEKEVITZ & PALADE (1962) e consiste no tratamento da suspensão de microsomas por desoxicolato de sódio em diluição capaz de promover o desligamento dos polisomas associados às membranas mas insuficiente para solubilizá-las. Esta foi a técnica adotada para a preparação de membranas neste trabalho.

Os métodos que empregam isoctana fornecem uma preparação de membranas com alto nível de contaminação por ribosomas, como ficou demonstrado pelas análises morfológicas realizadas através de microscópia eletrônica (CAMPBELL, COOPER & HICKS, 1964). O segundo grupo de métodos também não parece satisfatório, pois a fração de membranas obtidas por adição de pirofosfato apresenta um teor de RNA (38% do total de microsomas) suficientemente elevado para suspeitar-se da presença

de material ribosômico contaminante. Repetindo o tratamento com pirofosfato, obtem-se preparações com níveis de RNA decrescentes até 16%, mas, paralelamente, parece haver remoção de certas proteínas do retículo e, mesmo assim, encontram-se ainda ribosomas residuais aderidos à membrana (SHAPOT & DAVIDOVA, 1971).

Pelo tratamento com desoxicolato, foi possível obter uma fração de membranas em que não se verifica contaminação apreciável por outras partículas celulares quando esta preparação é submetida à análise por microscopia eletrônica ou por ultracentrifugação analítica.

Além disso, o teor de RNA verificado para essas preparações foi da ordem de 10% com relação à concentração de proteínas, situando-se em uma faixa compatível com a ausência de ribosomas e comparável a dados encontrados na literatura (ERNSTER, SIEKEVITZ & PALADE, 1962).

Em condições adequadas, essa sub-fração de microsoma, é capaz de promover a incorporação de vários aminoácidos em um produto insolúvel em TCA a quente. A insolubilidade nessas condições tem sido adotada classicamente como um critério para a existência, no produto considerado, de uma ligação peptídica com participação do aminoácido marcador.

A hipótese de que este seja o tipo de ligação encontrada no produto resultante da incorporação promovida pela fração de membranas é fortalecida pela solubilização da radioatividade quando o material incorporado é tratado com enzimas proteolíticas. De fato, entre as enzimas testadas, apenas pronase e tripsina tiveram o efeito de tornar solúvel em ácido a radioatividade derivada do aminoácido incorporado.

Supondo a existência de uma ligação peptídica fixando o aminoácido marcador, pode-se pensar em duas alternativas, pelo menos, para que essa ligação seja estabelecida. Uma possibilidade é a síntese "de novo" de

um produto tendo aminoácidos como precursores e outra é a transferência desse aminoácido para um aceptor celular pré-existente.

Encontram-se na literatura descrições de alguns sistemas enzimáticos capazes de promover a ligação de aminoácidos a proteínas celulares, tanto em preparações de origem bacteriana como de mamíferos.

Nos trabalhos de KAJI, KAJI & NOVELLI (1965), ficou demonstrada a existência de um sistema solúvel em Escherichia coli, capaz de promover a incorporação de leucina. Também em E. coli, LEIBOWITZ & SOFFER (1970) estudaram e purificaram uma enzima capaz de transferir especificamente leucina e fenilalanina para albumina, a partir de tRNA carregado com aqueles aminoácidos. Em mamíferos, foi possível caracterizar um sistema também solúvel que incorpora arginina a uma proteína préexistente (SOFFER & MENDELSOHN, 1966).

A incorporação promovida pela fração de membranas difere claramente de tais sistemas, sob vários aspectos.

Os sistemas descritos não são particulados e aceitam, cada qual, apenas um ou dois aminoácidos como substratos, enquanto que no nosso trabalho, a incorporação parece ser bastante inespecífica, no que se refere ao aminoácido fixado.

A incorporação, para os casos citados, é inteiramente independente da concentração de magnésio e o pH ótimo, no caso do sistema de mamífero, situa-se na faixa 9-9,8. É importante também assinalar que, no caso das enzimas de transferência, a maior parte do aminoácido incorporado reage com dinitrofluorbenzeno, indicando a existência de um grupo NH_2 livre nesse aminoácido.

No sistema de incorporação de membranas, as condições de pH ótimo e de concentração de magnésio

são bastante próximas às fisiológicas e a maior parte do aminoácido incorporado não é accessível ao DNFB, indicando comprometimento do grupo amina. Por outro lado, como a remoção de aminoácidos COOH-terminais não acarreta a perda de radioatividade do produto, deve-se admitir uma localização interna do aminoácido marcador na molécula produzida.

Encontram-se na literatura muitas referências à formação de um complexo entre lipídios e aminoácidos, tido algumas vezes como um composto intermediário normal no processo que leva o aminoácido exógeno a integrar-se em uma cadeia polipeptídica (HAINING, FUKUI & AXELROD, 1960; HENDLER, 1961; HUNTER & GOODSALL,1961; BUBELA & HOLDSWORTH, 1966). O complexo lipo-aminoácido é encontrado principalmente quando se pesquisa a localização do aminoácido marcador após tempos curtos de incubação. O composto, tornado radioativo pela presença do aminoácido, é sempre extraível por solventes orgânicos.

Outro grupo de enzimas descritas são aquelas capazes de transferir uma molécula de aminoácido previamente ligada a tRNA para um fosfatidilglicerol, originando um aminoacilfosfatidilglicerol. Ao menos para duas enzimas conhecidas, parece haver grande especificidade com relação ao aminoácido a ser ligado, pois são reconhecidos como substratos apenas lisina (LENNARZ, BONSEN & von DEENEN, 1967) ou alanina (GOULD, THORNTON , LIEPKALNS & LENNARZ, 1968). O sistema enzimático responsável por essa síntese é particulado e foi descrito para bactérias.

