

CARLOS TERMIGNONI

METIONINA AMINOPEPTIDASE DE FÍGADO DE RATO: DISTRIBUIÇÃO
SUBCELULAR E PROPRIEDADES

Tese preparada no Departamento de Bio-
química da Escola Paulista de Medicina
durante o curso de pós-graduação em Bio-
logia Molecular e apresentada como requi-
sito parcial para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

ORIENTADORES: Jorge Almeida Guimarães
José Leal Prado

1983

Y les doy estos consejos,
Que me ha costao alquiritlos;
Porque deseo dirigirlos,
Pero no alcanza mi cencia
Hasta darles la prudencia
Que precisan pa seguirlos

José Hernández

à Regina

AGRADECIMENTOS

- a Jorge Almeida Guimarães, pela orientação e por muito mais;
- a José Olavo de Freitas Jr., companheiro de jornada, por ter tornado o trabalho um prazer agradável;
- a Antonio João Sã de Siqueira, pelo incentivo e pela confiança;
- a José Leal Prado, pela orientação;
- a Helena B. Nader, Yara M.C. da Silva Michelacci, Eline S. Prado, Lucia Sampaio, Regina C.R. Stella, Catharina M.W. Brandi, Kaethy B. Alves, Regina P. Markus, Mariana S. Araújo Viel, Misako U. Sampaio, Carl P. Dietrich, Durval R. Borges e Claudio M. Sampaio, Luiz Juliano Neto pelas facilidades que proporcionaram e ainda mais pelo apoio constante;
- a todos colegas de curso, e em especial a Celia Carlini, Anita S. Takahashi, Maria Kouyoumdjian e Helio Takahashi pelo ambiente que proporcionaram;
- a Hercilia Molina, Eglelisa G. de Andrade, Nayde Faria e Manuel B. Torres pelo auxílio;
- a Dalton R. Weijhl e Louis J. Greene pelo auxílio na realização de alguns experimentos;
- aos colegas da Faculdade de Veterinária, à Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFRGS e aos Departamentos de Bioquímica e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina pela oportunidade que proporcionaram,

muito obrigado

Forneceram recursos financeiros para a
realização deste trabalho:

UFRGS

PICD/CAPES

FINEP

Abreviaturas

AANA	aminoacil-2-naftilamida
AANH ₂	aminoacil-amida
AApNA	aminoacil-p-nitroanilida
AlaNA	alanina-2-naftilamida
AlaNH ₂	alanina-amida
AlapNA	alanina-p-nitroanilida
ArgNA	arginina-2-naftilamida
BK	bradicinina
DEAE	dietilaminoetil
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
L	fração mitocôndria leve
LBK	lisil-bradicinina
LeuNA	leucina-2-naftilamida
LeuNH ₂	leucina-amida
LeupNA	leucina-p-nitroanilida
LysNA	lisina-2-naftilamida
M	fração mitocôndria pesada
MAP	metionina aminopeptidase
MAP-L	metionina aminopeptidase da mitocôndria leve
MAP-M	metionina aminopeptidase da mitocôndria pesada
MAP-P	metionina aminopeptidase do microsoma
MLBK	metionil-lisil-bradicinina
MetNA	metionina-2-naftilamida
MetNH ₂	metionina-amida
MetpNA	metionina-p-nitroanilida
N	fração núcleo
NAD	nicotina-amida-dinucleotídeo
NaPB	tampão fosfato de sódio 10 mM
P	fração microsoma
PBS	tampão fosfato de sódio 10 mM - NaCl 0,15 M
pOHMB	p-hidrôximercuribenzoato de sódio
S	fração solúvel
SDS	dodecilsulfato de sódio

S U M Á R I O

Introdução	1
Classificação e nomenclatura das aminopeptidases	3
Localização subcelular	6
Papel fisiológico	8
Objetivos	15
Material e Métodos	16
Reagentes	16
Equipamentos	17
Animais	17
Fracionamento subcelular	17
Preparo de peptídeos nascentes	23
Preparação da metionina aminopeptidase do homogenato	24
Determinação de atividade enzimática	25
Determinação da proteína	30
Medidas de condutividade	31
Concentração de amostras diluídas	31
Tratamento da resina e preparo das colunas de DEAE-celulose	31
Preparo das colunas de filtração em gel	32
Resultados	34
Observações preliminares	34
Características da preparação da metionina aminopeptidase do homogenato	36
Preparação de peptídeos nascentes	36

Distribuição subcelular das arilamidases hepáticas	38
Solubilização das enzimas particuladas	45
Fracionamento das arilamidases em DEAE-celulose	56
Propriedades da MAP	61
Discussão	80
Distribuição subcelular das atividades arilamidásicas	80
MetNAase como enzima de membrana	84
Separação e caracterização da MAP em frações subcelulares	87
Hidrólise de peptídeos	90
Conclusões	92
Perspectivas	93
Referências Bibliográficas	95
Apêndice	109

I N T R O D U Ç Ã O

A hidrólise intracelular de proteínas a aminoácidos é um processo complexo. Esta complexidade deve-se não só ao grande número de etapas envolvidas, mas principalmente porque pressupõe a participação de enzimas com uma gama de especificidade muito variada. Apesar da extensa literatura existente poucos dos sistemas envolvidos neste processo são perfeitamente conhecidos. Em linhas gerais, entretanto, este processo pode ser descrito simplificadaamente como uma sucessão de eventos em que a cadeia polipeptídica é sucessivamente fragmentada em cadeias menores por ação de endopeptidases (proteínases). Estas cadeias diminuem mais ainda pela ação simultânea ou sucessiva de exopeptidases (peptidases) que encurtam as extremidades N- e C-terminal removendo um a um os aminoácidos (aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente) ou removendo dipeptídeos (dipeptidilpeptidases ou peptidildipeptidases). Os dipeptídeos, por sua vez são hidrolizados a aminoácidos por um outro tipo de enzimas: as dipeptidases.

Nestes processos a especificidade pouco restrita da maioria das proteínases e peptidases constitui fator relevante, configurando condições para a proteólise extensiva e a degradação proteica por completo. Além da proteólise extensiva e total das proteínas a natureza apresenta

sistemas em que a hidrólise das proteínas não é completa. Estes processos distinguem-se fundamentalmente dos anteriores e apresentam característica particular no que diz respeito ao papel fisiológico e às enzimas envolvidas. Na proteólise extensiva há formação de aminoácidos livres que são reaproveitados na síntese de novas proteínas. Por este processo há a eliminação de proteínas e peptídeos (enzimas, hormônios) que tenham perdido suas funções no interior da célula, estando pois envolvido no envelhecimento celular (Schimke e Bradley, 1975).

Os sistemas de proteólise limitada estão geralmente associados à funções regulatórias. Nestes processos poucas e às vezes uma só ligação peptídica é hidrolizada no substrato proteico por proteases altamente específicas, como resultado na formação de produtos sem atividade fisiológica ou então peptídeos e proteínas dotados de atividade fisiológica nova ou modificada são liberados de precursores. Existem muitos sistemas nos quais o controle se dá através de proteólise limitada: transformação de pró-enzimas em enzimas ativas; ativação de zimogênios; conversão de pré-proteínas em proteínas maduras; ativação e inativação de peptídeos fisiologicamente ativos a partir de proteínas precursoras. Como exemplo de sistemas que utilizam estes processos pode-se citar algumas das enzimas digestivas de mamíferos; o sistema de coagulação do sangue e do sêmen; liberação de neuropeptídeos; sistemas de peptídeos hipo e hipertensores; remoção da porção peptídica que permite a secreção de proteínas através de membranas. Neste segundo grupo sobressai o caráter altamente específico das enzimas envolvidas.

Desta forma, a classificação e nomenclatura das proteases tem sido difícil. Dois fatos novos acrescentaram complexidade ao problema: 1- a descoberta de proteases dotadas de atividade endo- e exopeptidásica (Barrett, 1977) e 2- a observação recente de que mesmo as proteinases que

realizam proteólise limitada, e que são por conseguinte dotadas de especificidade secundária restrita onde a sequência P_1 , P_2 , P_3 e S_1 , S_2 e S_3 ao redor da ligação peptídica susceptível é essencial, são também ativas sobre mais de um substrato proteico (Schachter e Berger, 1967).

A nomenclatura, por sua vez, é também confusa pelo uso de muitos termos com significados diferentes. Neste trabalho usaremos a classificação recomendada pela International Union of Biochemistry (I.U.B., 1978; Barrett, 1980). Assim protease refere-se a qualquer enzima que hidrolize ligação peptídica; proteinase refere-se a proteases que hidrolizam ligação peptídica de maneira tal que os produtos formados contêm sempre três ou mais resíduos de aminoácidos. Estas enzimas são também denominadas endopeptidases. Peptidase e seu sinônimo exopeptidase refere-se a enzimas que atuam em apenas uma das extremidades da cadeia peptídica removendo aminoácidos ou dipeptídeos. Neste último grupo estão incluídas como sub-sub-classe as aminopeptidases (α -aminoacilpeptídeo hidrolases, EC 3.4.11.-) do âmbito deste trabalho.

CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS AMINOPEPTIDASES

Apenas quinze aminopeptidases já foram classificadas, mas um número muito grande destas enzimas tem sido descrito na literatura. A classificação de novas aminopeptidases é dificultada pela falta de informações precisas sobre suas propriedades de tal maneira que se possa compará-las entre si e com as enzimas já classificadas.

Outro fator que tem trazido confusão ao estudo das aminopeptidases é o grande número de tipos de substrato que são usados para o ensaio da atividade. O uso de peptídeos como substrato ideal apresenta dificuldades de ordem prática. Nos primeiros trabalhos a hidrólise enzimática

ca de peptídeos foi estudada por Linderström-Lang (1929) através da titulação do grupo NH_2 livre na solução. Este método é pouco sensível quando um pequeno número de ligações é hidrolizada. Posteriormente foram desenvolvidos métodos baseados na reação quantitativa de aminoácidos com ninhidrina (Matheson e Tattrie, 1964) e na reação do grupo amina com ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (Fields, 1971). Nestes métodos o grupamento amino livre tanto do produto como do substrato reagem formando as mesmas substâncias coradas. Assim, a sensibilidade destes métodos é pequena pois com a hidrólise de 100% de um dipeptídeo há apenas duplicação nos valores de absorvância. A dosagem de aminoácidos com analisador automático trouxe considerável avanço tecnológico ao ensaio destas enzimas. O custo elevado, entretanto, torna o método impraticável quando são necessárias muitas análises.