Também nesses casos, o produto da síntese é extraído por uma mistura clorofórmio-metanol.

Em síntese de parede de Staphylococcus aureus, pôde-se verificar a existência de uma molécula complexa formada, em parte, por um pentapeptídio composto apenas de resíduos de glicina. Esse oligopeptídio entra na constituição da molécula ligando-se a outros oligopeptídios formados, por sua vez, por alanina, lisina e

ácido glutâmico. É interessante notar que, enquanto a formação de poliglicina depende da presença de tRNA, a formação de oligopeptídio com vários aminoácidos é exclusivamente enzimática, ocorrendo sem a participação de nenhuma espécie de RNA (MATSUHASHI, DIETRICH & STROMINGER, 1967).

A constituição total da molécula compreende as cadeias oligopeptídicas ligadas a açúcares complexos constituintes de paredes bacterianas.

Pelos dados obtidos neste trabalho, não se pode afastar inteiramente a possibilidade de que a incorporação de aminoácidos por membranas ocorra segundo um processo semelhante a esse, embora os métodos de extração e dosagem do produto difiram radicalmente nos dois casos. Um melhor esclarecimento referente ao produto da incorporação com membranas poderá ser conseguido com a determinação do tamanho da molécula produzida, através de eletroforese em gel de acrilamida, por exemplo. Algumas experiências preliminares levadas a cabo com esse propósito não forneceram, entretanto, resultados conclusivos.

O processo de síntese proteica parece ser complexo demais para ter surgido subitamente durante a evolução. Recentemente, LIPMANN (1971) procurou analisar processos sintéticos envolvendo a formação de ligações peptídicas, que apresentassem complexidade intermediária entre a síntese proteica pelos ribosomas e a síntese de ácidos graxos pelo complexo multienzimático do citoplasma, por exemplo.

Na produção de antibióticos cíclicos, como gramicidina S e tirocidina, encontra-se um sistema de polimerização de aminoácidos curiosamente semelhante àquele que leva à síntese dos ácidos graxos. Realmente, há formação de pentapeptídios lineares que depois se juntam aos pares, constituindo uma molécula cíclica. A ligação dos aminoácidos é feita passo a passo, numa ordem rigorosamente obedecida e, tanto a ativação quanto a polimerização, são processados na superfície de uma enzima que tam-

bém parece servir como "template".

O que parece importante e comum a todos os processos citados até aqui, é a incorporação de aminoácidos por sistemas acelulares, sempre em ausência de ribosomas.

Pelo confronto entre cada tipo de incorporação descrito e o sistema estudado neste trabalho, torna-se claro que ocorre com membranas uma síntese diferente daquelas mencionadas.

O requerimento energético do sistema não é absoluto. A síntese desenvolve-se mesmo na ausência de fornecimento de ATP + sistema gerador de ATP e apresenta níveis normais com omissão de GTP. A omissão de enzima pH 5 ou a presença de puromicina têm ambos efeitos inibitórios apenas moderados sobre o processo de incorporação.

Um resultado particularmente interessante é obtido para o efeito de RNase sobre o processo. A inibição discreta observada parece estar de acordo com a afirmação de vários autores sobre a insensibilidade do RNA de membrana à ação de RNase (SHAPOT & PITOT, 1966 ; ITO & SATO, 1968).

Todas essas características distinguem a incorporação estudadas nesse trabalho daquela promovida por preparações de ribosomas ou microsomas.

A incorporação de aminoácidos pela fração de membranas tem sido descrita de modo claro ou apenas sugerida, há bastante tempo. Comparando os resultados apresentados por vários autores que estudaram sistemas bacterianos com aqueles encontrados neste trabalho , verificam-se numerosas semelhanças. Assim, por exemplo , em Bacillus megaterium, foi descrita uma incorporação pela fração de membranas maior do que a apresentada por

outras frações celulares. Essa atividade era estimulada por tRNA, mas insensível à RNase. O ATP promovia cerca de 50% de estimulação ao processo (WACHSMANN, FUKUHARA & NISMAN, 1960). Com protoplastos da mesma bactéria ou com uma fração isolada de membranas, BUTLER, CRATHORN & HUNTER (1958), descreveram uma incorporação independente de ATP e GTP. Esses e outros autores citam, como um estudo precursor dos seus, a incorporação obtida com células rompidas de estafilococos, descrita por GALE & FOLKES (1955), embora não haja, nesse trabalho, indicação clara da presença exclusiva de membranas como entidade promotora da incorporação.

Em mamíferos, a indicação da existência de radioatividade associada à fração microsômica solúvel em DOC, aparece desde o trabalho clássico de LITTLEFIELD, KELLER, GROSS & ZAMECNIK (1955). A marcação do retículo endoplasmático liso, após a administração "in vivo" de um aminoácido radioativo, é bem conhecida e interpretada como sendo produzida por translocação de proteínas sintetizadas ao nível do retículo rugoso (PETERS, 1962). Essa radioatividade poderia, entretanto, aparecer como decorrência de mais do que um só processo. Quando se compara a atividade de incorporação de aminoácidos marcados "in vitro" por retículo rugoso e reticulo liso, encontram-se níveis maiores de radioatividade para o retículo rugoso. Apesar disso, um nível considerável de marcação aparece em retículo liso. Essa radioatividade é cerca de 25-30% do total quando se relaciona a marcação com o teor em proteína da partícula utilizada, mas eleva-se a 50% quando é medido com relação ao teor em RNA da partícula. Esses cálculos parecem, mesmo assim, imperfeitos, pois os autores (HALLINAN & MUNRO , 1965) levaram em consideração apenas a radioatividade dependente do fornecimento de energia exógena, desprezando o eventual resultado de processos desenvolvidos com

auxílio do conteúdo endógeno das partículas utilizadas.