Vários substratos contendo ligação amida foram desenvolvidos para o ensaio das aminopeptidases. Destes substratos artificiais os mais simples são as amidas de aminoácidos. Neste caso a hidrólise é acompanhada pela determinação de amônio livre no incubado. Foram também desenvolvidos alguns substratos cromogênicos: aminoacil-2-naftilamidas (Gomori, 1954; Green et al., 1955) e aminoacil-p-nitroanilidas (Erlanger et al., 1961). A hidrólise destes substratos não indica necessariamente que a enzima tenha ação sobre peptídeos. Em vista disto a hidrólise de AANA foi denominada de atividade arilamidásica (Patterson et al., 1963).

Se por um lado o uso de substratos artificiais veio facilitar o ensaio da atividade destas enzimas também introduziu muita confusão na literatura. Como as aminopeptidases possuem especificidade não restrita para o resíduo de aminoácido N-terminal de peptídeos e proteínas, o emprego indiscriminado de substratos diferentes fez com que se tornasse impossível determinar a que enzima se referem os resultados apresentados em

muitos trabalhos.

Um exemplo bem claro das dificuldades encontradas para a classificação das aminopeptidases é a sugestão de McDonald e Schwabe (1977) de que a enzima descrita por Smith et al. (1965) seria idêntica à alanina aminopeptidase descrita por Behal et al. (1966), propõem ainda que esta enzima receba o nome de citosol aminopeptidase III. No capítulo seguinte do mesmo livro Kenny (1977) afirma que a enzima descrita por Smith et al. (1965) é a aminopeptidase M que se localiza no microsoma.

A leucina aminopeptidase, a primeira aminopeptidase descrita, é o melhor exemplo da confusão reinante na literatura, pois criou-se o consenso de imputar a esta enzima qualquer atividade sobre substratos contendo leucina em ligação amida. Até hoje, entretanto não se tem certeza sobre a atividade catalítica desta enzima sobre leucil-2-naftilamida (McDonald e Schwabe, 1977). Apesar disso, leucil-2-naftilamida tem sido o substrato de escolha de diversos autores nas tentativas de quantificação desta enzima em extratos de tecidos animais. Provavelmente a atividade detectada com este substrato pertença a outras enzimas. Além disto foram encontradas enzimas que tem ação: a) apenas sobre LeuNH_2 ; b) apenas sobre LeuNA e c) tanto sobre LeuNH_2 como sobre LeuNA (Patterson et al., 1963; Ledeme et al., 1981).

Assim, conclui-se que a atividade sobre substratos artificiais não é por si só suficiente para caracterizar uma arilamidase como aminopeptidase. Para tanto, e também para distinguí-las das dipeptidases, é necessário demonstrar inequivocamente que elas catalizam a hidrólise de peptídeos (ao menos tripeptídeos).

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

Um dos enfoques que se tem empregado na tentativa de identificar inequivocamente e caracterizar aminopeptidases é o estudo da localização subcelular.

O método de centrifugação diferencial usado para o fracionamento destas e de outras enzimas apresenta ainda restrições intrínsecas. Uma delas é a grande variação de tamanho que as populações de cada organela de uma mesma célula apresentam. Há também um inconveniente de natureza operacional: em rotores basculantes ("swiming bucket") ou de ângulo a força centrífuga no fundo do tubo é diferente daquela no tampo do tubo. Assim, uma velocidade de centrifugação que precipite grandes partículas no tampo do tubo pode ser suficiente para sedimentar organelas pequenas que estejam no fundo do tubo (Chambers e Rickwood, 1978). Por estas razões os métodos de fracionamento subcelular levam apenas à obtenção de frações enriquecidas em dada organela. O controle do grau de pureza das frações pode ser feito por microscopia eletrônica ou ainda pela atividade de enzimas marcadoras cuja presença em dada organela tenha sido estabelecida por metodologia histoquímica (Chambers e Rickwood, 1978). O exame microscópico permite também a verificação da integridade das partículas. Contudo a associação dos resultados da microscopia com o perfil de distribuição de enzimas marcadoras é um critério de controle mais refinado. A ressuspensão dos sedimentos, seguido de nova centrifugação, diminui a contaminação mas prejudica o rendimento da organela purificada e ainda, se repetido por diversas vezes o atrito excessivo leva a lesões nas organelas.

Além dos problemas inerentes ao próprio método, a representação correntemente usada para descrever as condições de centrifugação (x g por y min.) é insuficiente para permitir a reprodução dos experimentos.

Variações entre equipamentos no que se refere ao tamanho dos rotores, tempos de aceleração e desaceleração não são considerados neste sistema de representação mas influem na reprodutibilidade dos experimentos realizados num mesmo equipamento. Para contornar estas dificuldades e possibilitar a reprodução dos experimentos a sugestão de De Duve e Berthet (1953) constitue aspecto fundamental, mas nem sempre obedecido por diversos e distintos autores. Neste caso, as condições de centrifugação são representadas de maneira que a totalidade da força centrífuga aplicada às partículas é considerada. Para tal, a representação das condições de centrifugação em g.min é a adequada (DeDuve e Berthet, 1953), desde que se utilizem sistemas centrífuga-rotores devidamente calibrados.

Algumas tentativas de determinar com sucesso a localização subcelular de aminopeptidases foram feitas no Centre de Biochimie et de Biologie Moléculaires (C.N.R.S., de Marseille). Os trabalhos mostraram a presença de aminopeptidases na membrana de células intestinais, renais e da tireóide. Foi demonstrado também a maneira pela qual estas aminopeptidases (aminopeptidase N e aminopeptidase A) inserem-se na membrana (Maroux et al., 1973; Louvard et al., 1976; Desnuelle, 1979; Louvard, 1980; Gorvel et al., 1980; Ferracci e Maroux, 1980; Benajiba e Maroux, 1980; Benajiba e Maroux, 1981; Hovsépian et al., 1982).

A localização subcelular de outras aminopeptidases permanece ainda indefinida. Atividade arilamidásica foi detectada em várias organelas. Entretanto as diferenças entre as condições de fracionamento não permitem a comparação dos resultados encontrados (Smith et al, 1965; Mäkinen et al, 1970; Lundgren e Roos, 1974; Mahadevan e Trappel, 1967; Freitas Jr. et al, 1979; Kaulen et al, 1970; Freitas Jr. et al, 1981).

Se tanto a classificação como a localização subcelular das aminopeptidases estão mal estabelecidas, o exato papel fisiológico destas

enzimas ainda é mais obscuro. Aceitam-se normalmente as hipóteses que as colocam como indispensáveis para a degradação completa de proteínas pois sem sua participação fica difícil propor um modelo que explique a hidrólise das proteínas até seus aminoácidos, como ocorre na digestão intestinal.

PAPEL FISIOLÓGICO

Ainda que com um papel mal conhecido as aminopeptidases parecem ser fundamentais no metabolismo celular e na renovação das proteínas intracelulares. Neste particular chama atenção especial a ampla distribuição destas enzimas. Assim, elas já foram encontradas em mamíferos e em vários outros vertebrados, microorganismos, insetos e plantas (Freitas Jr., 1981; Lee e Merkel, 1981; Neill e Ball, 1980; Ruffin et al, 1979; Wagner et al, 1979; Garcia e Guimarães, 1979; Ferreira e Terra, 1982; Ashton e Dahmen, 1967; Termignoni et al, 1978; Ninomiga et al, 1981).

A participação de aminopeptidases na regulação e controle da atividade biológica de peptídeos com ação hormonal tem sido frequentemente demonstradas. Já há algum tempo foi observado que a oxitocina $\text{Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH}_2$ é inativada continuamente no plasma de mulheres grávidas por hidrólise seletiva da ligação Cys-Tyr (Tuppy e Nesvabda, 1957). Esta oxitocinase (cistina aminopeptidase), ausente no plasma do homem e da mulher não grávida, foi purificada não só do plasma mas também do útero, rim e placenta da mulher grávida e da macaca prenhe (Sjöholm e Yman, 1966; Koida et al, 1971; Hayashi e Oshima, 1976). A oxitocinase, como a maioria das aminopeptidases não apresenta especificidade absoluta. Ela também age sobre substratos artificiais como cistil-2-binaftilamida e leucil-2-naftilamida e também remove o aminoácido N-terminal da vasopressina e da angiotensina II (Sjöholm e Yman, 1967).

A inativação da angiotensina II após remoção do resíduo de ácido aspártico N-terminal foi demonstrada por Paiva e Paiva (1960) e confirmada por outros (Ono et al, 1968; Kobuku et al, 1969).

Aminopeptidases cerebrais parecem envolvidas nos mecanismos de regulação dos níveis de neuropeptídeos (Marks et al, 1968). Com efeito, demonstrou-se que a célula nervosa contém uma aminopeptidase capaz de remover o aminoácido N-terminal do fator de inibição da liberação do hormônio estimulante de melanócitos (Pro-Leu-GlyNH₂) cuja sequência corresponde ao tripeptídeo C-terminal da sequência da oxitocina e é, provavelmente originado por hidrólise da ligação Cys-Pro do octapeptídeo (Simmons e Brecher, 1973).

Mais recentemente verificou-se que a inibição de Met- e Leu-encefalina se dá por remoção da tirosina N-terminal (Hambrook et al, 1976) por uma aminopeptidase ligada à membrana (Knight e Klee, 1978). Posteriormente Schnebli et al. (1979) purificaram do cérebro de rato uma aminopeptidase com atividade sobre encefalinas e sobre TyrNA que parece, segundo os autores, ser semelhante à uma aminopeptidase anteriormente purificada do plasma humano por Guimarães et al. (1973). Também do plasma humano foi purificada uma aminopeptidase que inativa encefalina por remoção do resíduo N-terminal mas sem atividade sobre TyrNA, isto é, uma aminopeptidase sem atividade arilamidásica (Coletti-Previero et al, 1981). Do cérebro bovino foi obtida uma aminopeptidase que além de inativar encefalinas também age sobre endorfinas (Hersh et al, 1980). A conversão de γ -endorfina em des-Tyr- γ -endorfina envolve a hidrólise do mesmo aminoácido N-terminal (Tyr) e parece ter importância fisiológica, pois a transformação do peptídeo opiáceo em outro não opiáceo aumenta a atividade do peptídeo medida por testes de abolição do aprendizado (De Wied et al, 1978; cf. Rossier e Chaponthier, 1982).