Estudando a variação da capacidade sintética de ribosomas ao longo do tempo, MURTHY (1972) encontrou diferenças acentuadas que dependiam do fato de estarem ou não essas partículas associadas às membranas. Para explicar seus resultados, o autor propôs que "as membranas dos ribosomas associados parecem ter o efeito de promover, por si próprias, a incorporação de aminoácidos, uma vez que a remoção dessas membranas por DOC resulta numa diminuição da capacidade de incorporação".

No mesmo trabalho, fica claro que os resultados não são devidos à ação do detergente sobre os agregados de polisomas, cujo perfil em gradiente de sacarose mantem-se inalterado após o tratamento.

Se for feita a hipótese de que a incorporação por membranas representa uma síntese "de novo", deveremos admitir algumas semelhanças entre este processo e a clássica síntese proteica feita por ribosomas. Os dados obtidos com a presença de NaF e anisomicina no meio de incubação sugerem que o processo estudado deve utilizar, ao menos parcialmente, o equipamento enzimático responsável pela síntese proteica. De fato, mesmo atuando sobre etapas diferentes do processo, tanto NaF (BISHOP, 1968) quanto anisomicina (GROLLMAN, 1967) são inibidores de síntese de proteínas.

A indiferença do sistema ao nível de GTP poderia indicar uma inteira indiferença quanto a esse nucleosídiotrifosfato. Como a presença de GMPPCP causa inibição apreciável, a independência não deve ser real, mas apenas resultante de um conteúdo endógeno que a partícula carrega consigo, durante o seu isolamento. Essa conclusão é reforçada pela inibição observada em presença de ácido fusídico, inibidor de GTPase (TANAKA, KINOSHITA & MASUKAWA, 1968).

O conteúdo endógeno da partícula deve compreender outros componentes e, uma vez admitido, torna lógicos os resultados relacionados com os efeitos de ATP e de enzima pH 5.

Sabe-se que a hidrólise da molécula de GTP está relacionada com a translocação de peptidil-tRNA nos sítios de ribosomas. Em um sistema como o descrito neste trabalho, que independe de ribosomas, haveria também uma translocação? Ou, poder-se-ia perguntar de modo mais amplo: a que serve a energia derivada da hidrólise de GTP? São questões para as quais não se pode, no momento, formular hipóteses plausíveis.

Os resultados obtidos com a fração de membranas assumem maior interesse quando comparados a alguns dados recentes relacionados às enzimas de ativação de aminoácidos.

Há algum tempo, HOAGLAND & ASKONAS(1963) isolaram, por centrifugação, uma fração pós-microsomal , a que denominaram "fração X", capaz de estimular a incorporação de aminoácidos. Isoladamente, a fração X não apresenta capacidade sintética e seu componente ativo é precipitável a pH 5. As propriedades da fração X devem estar, pelo menos em parte, relacionadas com seu conteúdo de aminoacil-tRNA sintetases: De fato, quando essa fração é submetida à análise através de gel de Sephadex, pode-se isolar uma sub-fração aparentemente homogênea , capaz de ativar um grupo de aminoácidos, constituído por ácido glutâmico, isoleucina, leucina, lisina e metionina.

O estudo dessa sub-fração, feito por microscopia eletrônica, revela partículas de estrutura organizada. Essa situação parece ser comum a todas as aminoacil sintetases, pois há evidências de que essas enzimas estão sempre agrupadas em complexos de alto peso molecular (VENNEGOOR & BLOEMENDAL, 1972).

O sistema particulado constituído pelas

aminoacil sintetases pode ser dissociado por excesso de homogenização do tecido, desfazendo a ligação original desse complexo ao retículo endoplasmático. Uma vez liberado, esse componente passa a fazer parte da fração solúvel, a partir da qual pode ser precipitado e entrar na constituição da enzima pH 5.

Pode-se especular também sobre uma possível relação entre a incorporação de aminoácidos apresentada por membranas e a existência de miniproteínas como elementos constitutivos de membranas biológicas. Foram isolados, a partir de membranas de vários tipos de células de mamíferos, um grupo de peptídios - todos, ou quase todos, glicopeptidios - denominados miniproteínas, em virtude de seu baixo peso molecular (LAICO, RUOSLAHTI, PAPERMASTER & DREYER, 1970). Esse componente é geralmente perdido na análise de proteínas de membranas uma vez que, em corrida eletroforética sobre gel de acrilamida, desloca-se mais rapidamente do que o corante marcador. Esses peptídios podem sofrer uma polimerização reversível, "in vitro", e os autores responsáveis pelo seu isolamento acreditam que o processo possa refletir um fenômeno responsável pela formação e crescimento de membranas biológicas, "in vivo".

Finalmente, é importante lembrar que a produção de proteínas informadas por mensageiros estáveis está diretamente relacionada a um sistema sintético, em cuja constituição as membranas desempenham papel fundamental.

RESUMO

Foi isolada uma sub-fração de microsomas, constituída por membranas do retículo endoplasmático, através do tratamento do sobrenadante pós-mitocondrial por detergente.

Em testes de microscopia eletrônica e ultracentrifugação analítica, esta preparação de membranas apresentou-se livre de contaminação por outras organelas celulares.

Quando incubada em condições adequadas, a fração de membranas incorpora vários aminoácidos em um produto insolúvel em TCA a quente.

O tratamento do material incorporado com enzimas proteolíticas acarreta a perda de cerca de 60% da radioatividade derivada de aminoácidos marcados. Não há liberação de radioatividade por tratamento com RNase, DNase, lecitinase ou α-amilase.

A remoção de aminoácidos terminais não implica em diminuição considerável de radioatividade.

As melhores condições de pH e concentração de Mg para o processo são próximas às fisiológicas.

O requerimento de ATP e enzima pH 5 no meio de incubação não é absoluto, mas sua adição estimula o processo.

Há indicações de que a independência de fornecimento externo de GTP para o processo resulta de um conteúdo endógeno da partícula.

O processo de incorporação é inibido em parte por RNase, NaF, puromicina e anisomicina.

BIBLIOGRAFIA

ABRAMS, A. & McNAMARA, P. - Polynucleotide phosphorylase in isolated bacterial cell membranas. J. Biol. Chem., 237: 170, 1962.

ABRAMS, A., NIELSEN, L. & THAEMERT, J. - Rapidly synthesized ribonucleic acid im membrane ghosts from Streptoccocus fecalis protoplasts. Biochem. Biophys. Acta, 80: 325, 1964.

ALLFREY, V.G. - Nuclear ribosomes, messenger-RNA and protein synthesis. Exptl. Cell Res. supp., 9: 183, 1963.

ANDREWS, T.M. & TATA', J.R. - Difference in vectorial release of nascent protein from membrane-bound ribosomes of secretory and non-secretory tissues Biochem. Biophys. Res. Commun., 32: 1050, 1968.

ARNSTEIN, H.R.V., COX, R.A. & HUNT, J.A. - The effect of ribosomal ribonucleic acid and polyuridylic acid on the amino acid incorporation by rabbit-reticulocyte ribosomes. Biochem. J., 84: 91P, 1962.

ARONSON, A. - Membrane-bound messenger RNA and polysomes in sporulating-bacteria. J. Mol. Biol. 13: 92, 1965.

BARONDES, S.H. & NIREMBERG, M.W. - Fate of a synthetic polynucleotide directing cell-free protein synthesis. II. Association with ribosomes. Science, 138: 813, 1962.

BERGMANN, M. - A classification of proteolytic enzymes. In: NORD, F.F. & WERKMAN, C.H., eds. Advances in enzymology. New York, Interscience, 1942. v. 2, p. 49.

BIRNSTIEL, M.L., CHIPCHASE, M.I.H. & HAYES, R.J. - Incorporation of l-(^{14}C) leucine by isolated nuclei. Biochem. Biophys. Acta, 55: 728, 1962.

BIRNSTIEL, M.L.& HYDE, B.B. - Protein synthesis by isolated pea nucleoli. J. Cell Biol., 18: 41 , 1963.

BISHOP, J.O. - Effect of puromycin and sodium floride on reticulocyte ribosomal monomers and subribosomal particles. Arch. Biochem. Biophys., 125: 449, 1968.

BORSOOK, H., DEASY, C.L., HAAGEN-SMIT, A.J., KEIGHLEY, G. & LOWY, P.H. - The incorporation of labeled lysine into the proteins of guinea pig liver homogenate. J. Biol. Chem., 179: 689, 1949.

BORSOOK, H., DEASY, C.L., HAAGEN-SMIT, A.J., KEIGHLEY, G. & LOWY, P.H. - A peptide fraction in liver. J. Biol. Chem., 179: 705, 1949a.

BORSOOK, H., DEASY, C.L., HAAGEN-SMIT, A.J., KEIGHLEY, G. & LOWY, P.H. - The uptake in vitro of C^{14}-labeled glycine, l-leucine and l-lysine by different components of guinea pig liver homogenate. J. Bio. Chem., 184: 529, 1950.

BORSOOK, H., DEASY, C.L., HAAGEN-SMIT, A.J., KEIGHLEY, G. & LOWY, P.H. - Metabolism of C^{14}-labeled glycine, l-histidine, l-leucine, and l-lysine. J. Bio. Chem., 187: 839, 1950a.

BRENNER, S., JACOB, F. & MESELSON, M. - An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. Nature, 190:576, 1961.

BRENTANI, R.R. - Caracterização de um biopolímero informacional de origem nucleolar. São Paulo, 1969 - Tese de Livre-Docência - Faculdade de Medicina da U.S.P.

BRENTANI, R., BRENTANI, M., BOUQUET, M. & RAW, I. - Localização citoplasmática do ácido ribonucleico mensageiro. Ciência e Cultura, 20: 431 , 1968.

BRONK, J.R. - The nature of the energy requirement for amino acid incorporation by isolated mitochondria and its significance for thyroid hormone action. Proc. Natl. Acad. Sci., 50: 524, 1963.

BUBELA, B. & HOLDSWORTH, E.S. - Protein synthesis in Bacillus stearothermophilus. Biochem. Biophys. Acta, 123: 376, 1966.

BUCHER, N.L.R. - The formation of radioactive cholesterol and fatty acids from C^{14}- labeled acetate by rat liver homogenates. J. Amer. Chem. Soc., 75: 498, 1953.

BUTLER, J.A.V., CRATHORN, A.R. & HUNTER, G.D. - The site of protein synthesis in Bacillus megaterium. Biochem. J., 69: 544, 1958.

CAMPBELL, P.N., COOPER, C. & HICKS, M. - Studies on the role of the morphological constituents of the microsomes fraction from rat liver in protein synthesis. Biochem. J. 92: 225, 1964.

CHAUVEAU, J., MOULÉ, Y. & ROUILLER, C. - Localisation de l'acide ribonucléique dans les diverses structures morphologiques des microsomes de foie de rat. Exptl. Cell Res., 13: 398, 1957.

CLARK-WALKER, G.D. & LINNANE, A.W. - In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics. Biochem. Biophys. Res. Commun., 25: 8, 1966.