Entre os processos de ativação de hormônios peptídicos por aminopeptidases o sistema de conversão de cininas tem sido muito estudado. Inicialmente foi sugerido que a lisil-bradicinina seria transformada em bradicinina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) pela remoção da lisina N-terminal por aminopeptidases do plasma e da urina humana (Webster e Pierce, 1963) e do plasma canino (Erdős et al, 1963). Prado et al, (1969) foram os primeiros a demonstrar inequivocamente a existência de uma aminopeptidase presente no plasma equino e capaz de converter lisil-bradicinina em bradicinina. A remoção de metionina e lisina sequencialmente da metionil-lisil-bradicinina e da lisina da lisil-bradicinina foi denominada atividade cinino-conversora porque tem como produto a bradicinina que apresenta resíduos de prolina nas posições 2 e 3 do nonapeptídeo (Guimarães et al, 1971). Durante a purificação da aminopeptidase cinino-conversora do plasma humano foi verificado um paralelismo entre as atividades cinino-conversora e arilamidásica (Guimarães, 1972). A semelhança entre as propriedades das aminopeptidases obtidas de fígado (Borges et al, 1974; Freitas Jr. et al, 1979; Starnes et al, 1982), urina (Brandi et al, 1976) e pâncreas (Sidorowicz et al, 1981) com as da alanina aminopeptidase (Behal et al, 1969) sugere a identidade entre estas enzimas; do cérebro de coelho também foi separada uma aminopeptidase cinino-conversora com atividade arilamidásica (Camargo et al, 1972).

Outra enzima, a arginina aminopeptidase foi descrita como cinino-conversora, mas esta evidência ainda é objeto de controvérsia. Embora Hopsu et al. (1966a) tenham concluído que esta enzima converte cininas, tentativas de confirmar estes resultados, mesmo utilizando um método tão sensível como o ensaio biológico em íleo isolado de cobaia, foram infrutíferas (Freitas Jr. et al, 1979; Termignoni, 1980; Tawata et al, 1980).

As aminopeptidases têm sido também relacionadas com um as-

pecto da síntese proteica: a remoção do aminoácido iniciador da cadeia polipeptídica. Durante muito tempo ficou indefinido se o aminoácido iniciador da síntese proteica na célula de mamíferos era a formil-metionina como ocorre nos procariotos (Marcker e Smith, 1969). Em 1970, no entanto, vários autores demonstraram que a quase totalidade da hemoglobina de coelho é iniciada com metionina não formilada (Wilson e Dinitzis, 1970; Jackson e Hunter, 1970; Housman et al, 1970; Yoshida et al, 1970). O modelo que utilizaram para a síntese de hemoglobina em reticulócitos de coelho tem duas características vantajosas que possibilitaram este estudo: a) cerca de 95% do total da proteína sintetizada por reticulócitos é hemoglobina; b) é fácil obter reticulócitos, principalmente se comparado com outros tipos de células que produzam principalmente um só tipo de proteína. Simultaneamente a esta descoberta foi demonstrado que peptídeos nascentes de certo tamanho (contendo mais de 30 resíduos de aminoácidos) têm valina e não metionina na extremidade N-terminal. A única diferença na sequência entre peptídeos nascentes de menor e de maior comprimento é que os de cadeia maior não contêm mais a metionina N-terminal e o aminoácido seguinte (valina) passa a ter esta posição (Yoshida et al, 1970). Considerando o estágio atual do conhecimento em bioquímica, este fenômeno só pôde ser explicado supondo-se que a cadeia nascente tenha servido de substrato para uma aminopeptidase. Esta aminopeptidase, apesar de tratar-se de uma enzima hipotética, recebeu o nome de metionina aminopeptidase pois postulava-se que ela teria especificidade para resíduos de metionina N-terminal. Em 1972 Yoshida e Lin trabalhando com vários extratos brutos de tecidos de coelho mostraram a existência de três enzimas que possivelmente estejam relacionadas com o processo de síntese proteica, a saber: a) uma enzima que hidroliza metionina N-terminal de tri- e tetrapeptídeos; b) uma segunda enzima que remove formil-metionina de formil-peptí-

deos e c) uma terceira enzima que deforma formil-aminoácidos. Todas estas atividades enzimáticas foram demonstradas em placas de eletroforese em gel de amido e nenhuma tentativa de caracterização destas enzimas foi descrita pelos autores. Neste trabalho foi ainda mostrado que incubando-se peptídeos nascentes com lisado de reticulócitos de coelho a metionina N-terminal destes peptídeos é removida. Este resultado está de acordo com o fato de que o resíduo N-terminal das cadeias α e β de hemoglobina de coelho é valina e não mais metionina. O resultado concorda também com as evidências que suportam a hipótese de que o resíduo de metionina iniciador é removido durante as etapas de elongação entre 16 e 30 resíduos (Yoshida et al, 1970).

No tecido de cicatrização foi encontrada uma aminopeptidase com ação preferencial sobre MetNA e ValNA. Esta atividade enzimática está presente neste tecido em quantidades muito maiores do que na pele normal (Mäkinen e Raekallio, 1968). Infelizmente com os dados disponíveis não foi possível concluir pela identidade entre esta enzima e a MAP do fígado de rato (ver adiante).

Na fração ribossomal do cérebro bovino a atividade sobre MetNA é maior do que aquela sobre outros AANA (Kerwar et al, 1971). Nem a atividade MetNAásica cerebral nem a do tecido de cicatrização foram melhor caracterizadas.

Espermatozôide bovino possui uma arilamidase com preferência para a hidrólise de MetNA (Meizel e Cotham, 1972). O grupo -SH é importante para a atividade catalítica pois o tratamento com ditioneitol provoca um aumento de 230 vezes na atividade. Da fração solúvel do músculo de rato, Parsons et al. (1979) obtiveram quatro arilamidases distintas. Uma delas hidroliza MetNA com maior velocidade que outros AANA. Esta enzima é inibida por p-hidroximercurifenilsulfonato e ativada por EDTA.

Em estudos recentes mostrou-se que o fígado de rato contém uma aminopeptidase com preferência para a hidrólise de resíduos de metionina. Tal enzima pôde ser removida do fígado de rato exanguinado por perfusão com Triton X-100 (Termignoni, 1980). Estudos posteriores sugeriram a distribuição da enzima entre as frações subcelulares particuladas indicando que esta aminopeptidase está ligada à membrana (Freitas Jr. et al, 1981). A demonstração concomitante de que a enzima hidroliza não só MetNA mas também peptídeos como a MLBK a caracteriza como uma verdadeira aminopeptidase. Devido a preferência para a hidrólise de ligações envolvendo resíduos de metionina ela foi provisoriamente denominada de metionina aminopeptidase (MAP). Aparentemente, trata-se de uma nova enzima pois tem algumas propriedades que permitem diferenciá-la com clareza de algumas aminopeptidases mais estudadas. Assim, entre as aminopeptidases que agem sobre ligações envolvendo resíduos de aminoácidos neutros e com o grupo α amino livre, ela não pode ser confundida com a aminopeptidase M (EC 3.4.11.2). Esta aminopeptidase microsomal, ao contrário da MAP, não tem grupo -SH importante para a atividade enzimática (Wachsmut et al, 1966) e é inibida por EDTA (Wacker, 1974; Maroux et al, 1973; Lehky et al, 1973). A insensibilidade da MAP ao EDTA permite também distinguí-la da leucina aminopeptidase (atualmente aminopeptidase do citosol; EC 3.4.11.1). Embora algumas características comuns como a preferência para a hidrólise de AANA e a dependência de grupo -SH livre, os resultados até agora obtidos não permitem afirmar que a MAP e as enzimas de tecido de cicatrização, cérebro, músculo e espermatozóides sejam idênticas.

Assim a MAP foi a única enzima com atividade preferencial sobre resíduos de metionina caracterizada como verdadeira aminopeptidase.

Com relação ao papel dessas enzimas na remoção do aminoácido N-terminal em peptídeos nascentes, nenhuma caracterização adicional so

bre aminopeptidases com esta ação foi relatada pelos autores previamente citados. Desde que se aceite que a síntese de hemoglobina e de protamina (Winge e Dixon, 1970) sejam bons modelos da síntese proteica em eucariotos deve-se acatar então, a existência de uma aminopeptidase com especificidade para resíduos de metionina. É condição adicional que esta enzima tenha ampla distribuição entre as espécies. Como nenhuma das aminopeptidases já purificadas foi testada sobre peptídeos nascentes não se pode desconsiderar a hipótese de que alguma ou algumas delas tenham esta atividade.

O B J E T I V O S

A curiosidade de saber se a metionina aminopeptidase do fígado de rato poderia estar envolvida em processos de síntese proteica estimulou a continuação de seu estudo.

Neste trabalho objetivamos especificamente:

1. Distinguir diferentes atividades MetNAásicas presentes no tecido hepático do rato;
2. Identificar inequivocamente a atividade da MAP em frações subcelulares;
3. Estudar propriedades comparativas da MAP das diversas organelas;
4. Testar a hipótese de envolvimento da MAP na biossíntese de proteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

REAGENTES

Sephadex G-25 super fina foi obtido de Pharmacia Fine Chemical AB, Suécia; DEAE-celulose (Cellex D) e Bio-Gel A_{0.5 m} foram obtidos de Bio-Rad Laboratories, USA; L-LeuNa, L-ArgNA, L-LysNA, DL-MetNA, DL-AlaNA, LeuNH₂, L-Met-L-Ala-L-Ser, glicose-6-fosfato, pOHMB, Triton X-100, dodecil sulfato de sódio, azul brilhante de coomassie G-250, albumina sérica bovina e Fast Garnet foram obtidos da Sigma Chem. Co.; aminoácidos livres foram obtidos de Ajinomoto, São Paulo; 2-naftilamina foi fornecida por Carlo Erba, Milão; MLBK e BK foram fornecidas por Protein Research Foundation, Tóquio; conjunto de reativos para dosagem da glutamato desidrogenase e p-nitrofenilfosfato foram fornecidos por Boehringer-Manhein, São Paulo; ¹⁴C-metionina (¹⁴CH₃S(CH₂)₂CH(NH₂)COOH) foi fornecida por New England Radiochemicals, USA; deoxicolato de sódio foi obtido de Oxford Laboratories, Inglaterra; fosfato de sódio, cloreto de sódio, EDTA, ninhidrina, sacarose, Brij 35 e todos os demais reagentes foram fornecidos por Merck-Quimitra, Rio de Janeiro. Bestatina de Peninsula Laboratories, USA.

Aminoacil-p-nitroanilidas, MetNH₂ e AlaNH₂ foram sintetizados e gentilmente cedidos pelo Prof. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da Escola Paulista de Medicina.

EQUIPAMENTOS

Centrífuga refrigerada RC-5B, rotores SS-34 e HS-4 Ivan Sorval Inc., USA; espectrofotômetro modelo 25 munido de registrador e termostato para controle da temperatura da cubeta, ultracentrífuga L3-50, rotor 42.1, Beckman Instruments, USA; coletor de frações Ultra Rac 7000, LKB Products AB, Suécia; homogeneizador Ultra-Turrax, Janke & Kunkel Ika-Werk, Alemanha; agitador magnético Corning Glass Company, USA; pHmetro Metron modelo F 520, Suíça; condutímetro modelo CDM 2e, Radiometer, Dinamarca; banhos termostáticos Fanen, São Paulo; quimógrafo registrador Palmer, Inglaterra; balanças Mettler, Suíça; calculadora Ti 59 Texas Instruments, São Paulo; pipetas automáticas Finnpiette Kemitien, Finlândia, contador de cintilação líquida, modelo LS-100, Beckman Instruments, USA; pipetas, seringas e vidraria volumétrica são de boa procedência e qualidade.

ANIMAIS

Ratos machos adultos da raça Wistar; cobaias fêmeas jovens e coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia Branco foram fornecidos pelo Biotério Central da Escola Paulista de Medicina.

FRACIONAMENTO SUBCELULAR

Condições de centrifugação - O método original de DeDuve e

Berthet (DeDuve e Berthet, 1953; De Duve et al, 1955; Leighton et al, 1968) foi utilizado durante todo o fracionamento. Os valores das constantes de sedimentação das partículas subcelulares considerados para calcular as condições de centrifugação foram os seguintes: núcleo (N) 210.000 S; mitocôndria pesada (M) 17.300 S; mitocôndria leve (L) 2.300 S e microsoma (P) 190 S. Para a lavagem da fração nuclear o valor tomado foi de 310.000 S. Devido à proximidade entre os valores das constantes de sedimentação da mitocôndria leve e do lisosoma optou-se por obter estas duas organelas em uma mesma fração subcelular.

Este método utiliza condições de centrifugação que são calculadas em função das seguintes variáveis: a) coeficiente de sedimentação da partícula em função da densidade do meio; b) geometria do rotor; c) tempo de aceleração e de desaceleração do rotor. Deste modo foi levado em conta a aceleração angular (ω^2) durante todo o tempo de rotação do rotor. A equação 1 mostra o cálculo das condições de centrifugação (isto é, a integral da aceleração angular durante todo o tempo no qual as partículas ficaram sob ação da força centrífuga) para uma dada partícula em dado rotor.

$$\text{eq. 1: } W = \frac{2,3}{S} \cdot \log \frac{x_f}{x_o}$$

W : condição de centrifugação

xo: raio menor do rotor (cm)

xf: raio maior do rotor (cm)

S: coeficiente de sedimentação da partícula (grandeza: seg^{-13})

O tempo de corrida, ou seja, o tempo que medeia entre ligar a centrífuga (t_o) e desligá-la é calculado segundo a equação 2.

$$\text{eq. 2: } t_c = \frac{\omega^2 \cdot t_a + W - (W_a + W_d)}{\omega^2}$$

t_c : tempo de corrida

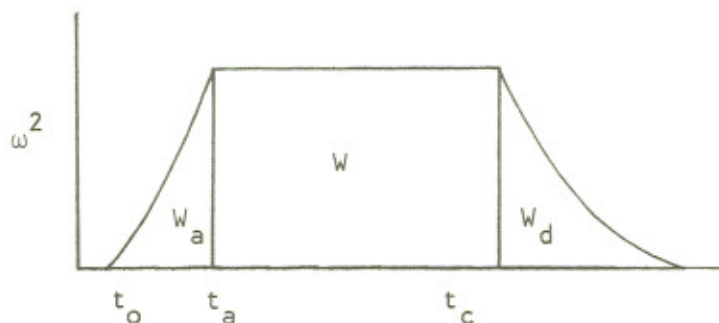
t_a : tempo de aceleração

ω^2 : aceleração angular

W_a : integral da aceleração angular durante o tempo de aceleração do rotor

W_d : integral da aceleração angular durante o tempo de desaceleração do rotor.

Para calcular os valores de W_a e de W_d de um dado rotor e em dada centrífuga é útil construir um gráfico como o abaixo que mostra as relações entre ω^2 e tempo, isto é, mostra o cálculo de W_a e W_d .



Para calcular o valor exato de ω^2 em cada tempo e poder construir o gráfico, o sistema centrífuga-rotor deve ser calibrado, isto é, verifica-se, com o auxílio de um cronômetro, os tempos que um determinado rotor em determinada centrífuga gasta para atingir vários valores de rotações por minuto. A relação entre rpm e ω^2 é mostrada na eq. 3.

$$\text{eq. 3: } \omega^2 = \frac{2 \pi}{60} \cdot \text{rpm}$$

Sabendo-se o valor de W necessário para sedimentar a partícula selecionada escolhe-se uma rpm conveniente e calcula-se a correspondente aceleração angular (ω^2). Com este valor e com o auxílio do gráfico acima obtem-se os valores de t_a , W_a e W_d . Com estes valores calcula-se então o tempo de corrida (eq. 2), isto é, o tempo entre ligar e desligar a centrífuga. Em todas as centrifugações realizadas os valores de rpm escolhidos determinaram valores de W_a e W_d que somados nunca ultrapassaram 20% do valor de W.

Como diferentes centrifugações com rotores distintos têm tempos de aceleração e desaceleração diferentes não é possível comparar resultados expressos apenas em aceleração gravitacional por minuto (g por min). A equação 4 mostra a relação entre a geometria do rotor, W e g.min.

$$\text{eq. 4: } g.\text{min} = W \cdot \frac{R_f - R_o}{2} \cdot \frac{1}{981 \cdot 60}$$

R_f : raio maior do rotor

R_o : raio menor do rotor

Para a apresentação dos resultados de distribuição subcelular das enzimas assim fracionadas foi utilizado o sistema preconizado por De Duve e Berthet (1953) que consiste na representação da atividade enzimática em histogramas relacionando atividade específica relativa e a percentagem de proteína em cada fração. A atividade específica relativa é a razão entre o rendimento da atividade enzimática e da proteína em cada fração. Este tipo de representação apresenta a vantagem de permitir que se compare

diretamente a distribuição subcelular de uma ou mais enzimas entre si. Utilizando os valores de atividade específica esta comparação fica dificultada pois normalmente a variação entre as quantidades de cada uma das enzimas que estão presentes nas frações subcelulares é muito grande. Por exemplo, as atividades específicas da glutamato desidrogenase e fosfatase ácida inibível por tartarato na mitocôndria leve são, respectivamente, 0,5 e 0,02 U por mg de proteína. Estes valores induzem à sugestão errônea de que para caracterizar esta fração a glutamato desidrogenase é mais importante que a fosfatase. Com o sistema de representação escolhido é fácil perceber (ver fig. 4) que, embora em menor quantidade a fosfatase ácida inibível por tartarato tem maior importância para caracterizar a fração mitocôndria leve do que a glutamato desidrogenase. Ademais pode-se depreender deste fato que a fração solúvel, devido à sua riqueza (cerca de 50%) em proteínas totais apresentará sempre valores de atividade específica relativa no máximo de dois (para uma enzima que esteja 100% distribuída nesta fração).

A pureza das frações subcelulares obtidas foi controlada através das seguintes enzimas marcadoras: glutamato desidrogenase (fração mitocôndria leve) e glicose-6-fosfatase (fração microsoma). A integridade das organelas, por sua vez, foi verificada por microscopia eletrônica.

Preparação das frações subcelulares - Foram utilizados ratos Wistar adultos. Após anestesia com éter o fígado era rapidamente retirado, mergulhado em tampão fosfato de sódio 10 mM - sacarose 0,25M, pH 7,0 gelado, picado em pequenos pedaços e homogeneizados no mesmo tampão (3 ml/g de tecido) em homogeneizador Ultra-Turrax (2 ciclos de 30 segundos em banho de gelo). Este material após diluição com o mesmo tampão até uma relação de 8 ml por grama de tecido era filtrado em 4 camadas de gaze. O filtrado constituía o homogenato. A Fig. 1 mostra o esquema de fracionamento utili-