CLAUDE, A. - The constitution of protoplasm. Science, 97: 451, 1943.

COLLI, W. - Incorporação de aminoácido em mitocôndria de célula miocárdica. São Paulo, 1966 - Tese de Doutoramento - Faculdade de Medicina da U.S.P.

COWIE, D.B. & McCLURE, F.T. - Metabolic pools and the synthesis of macromolecules. Biochem. Biophys. Acta, 31: 236, 1959.

DISCHE, Z. & SCHWARZ, K. - In Nucleic Acids , E. Chargaff. New York, Academic Press, 1955, v. 1 , p. 301.

ERNSTER, L., SIEKEVITZ, P. & PALADE, G.E. - Enzyme-structure relationships in the endoplasmic reticulum of rat liver - A morphological and biochemical study. J. Cell Biol., 15: 541, 1962.

FLORINI, J.R. & BREUER, C.B. - Amino acid incorporation into protein by cell-free preparation from rat skeletal muscle. III - Comparison of activity of muscle and liver ribosomes. Biochemistry, 4: 253, 1965.

FRENSTER, J.H., ALLFREY, V.G. & MIRSKY, A.E. - In vitro incorporation of amino acids into the proteins of isolated nuclear ribosomes. Biochem. Biophys. Acta, 47: 130, 1961.

GALE, E.F. & FOLKES, J.P. - The assimilation of amino acids by bacteria - 20. The incorporation of labelled amino acids by disrupted staphylococcal cells. Biochem. J., 59: 661, 1955.

GANOZA, M.C. & WILLIAMS, C.A. - In vitro synthesis of different categories of specific protein by membrane-bound and free ribosomes. Proc. Nat. Acad. Sci., 63: 1370, 1969.

GARDNER, J.A.A. & HOAGLAND, M.B. - A unique ribonucleic acid of low molecular weight from rat liver microsomes. J. Biol. Chem., 243: 10, 1968.

GLAZER, R.I. & SARTORELLI, A.C. - The differential sensitivity of free and membrane-bound polyribosomes to inhibitors of protein synthesis . Biochem. Biophys. Res. Commun, 46: 1418, 1972.

GODSON, G.N., HUNTER, G.D. & BUTLER, J.A.V. - Cellular components of Bacillus megaterium and their role in protein biosynthesis. Biochem. J., 81:59, 1961.

GOSWAMI, P., BARR, G.C. & MUNRO, H.N. - The origin of different types of ribonucleic acid in rat- liver microsomes. Biochem. Biophys. Acta, 55: 408, 1962.

GOULD, R.M., THORNTON, M.P., LIEPKALNS, V. & LENNARZ, W.J. - Participation of aminoacyl transfer ribonucleic acid in aminoacyl phosphatidylglycerol synthesis. II. Specificity of alanyl phosphatidylglycerol synthetase. J. Biol. Chem . 243: 3096, 1968.

GROLLMAN, A.P. - Inhibitors of protein biosynthesis.II. Mode of action of anisomycin. J. Biol. Chem., 242: 3226, 1967.

GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURKLAND, C. G. , RISEBROUGH, R.W. & WATSON, J.D. - Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of Escherichia coli. Nature, 190: 581, 1961.

HAINING, J.L., FUKUI, T. & AXELROD, B. - Incorporation of amino acids into lipoidal material by microsomal and supernatant fractions of rat tissues. J. Biol. Chem., 235: 160, 1960.

HALLBERG, P.A. & HAUGE, J.G. - The involvement of membranes in protein synthesis in Bacterium anitratum. Biochem. Biophys. Acta, 95: 80, 1965.

HALLINAN, T., FLECK, A. & MUNRO, H.N. - Loss of ribonucleic acid into lipid solvents after acid precipitation. Biochem. Biophys. Acta, 68: 131, 1963.

HALLINAN, T. & MUNRO, H.N. - Protein synthesis and RNA turnover in rat liver microsome subfractions. Biochem. Biophys. Acta, 108: 285, 1965.

HALVORSON, H.O. & COHEN, G.N. - Incorporation des amino-acides endogènes et exogènes dans les protéines de la levure. Ann. Inst. Pasteur, 95: 73, 1958.

HAUGE, J.G. & HALVORSON, H.O. - The role of a large particle fraction from yeast in protein synthesis. Biochem. Biophys. Acta, 61: 101, 1962.

HAWTREY, A.O. & SCHIRREN, V. - Preparation of an active nucleoprotein complex from rat-liver microsomes by isooctane extration. Biochem. Biophys Acta, 61: 467, 1962.

HENDLER, R.W. - Passage of radioactivity between protein fractions of hen oviduct homogenate. J. Biol. Chem. 229: 553, 1957.

HENDLER, R.W. - Some properties and the possible metabolic significance of amino acid-lipid complexes. Biochem. Biophys. Acta, 49: 297, 1961.

HENDLER, R.W. - A model for protein synthesis. Nature, 193: 821, 1962.

HENDLER, R.W., BANFIELD, W.G., TANI, J. & KUFF, E.L. - On the cytological unit for protein synthesis in vivo in E. coli. III - Electron microscopic and ultracentrifugal examination of intact cells and fractions. Biochem. Biophys. Acta, 80: 307, 1964.

HENDLER, R.W. & TANI, J. - On the cytological unit for protein synthesis in vivo in E. coli. II - Studies sith intact cell of type B. Biochem. Biophys. Acta, 80: 294, 1964.

HENSHAW, E.C., BOJARSKI, T.B. & HIATT, H.H. - Protein synthesis by free and bound rat liver ribosomes in vivo and in vitro. J. Mol. Biol., 7: 122, 1963.

HICKS, S.J., DRYSDALE, J.W. & MUNRO, H.N. - Preferential synthesis of ferritin and albumin by different populations of liver polysomes. Science, 164: 584, 1969.

HINMAN, N.D. & PHILLIPS, A.H. - Similarity and limited multiplicity of membrane proteins from rough and smooth endoplasmic reticulum. Science, 170: 1222, 1970.

HOAGLAND, M.B. - An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. Biochem. Biophys Acta, 16: 288, 1955.

HOAGLAND, M.B. & ASKONAS, B.A. - Aspects of control of protein synthesis in normal and regenerating liver. I - A cytoplasmic RNA-containing fraction that stimulates amino acid incorporation. Proc. Natl. Acad. Sci., 49: 130, 1963.

HOAGLAND, M.B., KELLER, E.B. & ZAMECNIK, P.C. -Enzymatic carboxyl activation of amino acids. J. Biol. Chem. , 218: 345, 1956.

HOAGLAND, M.B., STEPHENSON, M.L., SCOTT, J.F. HECHT, L.I. & ZAMECNIK, P.C. - A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. J. Biol. Chem., 231: 241, 1958.

HOLLEY, R.W. - An alanine-dependent, ribonuclease - inhibited conversion of AMP to ATP, and its possible relationship to protein synthesis. J. Amer. Chem . Soc., 79: 658, 1957.

HULTIN, T. - Incorporation in vivo of ^{15}N-labeled glycine into liver fractions of newly hatched chicks. Exptl. Cell Res., 1: 376, 1950.

HUNTER, G.D., BROOKES, P., CRATHORN, A.R. & BUTLER, J. A.V. - Intermediate reactions in protein synthesis by the isolated cytoplasmic-membrane fraction of Bacillus megaterium. Biochem. J., 73: 369, 1959.

HUNTER, G.D. & GOODSALL, R.A. - Lipo-amino acid complexes from Bacillus megaterium and their possible role in protein synthesis. Biochem. J., 78: 564, 1961.

ITO, A. & SATO, R. - Action of ribonuclease T_1 on smooth-surface vesicles of liver microsomes:evidence for the presence of membrane ribonucleic acid. J. Biochem., 64: 699, 1968.

KAJI, A., KAJI, H. & NOVELLI, G.D. - Soluble amino acid incorporating system. I - Preparation of the system and nature of the reaction. J. Biol. Chem., 240: 1185, 1965.

KASHNIG, D.M. & KASPER, C.B. - Isolation, morphology and composition of the nuclear membrane from rat liver. J. Biol. Chem., 244: 3786, 1969.

KELLER, E.B. - Turnover of proteins of cell fractions of adult rat liver in vivo. Federation Proc., 10: 206, 1951.

KELLER, E.B. & ZAMECNIK, P.C. - The effect of guanosine diphosphate and triphosphate on the incorporation of labeled amino acids into protein. J. Biol. Chem., 221: 45, 1956.

KING, H.W.S. & FITSCHEN, W. - Characterisation of RNA from the smooth endoplasmic reticulum of rat liver. Biochem. Biophys. Acta, 155: 32, 1968.

KIPNIS, D.M., REISS, E. & HELMREICH, E. - Functional heterogeneity of the intracellular amino acid pool in mammalina cells. Biochem. Biophys. Acta, 51: 519, 1961.

LAICO, M.T., RUOSLAHTI, E.I., PAPERMASTER, D.S. & DREYER, W.J. - Isolation of fundamental polypeptide subinits of biological membranes. Proc. Natl. Acad. Sci., 67: 120, 1970.

LAMBORG, M. & ZAMECNIK, P.C. - Amino acid incorporation into protein by extracts of E. coli. Biochem . Biophys. Acta, 42: 206, 1960.

LEIBOWITZ, M.J. & SOFFER, R.L. - Enzymatic modification of proteins. III - Purification and properties of a leucyl, phenylalanyl transfer ribonucleic acid-protein transferase from Escherichia coli. J. Biol. Chem., 245: 2066, 1970.

LENGYEL, P. - The process of translation as seen in 1969. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 34: 828, 1969.

LENNARZ, W.J. BONSEN, P.P.M. & von DEENEN, L. L. M. - Substrate specificity of O-L-lysylphosphatidylglycerol synthetase. Enzymatic studies of the structure of O-L-lysylphosphatidylglycerol. Biochemistry , 6: 2307, 1967.

LITTLEFIELD, J.W., KELLER, E.B., GROSS, J. & ZAMECNIK , P.C. - Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. J. Biol. Chem., 217: 111, 1955.

LIPMANN, F. - Mechanism of peptide bond formation.Federation Proc., 8: 597, 1949.

LIPMANN, F. - Attempts to map a process evolution of peptide bioshynthesis. Science, 173: 875, 1971.

LOFTFIELD, R.B., GROVER, J.W. & STEPHENSON,M.L.- Possible role of proteolytic enzymes in protein synthesis . Nature, 171: 1024, 1953.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. - Protein estimation with the Folin reagent. J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.

MANGANIELLO, V.C. & PHILLIPS, A.H. - The relationship between ribosomes and the endoplasmic reticulum during protein synthesis. J. Biol. Chem., 240 : 3951, 1965.

MANS, R.J. & NOVELLI, G.D. - Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filter-paper disk method. Arch.Biochem. Biophys., 94: 48, 1961.

MATSUHASHI, M. DIETRICH, C.P. & STROMINGER , J. L. - Biosynthesis of the peptidoglycan ob bacterial cell walls. III - The role of soluble ribonucleic acid and of lipid intermediates in glycine incorporation in Staphylococcus aureus. J. Biol . Chem., 242: 3191, 1967.