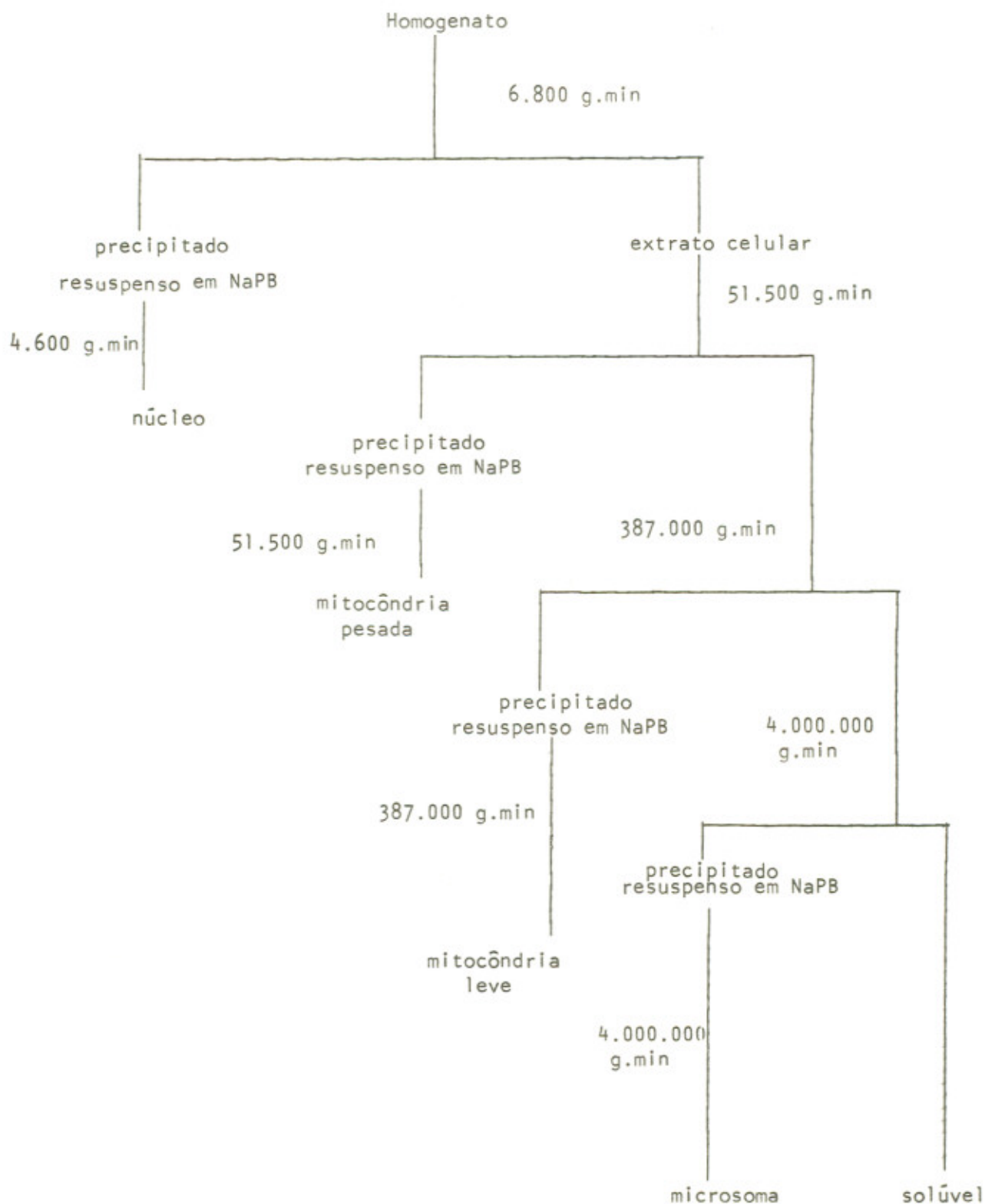


Figura 1. Esquema do fracionamento subcelular do homogenato do fígado de rato por centrifugação diferencial. As etapas que forneceram a fração nuclear foram realizadas em rotor basculante e as demais em rotores angulares.

zado. Cada um dos precipitados era lavado uma vez em tampão e os sobrenadantes combinados antes da centrifugação seguinte. As frações precipitadas eram suspensas em um volume de tampão suficiente para produzir uma suspensão equivalente a 2,0 ml por grama de tecido original. Todas as operações foram realizadas a 4°C.

PREPARO DE PEPTÍDEOS NASCENTES

Peptídeos nascentes de hemoglobina de coelho foram preparados segundo a técnica descrita por Yoshida et al. (1970) que emprega meio deficiente em triptofano com a finalidade de provocar a interrupção do alongamento da cadeia ao nível dos resíduos 15 (cadeia α) e 16 (cadeia β), aumentando assim o rendimento de peptídeos curtos. Reticulócitos foram obtidos de coelho tratado durante uma semana com a administração diária de 1,0 ml de solução de fenilhidrazina a 2,5% para produzir anemia microcítica. Antes da sangria foi feita contagem de reticulócitos (coloração do esfregaço feita pelo método do azul de metileno (Bauer, 1980), para certificar-se de que sua proporção era alta (94%), em relação ao total de glóbulos vermelhos. O sangue (80 ml) foi colhido em 25 ml de solução isotônica (NaCl 0,14M; KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM) heparinizada e gelada. Os reticulócitos foram obtidos por centrifugação (6.000 g.min) e lavados duas vezes com a mesma solução.

Reticulócitos lavados foram em seguida incubados com 100 ml de meio de incubação a 37°C por 12 min. O meio continha NaCl 0,14 M, KCl 5 mM, MgCl₂ 1,5 mM, glicose 1 mM, NaHCO₃ 1,5 mM, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 0,3 mM (este sal foi adicionado imediatamente antes da incubação) e os seguintes aminoácidos: glutamina 3,5 mg, histidina 4 mg, lisina 3 mg, fenilalanina 3 mg, serina 3 mg, tirosina 1,5 mg, alanina 1 mg, arginina 1,7 mg, asparagina

1,5 mg, prolina 1 mg, treonina 1 mg, cistina 2 mg, leucina 2 mg, valina 1,5 mg, glicina 1 mg e ^{14}C -metionina 0,28 mg (0,1 mCi). A reação foi interrompida pela adição de 200 ml da solução isotônica gelada e a mistura centrifugada (300.000 g.min). O sedimento de reticulócitos foi lavado duas vezes com a mesma solução gelada e hemolizado com meio hipertônico contendo 20 ml de MgCl_2 1 mM e 1200 unidades de heparina. Em seguida 17 ml de tampão salino: Tris-HCl 10 mM, KCl 10 mM e MgCl_2 1,5 mM foram adicionados. Após centrifugação do hemolisado (300.000 g.min) os ribosomas foram precipitados do sobrenadante por adição de ácido acético até pH 5,1, centrifugados (300.000 g.min) e recentrifugados após lavagem em salina pH 5,0. O precipitado de ribosomas foi suspenso em 15 ml de água destilada, o meio ajustado a pH 10,5 com NaOH 1 M e incubado a 30°C por 3 horas para dissociação de peptídeos associados aos ribosomas. O pH da suspensão foi ajustado em pH 3,0 com ácido fórmico, a mistura centrifugada (300.000 g.min) e o sobrenadante liofilizado. O material liofilizado foi dissolvido em 5,0 ml de ácido fórmico 0,5% e aplicado em coluna de Sephadex G-25 (1,65 x 100 cm) equilibrada e percolada com ácido fórmico 0,5%. Esta coluna foi previamente calibrada com glucagon, bradicinina e metionina. As frações correspondentes a pesos moleculares inferiores ao do glucagon e superiores ao da metionina foram combinadas, divididas em 3 porções de igual volume, centrifugadas para remoção de qualquer resíduo de resina e liofilizadas.

PREPARAÇÃO DA METIONINA AMINOPEPTIDASE DO HOMOGENATO

Metionina aminopeptidase foi parcialmente purificada do fígado de rato segundo a técnica descrita anteriormente (Freitas Jr. et al., 1981). Fígado de rato (20 g) foi homogeneizado em Ultra-Turrax (2 x 30 segundos) com 80 ml de tampão fosfato de sódio 10 mM - sacarose 0,25 M,

pH 6,0 contendo Triton X-100 0,05% (v/v). Após filtração em 4 camadas de gaze o material foi centrifugado (180.000 g.min). O precipitado foi suspenso no mesmo tampão, recentrifugado e os sobrenadantes combinados. A mistura dos sobrenadantes (114 ml) foram adicionados, lentamente e sob agitação, 29,29 g de sulfato de amônio (0,35 de saturação). Após agitação por mais 30 minutos o material foi centrifugado (280.000 g.min) e ao sobrenadante adicionados 23 g de sulfato de amônio (0,60 de saturação) com os mesmos cuidados que anteriormente. O precipitado obtido na nova centrifugação foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0 e dializado 3 vezes contra 20 volumes deste mesmo tampão. O material foi então aplicado em coluna de DEAE-celulose Cellex D (3,5 x 10,0 cm) equilibrada no mesmo tampão. A coluna foi eluída com este tampão e em seguida com um gradiente de fosfato de sódio variando entre 20 e 200 mM (contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0). A coluna foi desenvolvida com fluxo de $10 \text{ ml.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Frações de 15 ml foram coletadas.

O material proteico não retido no adsorvente e correspondendo às frações com atividade sobre MetNA foi concentrado por diálise sob pressão, e o concentrado cromatografado em coluna (2,0 x 90,0 cm) de Bio-Gel A_{0,5} m equilibrada e percolada com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0 com fluxo de $3 \text{ ml.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Foram coletadas frações de 4 ml. As frações com atividade arilamidásica combinadas formaram a preparação de metionina aminopeptidase-homogenato.

DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Em todos os experimentos a unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolizar 1 μmol de substrato por minuto (37°C) nas condições de pH descritas para cada uma

das enzimas.

Para o ensaio das enzimas presentes nas frações subcelulares estas foram diluídas com tampão fosfato de sódio 10 mM - sacarose 0,25 M - Triton X-100 0,2%.

Glutamato desidrogenase - Para a determinação da atividade desta enzima foi utilizado o método descrito por Bergmeyer (1975). A reação é a seguinte:



Alíquotas de 25 μl das amostras convenientemente diluídas eram incubadas em tampão acetato de amônio 0,1 M - EDTA 2 mM, pH 8,0 com α -cetogluturato de sódio 6,1 mM, NADH 0,16 mM e ADP 0,82 mM (volume final de 1,0 ml). A oxidação do NADH foi acompanhada diretamente em espectrofotômetro munido de registrador. A absorvidade molar do NADH (340 nm) é $6.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e a do NAD^+ praticamente zero.

Glicose-6-fosfatase - A hidrólise de glicose-6-fosfato foi medida através do aumento da concentração de fosfato inorgânico no incubado. A determinação do fosfato inorgânico foi feita pelo método descrito por Goldenberg e Fernandez (1966). Alíquotas da amostra (25 μl) eram incubadas em tampão maleato de sódio 0,1 M, pH 6,5 com glicose-6-fosfato 0,1 M (volume final de 0,5 ml). Após 20 minutos a reação era interrompida pela adição de 5,0 ml de ácido tricloroacético 10% contendo 1% de tiouréia e 2,5% de sulfato ferroso amoniacal. O precipitado formado era removido por centrifugação e ao sobrenadante adicionava-se 0,5 ml de solução de molibdato de amônio 4,4% em ácido sulfúrico 3,2 N. Em 20 minutos a coloração desenvolvida estabilizava-se e permanecia assim por duas horas. A absorbân

cia (660 nm) era comparada com uma curva padrão de fosfato de sódio (0,1 a 2,0 μmol) feita simultaneamente. Foram realizados controles para descontar a presença de fosfato inorgânico das soluções de substrato e também das amostras. As soluções de substrato eram preparadas imediatamente antes do uso a partir da substância seca.

Fosfatase ácida inibível por tartarato - A atividade da enzima foi determinada utilizando como substrato p-nitrofenilfosfato (Araújo et al, 1976) que após a hidrólise produz fosfato inorgânico e p-nitrofenol. Alíquotas de diluições convenientes das amostras eram incubadas em tampão acetato de potássio 25 mM - EDTA 0,5 mM, pH 5,0 e contendo ou não tartarato de sódio 0,1 mM na presença de substrato 5,0 mM (volume final 2,0 ml). A reação era interrompida pela adição de 1,0 ml de NaOH 1,0 M. A absorbância das soluções era lida em 405 nm e a quantidade de p-nitrofenol presente determinada com base no valor de sua absorvidade molar ($\epsilon_{405} = 17.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A atividade da fosfatase ácida inibível por tartarato foi calculada pela diferença entre as quantidades de produto obtidas em incubações realizadas na ausência e na presença de tartarato de sódio.

Atividade sobre amidas de aminoácidos - A hidrólise de amidas de aminoácidos foi medida através da determinação da quantidade de amônia liberada na reação. Esta dosagem foi feita segundo o método descrito por Chaney e Marbach (1962). Alíquotas de 25 μl de diluições convenientes das amostras eram incubadas com AANH₂ (280 μM) em PBS 7,0 contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM (volume final de 1,0 ml). A reação era interrompida pela adição de 1,0 ml de solução de nitroprussiato de sódio (60 mg/l) em fenol (13 g/l). A esta mistura era adicionado 1,0 ml de solução de hipoclorito de sódio (solução comercial usada como alvejante doméstico a 5% e recen

temente aberta) em NaOH 2,5%. Após o desenvolvimento da reação (10 min, 55°C) as absorvâncias das soluções eram determinadas (625 nm) e comparadas com uma curva padrão de sulfato de amônio (5 a 80 nmoles) preparada simultaneamente.

Atividade sobre aminoacil-p-nitroanilidas - Alíquotas de diluições apropriadas das amostras eram incubadas com aminoacil-p-nitroanilidas (280 μ M) em PBS contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM (volume final de 1,0 ml). O aparecimento de p-nitroanilina era acompanhado em espectrofotômetro munido de registrador ($\epsilon_{410} = 8.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Erlanger et al, 1961).

Atividade sobre aminoacil-2-naftilamidas - O método utilizado foi o descrito por Barrett (1972) que permite a diazotação da 2-naftilamina liberada pela hidrólise mesmo em soluções que contenham 2-mercaptoetanol. Alíquotas de 100 μ l de diluições apropriadas das amostras eram incubadas em PBS contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e AANA (280 μ M, a menos que especificamente indicado como nos experimentos de determinação das constantes cinéticas); volume final de 1,5 ml. Ao final da incubação era adicionado 1,1 ml de uma mistura (1:1) de solução recente de reagente Fast Garnet (0,5 mg/ml contendo Brij-35, 4%, v/v) com solução de pOHMB 10 mM em EDTA 50 mM, pH 6,0. Após 20 minutos de repouso à temperatura ambiente as absorvâncias das soluções eram medidas (525 nm) e comparadas com uma curva padrão de 2-naftilamina (5 a 90 nmol).

Quando necessária a determinação da concentração das soluções estoque de AANA era feita através da hidrólise total de uma alíquota destas soluções em HCl 5 N (110°C, à vácuo, 18 h). Após remoção do HCl, à vácuo, o material era dissolvido em água ou tampão e a 2-naftilamina liberada dosada pelo método descrito acima.

Atividade cinino-conversora - Esta atividade foi acompanhada através de ensaio biológico que utiliza as diferenças de sensibilidade da resposta do músculo liso (fíleo de cobaia) para a contração induzida por MLBK, LBK e BK (Schröder, 1970). A preparação biológica foi montada e desenvolvida segundo a técnica descrita por Webster e Prado (1970). Amostras eram incubadas com MLBK (280 μ M) em PBS 7,0 contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM. A intervalos de tempo variáveis uma alíquota do incubado era diluída 20 vezes com HCl 1,0 mM e volumes adequados à sensibilidade da preparação eram adicionados ao meio de incubação do músculo. A conversão de MLBK em seus análogos mais potentes era verificada pelo aumento da resposta do músculo ao estímulo determinado por doses equivalentes de incubado quando comparado com o tempo zero de incubação.

Uma vez verificada a conversão, alíquotas do incubado (200 μ l) eram retiradas, diluídas com 300 μ l de tampão citrato de sódio 0,1 M contendo polietileno-glicol-400 15%, pH 2,2 e congeladas. Posteriormente, os conteúdos de metionina e lisina livres nestas amostras eram determinados em analisador de aminoácidos processado de acordo com a técnica desenvolvida por Spackman et al. (1958).

Para verificar a ausência de atividade cininásica e portanto assegurar-se da validade dos resultados obtidos no ensaio biológico foi feita a incubação das amostras com BK (280 μ M; PBS 7,0 contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, 180 min). Neste caso foi também usado o ensaio biológico do peptídeo.

Atividade sobre Met-Ala-Ser - Amostras foram incubadas com este tripeptídeo (280 μ M) durante 12 h em PBS 7,0 contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM. A totalidade de cada um dos incubados foi aplicada em papel Whatman nº 1 (20 x 57 cm). A amostra e seus controles foram cromatografada—

dos juntamente com padrões do peptídeo, de metionina, de alanina e de serina. A cromatografia foi desenvolvida com butanol:ácido acético:água (4:1:1) num sistema descendente e revelada por aspersão de solução de ninhidrina (0,02%) em acetona.

Atividade sobre peptídeos nascentes - Um terço da preparação de peptídeos nascentes liofilizada foi dissolvida em 200 µl de tampão fosfato de sódio 10 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0 (controle) e outro terço foi dissolvido no mesmo tampão contendo 0,4 mg de proteína da preparação de metionina aminopeptidase-homogenato. Após 12 h a 37°C, toda a mistura foi aplicada em papel Whatman nº 1. A cromatografia foi desenvolvida como descrito no parágrafo anterior e cortada longitudinalmente em faixas correspondendo ao incubado e aos controles. A faixa correspondente ao padrão de metionina foi revelada com solução de ninhidrina 0,02% em acetona. As demais faixas foram mantidas em contato com filme de raios-X e posteriormente, as regiões correspondentes à migração da metionina e aos pontos de aplicações foram cortadas e colocadas em recipientes apropriados com 10,0 ml de solução de 2,5 difeniloxazol 0,5% em tolueno e a radioatividade medida em cintilador.

DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

Foi utilizada a propriedade que as proteínas apresentam em ligarem-se ao azul brilhante de coomassie G-250 (Spector, 1978). A 100 µl de diluições apropriadas das amostras eram adicionados 2,9 ml de solução do reagente (a 100 mg do corante solubilizado em 50 ml de etanol 96% adicionava-se 100 ml de ácido fosfórico 85% e, após agitação vigorosa, água destilada até 1000 ml. A solução era então filtrada em papel de filtro). A

medida de absorvância era feita em 595 nm e comparada com uma curva padrão de albumina sérica bovina (linearidade da curva entre 5 e 20 µg de proteína). Como o reagente é pouco estável a curva era repetida diariamente.

MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE

A força iônica das soluções de amostras a serem processadas em cromatografia de troca iônica, frações coletadas e tampões preparados foram estimadas por condutimetria. Os valores em mS são proporcionais à concentração de sal das soluções.

CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS DILUÍDAS

As preparações foram concentradas, a 4°C, em um sistema de diálise Visking 8/12 (Guimarães, 1972). O tubo era firmemente preso por uma arruela de borracha a um dos dois gargalos de um balão de vidro. O tubo de diálise era então introduzido dentro de uma coluna de vidro longa e mantida sob atmosfera úmida. No balão era colocada a amostra e nitrogênio até pressão de 1,0 kg/cm².

Os tubos de diálise utilizados para este fim eram previamente preparados por aquecimento a 55°C em água por 24 h. A seguir eram armazenados em solução de bicarbonato de sódio 0,025M - EDTA 0,01M - borato de sódio 0,01M - azida sódica 0,02%, pH 9,0.

TRATAMENTO DA RESINA E PREPARO DAS COLUNAS DE DEAE-CELULOSE

A resina de DEAE-celulose (Cellex D) previamente utilizada era recuperada por tratamento com NaOH 0,5M na proporção aproximada de

1:70 (p/v). Após agitação suave por 30 minutos a resina era filtrada em funil de placa de vidro porosa com porosidade "grossa", percolada com NaOH 0,5 N até a completa remoção de toda proteína ainda presente e lavada com água destilada até a neutralidade do filtrado. A massa de resina era transferida para um becker e tratada com HCl 0,5 N (1:70 p/v) por 30 minutos, filtrada e lavada novamente com água destilada até a neutralidade do filtrado. Após novo ciclo com NaOH 0,5 N e lavagem com água destilada até a neutralidade do filtrado a resina era suspensa em água destilada. O pH da suspensão, na presença de KCl, era normalmente de 11,2 - 11,5, mostrando tratamento adequado da resina. A seguir a resina era lavada em funil de placa porosa com tampão (fosfato de sódio 10 ou 20 mM pH 7,0) para a remoção do excesso de sal e equilíbrio da resina até que o filtrado apresentasse os mesmos valores de pH e condutividade que o tampão adicionado. Nas etapas de repouso do gel procedia-se normalmente à remoção de partículas finas por decantação.

A resina assim tratada era sedimentada em colunas de vidro (3,4 x 15 cm) ou de plástico (1,4 x 8,0 cm) sob pressão de nitrogênio variando de 0 a 0,35 kg/cm².

PREPARO DAS COLUNAS DE FILTRAÇÃO EM GEL

Bio-Gel A_{0,5m} com poder de resolução nominal variando entre 30.000 e 500.000 daltons, fornecido pelo fabricante como suspensão em água destilada contendo azida de sódio foi sedimentada em coluna (2,0 x 100,0 cm) Bio-Rad, montada com o respectivo funil de enchimento, sob pressão constante de 20 cm de água. Terminada a sedimentação o funil foi retirado e a coluna percolada com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0 até o completo equilíbrio.

Sephadex G-25 super fina foi sedimentada em coluna de vidro (1,65 x 100,0 cm e 1,6 x 40,0 cm) sob pressão constante de 90 cm de água. Terminada a sedimentação as colunas foram percoladas com solução conveniente até o completo equilíbrio.

RESULTADOS

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES

Usando as condições descritas no presente trabalho (ver métodos) foi possível demonstrar que o homogenato total de fígado de rato efetivamente contém várias arilamidases; este resultado confirma observações anteriores de Freitas Jr. (1981). Chama particular atenção o fato de que pelo menos duas enzimas com atividade MetNAásica estão presentes (Fig. 2). Verificou-se ainda (não mostrado) que estas enzimas são fracionadas distintamente de outra com atividade sobre ArgNA sendo uma delas também distinta da atividade sobre LeuNA.