McCARTY, K.S., PARSONS, J.T., CARTER, W.A. & LASZLO, J.- Protein-synthetic capacities of liver nuclear subfractions. J. Biol. Chem., 241: 5489, 1966.

McCORQUODALE, D.J. & ZILLIG, W. - Untersuchunger zur Biosynthese der Proteine. II - Uber die Verteilung der aminosäureaktivierenden Enzyme in Zellfraktionen aus Homogenaten von Escherichia coli B. Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem., 315: 86, 1959.

MURTHY, M.R.V. - Free and membrane-bound ribosomes of rat cerebral cortex. J. Biol. Chem., 247: 1936 , 1972.

NORTON, S.J., KEY, M.D. & SCHOLES, S.W. - Some studies of the association of amino acid-activating enzymes with isolated microsomes of chick embryo. Arch. Biochem. Biophys., 109: 7, 1965.

OGATA, K. & NOHARA, H. - The possible role of the ribonucleic acid (RNA) of the pH 5 enzyme in amino acid activation. Biochem. Biophys. Acta , 25: 659, 1957.

PALADE, G.E. - A small particulate component of the cytoplasm. J. Biophys. Biochem. Cytol., 1: 59 , 1955.

PALADE, G.E. & SIEKEVITZ, P. - Liver microsomes - an integrated morphological and biochemical study . J. Biophys. Biochem. Cytol., 2: 171, 1956.

PALADE, G.E. & SIEKEVITZ, P. - Pancreatic microsomes - an integrated morphological and biochemical study. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2: 671, 1956a.

PETERS, T. Jr. - The biosynthesis of rat serum albumin. J. Biol. Chem., 237: 1186, 1962.

PETROVIĆ, E., BEĆAREVIĆ, A. & PETROVIĆ, J. - The isolation and stability of rapidly-labelled ribonucleic acids from rat-liver microsomes.Biochem. Biophys. Acta, 95: 518, 1965.

PORTER, K.R. - The fine structure of cells. Federation Proc., 14: 673, 1955.

RAGNOTTI, G., LAWFORD, G.R. & CAMPBELL, P.N.-Biosynthesis of microsomal nicotinamide-adenine dinocleutide phosphate-cytochrome c reductase by membrane-bound and free polysomes from rat liver. Biochem. J. , 112: 139, 1969.

RAPPOPORT, D.A. & MURTHY, M.R.V. - Microsomal protein synthesis in the developing rat brain. Federation Proc., 23: 268, 1964.

REDMAN, C.M. - Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. J. Biol. Chem., 244: 4308, 1969.

REES, K.R., ROWLAND, G.F. & VARCOE, J.S. - The metabolism of isolated rat-liver nucleoli and other subnuclear fractions. The active site of amino acid incorporation in the nucleus. Biochem. J., 86: 130, 1963.

REID, E. & STEVENS, B.M. - Ribonucleic acids in liver cytoplasm. Nature, 182: 441, 1958.

ROBERTS, L.E., BENSCH, K. & CARTER, C.E. - Amino acid activated adenosine triphosphate-pyrophosphate exchange by modified Escherichia coli cells. Biochem. Biophys. Acta, 90: 291, 1964.

ROBERTS, R.B. - In: ROBERTS, R.B. -Microsomal particles and protein synthesis. Oxford, Pergamon, 1958, p. viii. Citado em PETERMANN, M.L.- The physical and chemical properties of ribosomes. Amsterdan, Elsevier, 1964.

RODIONOVA, N.P. & SHAPOT, V.S. - Ribonucleic acids of the endoplasmic reticulum of animal cells. Biochem. Biophys. Acta, 129: 206, 1966.

SACHS, H. - Further studies on the amino acid incorporating system of rat liver microsomes. J. Biol. Chem., 233: 643, 1958.

SACHS, H. & WAELSCH, H. - The effect of pyrophosphate on amino acid incorporation into rat liver microsomes. Biochem. Biophys. Acta, 21:188, 1956.

SANGER, F. - Some chemical investigations on the structure of insulin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 14: 153, 1950.

SCHLESSINGER, D. - Protein synthesis by polyribosomes on protoplast membranes of B. megaterium. J. Mol. Biol., 7; 569, 1963.

SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S.J. - A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem., 161: 83, 1945.

SCHNEIDER, W.C. - Phosphorus compounds in animal tissues. I - Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem., 161: 293, 1945.

SHAPOT, V.S. & DAVIDOVA, S.Ya. - Liporibonucleoprotein as an integral part of animals cell membranes . In: Progress in nucleic acid research and molecular biology. New York, Academic Press, 1971, vol. 11, p. 81.

SHAPOT, V.S. & PITOT, H.C. - Isolation and fractionation of ribonucleic acid from the smooth endoplasmic reticulum of rat liver. Biochem. Biophys. Acta, 119: 37, 1966.

SIEKEVITZ, P. - Uptake of radioactive alanine in vitro into the proteins of rat liver fractions. J. Biol. Chem., 195:549, 1952.

SIEKEVITZ, P. & ZAMECNIK, P.C. - In vitro incorporation of 1-C^{14}-DL-alanine into the proteins of rat liver granular fractions. Federation Proc., 10: 246 , 1951.

SJOSTRAND, F.S. & HANZON, V. - Membrane structure of cytoplasm and mitochondria in exocrine cells of mouse pancreas as revealed by high resolution electron microscopy. Exptl. Cell Res., 7: 393 , 1954.

SOFFER, R.L. & MENDELSOHN, N. - Incorporation of arginine by a soluble system from sheep thyroid. Biochem. Biophys. Res. Commun., 23: 252, 1966.

STEELE, W.J., OKAMURA, N. & BUSCH, H. - Prevention of loss of RNA, DNA, and protein into lipid solvents. Biochem. Biophys. Acta, 87: 490, 1964.

STEPHENSON, M.L., THIMANN, K.V. & ZAMECNIK, P.C. - Incorporation of C^{14}-amino acids into protein of leaf disks and cell-free fractions of tobacco leaves. Arch. Biochem. Biophys., 65: 194, 1956.

SUIT, J.C. - Ribonucleic acid in a "membrane" fraction of Escherichia coli and its relation to cell-wall synthesis. J. Bact., 84: 1061, 1962.

SUIT, J.C. - Localization of desoxyribonucleic acid-like ribonucleic acid in a "membrane" fraction of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Acta, 72: 488, 1963.

SUTTIE, J.W. - The existence of two routes for incorporation of amino acids into protein of isolated rat-liver mitochondria. Biochem. J., 84: 382, 1962.

TAKAGI, M. & OGATA, K. - Direct evidence for albumin biosynthesis by membrane bound polysomes in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun., 33; 55 , 1968.

TAKAGI, M., TANAKA, T. & OGATA, K. - Functional differences in protein synthesis between free and bound polysomes of rat liver. Biochem. Biophys. Acta, 217: 148, 1970.

TANAKA, K., KINOSHITA, T. & MASUKAWA, H. - Mechanism of protein synthesis inihibition by fusidic acid and related antibiotics. Biochem. Biophys . Res. Commun., 30: 278, 1968.

TANI, J. & HENDLER, R.W. - On the cytological unit for protein synthesis in vivo in E. coli. I - Studies with spheroplasts of type K-12. Biochem. Biophys. Acta, 80: 279, 1964.

TISSIÈRES, A., SCHLESSINGER, D. & GROSS, F. - Amino acid incorporation into proteins by Escherichia coli ribosomes. Proc. Nat. Acad. Sci., 46; 1450, 1960.

TULEGENOVA, L.S., RODIONOVA, N.P. & SHAPOT, V. S. - Chemical fractionation of microsomes and metabolic activity of membrane RNA from rat liver.Biochem. Biophys. Acta, 166: 265, 1968.

VENKATARAMAN, P.R. - Observations on the effect of ethanol on rat-liver ribonucleoprotein previously exposed to trichloroacetic acid. Biochem. Biophys. Acta, 39: 352, 1960.

VENKATARAMAN, P.R. & LOWE, C.U. - Effect of ethanol on rat-liver ribonucleoprotein previously exposed to cold trichloroacetic acid. Biochem. J., 72: 430, 1959.

VENNEGOOR, C. & BLOEMENDAL, H. - Occurrence and particle character of aminoacyl-tRNA synthetases in the post-microsomal fraction from rat liver. Eur. J. Biochem., 26: 462, 1972.

VENNES, J.W. & GERHARDT, P. - Immunologic comparison of isolated surface membranes of Bacillus megaterium. Science, 124: 535, 1956.

WACHSMANN, J.T., FUKUHARA, H. & NISMAN, B. - The activation and incorporation of amino acids by subcelular fractions of Bacillus megaterium strain M. Biochem. Biophys. Acta, 42: 388, 1960.

WALEY, S. & WATSON, J. - The stepwise degradation of peptides. J. Chem. Soc., 3: 2394, 1951.

WANG, T.Y. - Ribonucleoprotein particles from isolated calf-thymus nuclei. Biochem. Biophys. Acta, 51: 180, 1961.

WARBURG, O. & CHRISTIAN, W. - Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem. Z., 310: 384, 1941.

WARNER, J.R., KNOPF, P.M. & RICH, A. - A multiple ribosomal structure in protein synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci., 49: 122, 1963.

WARNER, J.R., RICH, A. & HALL, C.E. - Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin. Science, 138: 1399, 1962.

WEIBULL, C. & BERGSTROM, L. - The chemical nature of the cytoplasmic membranes and cell wall of Bacillus megaterium, strain M. Biochem. Biophys. Acta, 30: 340, 1958.

WILSON, S.H., HILL, H.Z. & HOAGLAND, M.B. -Physiology of rat-liver polysomes. Protein synthesis by stable polysomes. Biochem. J., 103: 567, 1967.

WINNICK, T., FRIEDBERG, F. & GREENBERG, D.M. - The utilization of labeled glycine in the process of amino acid incorporation by the protein of liver homogenate. J. Biol. Chem., 175: 117, 1948.

WINTERSBERGER, E. - Proteinsynthese in isolierten Hefe-Mitochondrien. Biochem. Z., 341: 409, 1965.

YUDKIN, M.D. & DAVIS, B. - Nature of the RNA associated with the protoplast membrane of Bacillus megaterium. J. Mol. Biol., 12: 193, 1965.

ZAMECNIK, P.C. - Incorporation of radioactivity from DL-leucine-1-C^{14} into proteins of rat liver homogenates. Federation Proc., 12: 295, 1953.

ZAMECNIK, P.C. & KELLER, E.B. - Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins. J. Biol. Chem., 209: 337, 1954.

ZAMECNIK, P.C., KELLER, E.B., LITTLEFIELD, J.W., HOAGLAND, M.B. & LOFTFIELD, R.B. - Mechanism of incorporation of labeled amino acids into proteins. J. Cell Comp. Physiol., 47: 81,1956.

ZAMECNIK, P.C., STEPHENSON, M.L. & HECHT, K.I. - Intermediate reactions in amino acid incorporation. Proc. Nat. Acad. Sci., 44: 73, 1958.

ZIMMERMAN, E.F., HACKNEY, J., NELSON, P. & ARIAS, I.M. - Protein synthesis in isolated nuclei and nucleoli of HeLa cells. Biochemistry, 8: 2636, 1969.