Quando o grupo tioeter da metionina-2-naftilamida é oxidado à sulfóxido, a metionina aminopeptidase não hidroliza este substrato (Freitas Jr., 1981). Entretanto, foi verificado que o borbulhamento de uma solução de MetNA com oxigênio durante 3 horas não afeta sua hidrólise pelas enzimas presentes no homogenato de fígado de rato. Ficou, assim, afastada a possibilidade de uma possível oxidação da MetNA durante o trabalho porque o manuseio dos reagentes foi muito mais brando do que o borbulhamento com oxigênio.

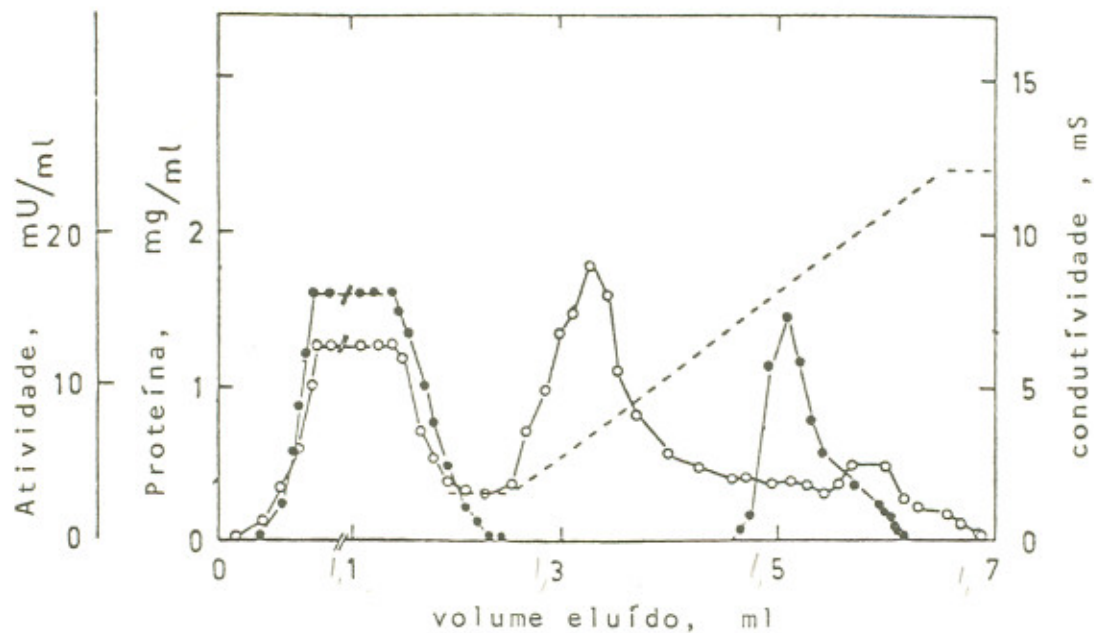


Figura 2. Cromatografia em DEAE-celulose da fração do homogenato de fígado de rato precipitada por sulfato de amônio (0,35 - 0,60 de saturação). A coluna (3,5 x 10,0 cm) de DEAE-celulose Cellex D, foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 20mM - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0. Após a introdução da amostra a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio e em seguida com um gradiente de fosfato de sódio (20 mM - 200 mM) contendo 2-mercaptoetanol, 1,0 mM, pH 7,0. Fluxo de $10,0 \text{ ml.cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; frações de 15,0 ml. MetNA (●); proteína (○); condutividade (--).

CARACTERÍSTICAS DA PREPARAÇÃO DA METIONINA AMINOPEPTIDASE DO HOMOGENATO

A MAP obtida do homogenato de fígado de rato e parcialmente purificada (ver métodos) apresentou uma atividade específica de 29 nmoles de MetNA hidrolizados por minuto, por mg de proteína. Tomando-se este valor como unitário as razões de hidrólise das outras AANA são as seguintes: LeuNA 0,7; AlaNA 0,15; LysNA 0,06 e ArgNA 0,01. Estes resultados demonstram que esta preparação comportou-se como a metionina aminopeptidase descrita anteriormente (Freitas Jr. et al, 1981). Estudos adicionais que serão apresentados adiante corroboram tal afirmação.

A atividade adsorvida no DEAE-celulose, e que foi assim separada da MAP, apresenta as seguintes razões de hidrólise de AANA: MetNA 1,0; LeuNA 0,8; AlaNA 1,1; LysNA 0,9 e ArgNA 1,1. Como se vê, completamente diferentes das razões de hidrólise obtidas com a preparação da MAP.

PREPARAÇÃO DE PEPTÍDEOS NASCENTES

A figura 3 mostra o perfil de eluição dos peptídeos dissociados de ribossomas de reticulócitos de coelho. O primeiro pico corresponde às cadeias em fase terminal de síntese. A incorporação de radioatividade nestas frações é devida ao resíduo de metionina na posição 35 da cadeia α da hemoglobina. A incorporação de radioatividade nos peptídeos nascentes (eluídos entre 135 e 175 ml) é menor do que a mostrada por Yoshida et al (1970) porque eles usaram um meio contendo não só metionina marcada mas também glicina, leucina e valina perfazendo um total de 0,7 mCi disponível para a incorporação. Considerando-se que nos primeiros 15 resíduos de aminoácidos da cadeia α (Met-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Arg-Val-Lys—Ala-Ala-Trp) existem dois resíduos de valina e um de leucina e na cadeia β

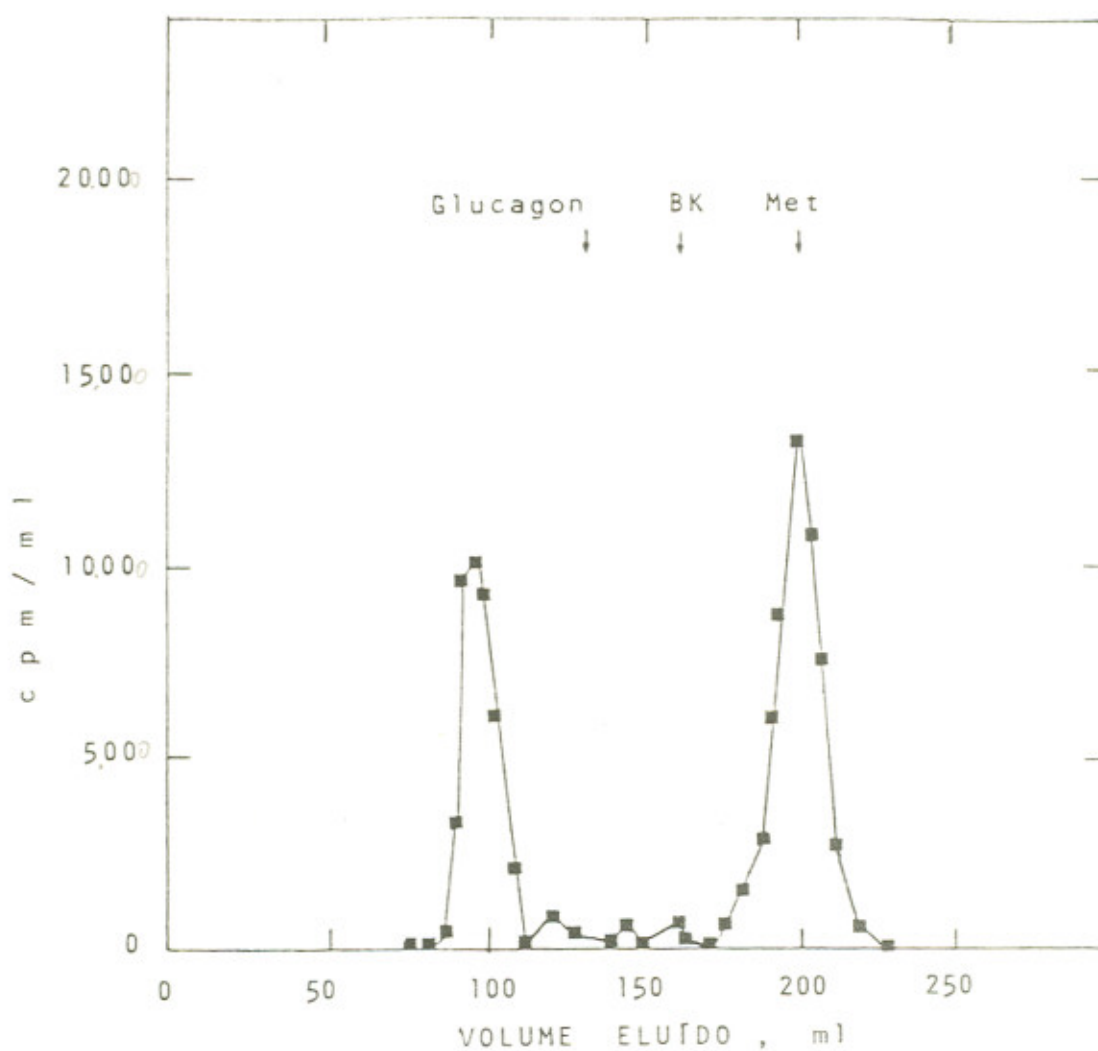


Figura 3. Cromatografia de peptídeos dissociados de ribosoma de reticulócitos de coelho. Peptídeos nascentes obtidos de reticulócitos de coelho (5,0 ml) foram aplicados em coluna (1,65 x 100,0 cm) de Sephadex G-25 superfino. A coluna foi desenvolvida com ácido fórmico ($7,0 \text{ ml} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) e coletadas frações de 2,5 ml. Alíquotas de 500 μl foram misturadas com líquido de cintilação e a radioatividade medida em cintilador. Estão indicados os volumes de eluição das substâncias usadas na calibração da coluna (glucagon, bradicinina e metionina). As frações correspondentes aos peptídeos nascentes (entre 135 e 175 ml) foram combinadas.

(Met-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Trp) dois resíduos de valina e dois de leucina fica explicada a diferença entre a radioatividade dos peptídeos preparados naquele e neste trabalho pois aqui a penas o resíduo de metionina inicial de cada cadeia pode apresentar radioatividade. O último pico de radioatividade (Fig. 3) corresponde ã metionina não incorporada nos peptídeos.

DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DAS ARILAMIDASES HEPÁTICAS

A figura 4 mostra a distribuição subcelular das atividades sobre LysNA, ArgNA, AlaNA, LeuNA, MetNA e das enzimas marcadoras de mitocôndria pesada (glutamato desidrogenase), mitocôndria leve (fosfatase ácida inibível por tartarato) e microsoma (glicose-6-fosfatase). Os resultados estão apresentados na forma de atividade específica relativa (ver métodos) em função da distribuição de proteína entre as frações (De Duve et al, 1955).

Esta representação permitiu obter comparação simultânea entre a distribuição subcelular das enzimas marcadoras e das arilaminopeptidases. A distribuição das enzimas marcadoras (Fig. 4) identifica as respectivas frações subcelulares obtidas e também indica que elas possuem alto grau de pureza. O exame das preparações ao microscópio eletrônico mostrou que no processo de fracionamento as organelas mantiveram-se intactas (figura 5).

A atividade arilamidásica foi encontrada em todas as frações subcelulares. As atividades sobre MetNA e AlaNA concentraram-se preferencialmente na mitocôndria (pesada e leve) e a atividade sobre LeuNA concentrou-se principalmente na mitocôndria leve. A fração solúvel concentrou apenas atividade sobre ArgNA e LysNA. A fração nuclear não concentrou ne-

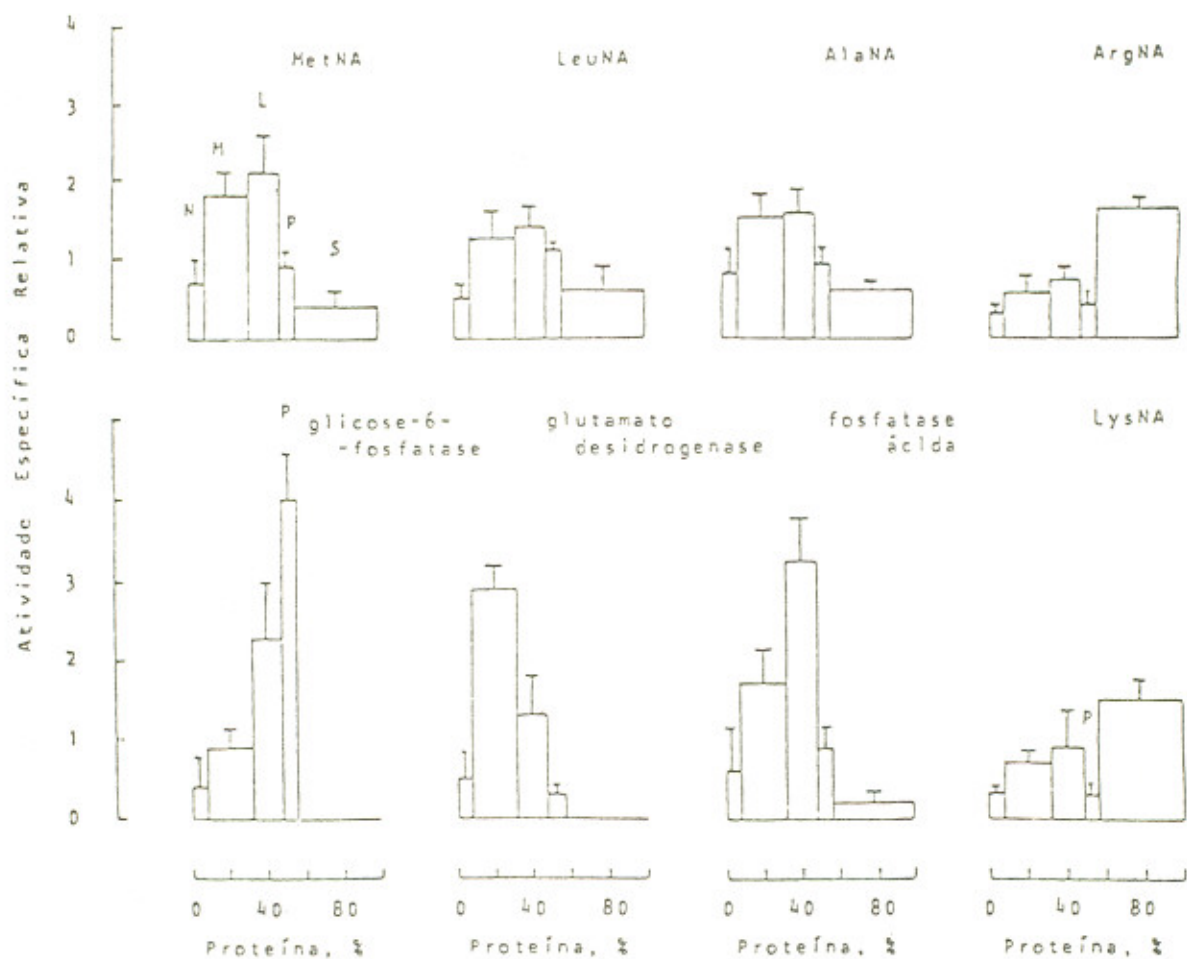


Figura 4. Fracionamento subcelular do fígado de rato. Distribuição de atividade arilamidásica, glicose-6-fosfatase, glutamato desidrogenase e fosfatase ácida. Núcleo (N); mitocôndria pesada (M); mitocôndria leve (L); microsoma (P) e solúvel (S). As barras representam o desvio padrão de 5 experimentos.

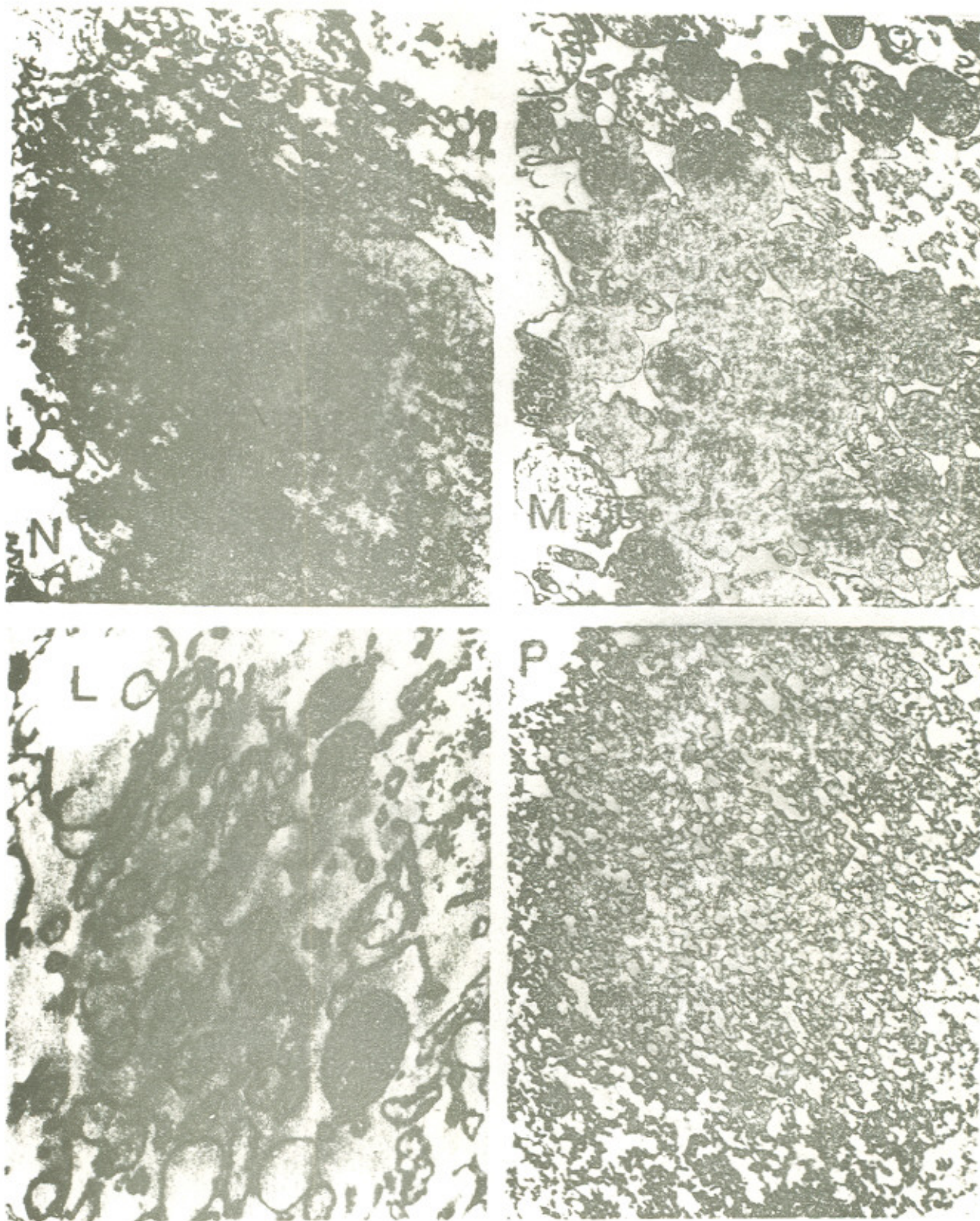


Figura 5. Frações subcelulares de fígado de rato. As frações obtidas (ver métodos) foram fixadas em glutaraldeído - ácido ôsmico e incluídas em resina Polylite. Os cortes foram feitos em micrótomo de avanço mecânico e observados em microscópio Phillips EM-400. N, núcleo; M, mitocôndria pesada; L, mitocôndria leve e P, microsoma.

nhuma das atividades arilamidásicas mas mostrou atividade residual para todas as enzimas, inclusive as marcadoras de outras organelas.

A tabela I mostra a relação entre as velocidades de hidrólise de diversas AANA pelas frações subcelulares quando se considera a atividade sobre LysNA como unitária. Em cada uma das frações particuladas (mitocôndria pesada, mitocôndria leve e microsoma) a atividade relativa sobre MetNA é mais alta do que aquelas observadas com qualquer outro substrato testado. A fração solúvel, por sua vez, tem alta atividade sobre naftilamidas de aminoácidos básicos e, ao contrário das demais, a preferência é para a hidrólise destas AANA. A alta atividade relativa sobre MetNA da fração nuclear é devida à contaminação da fração com restos celulares e não pode, portanto, ser levada em consideração.

A distribuição porcentual das atividades arilamidásicas nas frações subcelulares (tabela II) mostra que as atividades sobre MetNA e LeuNA encontram-se predominantemente (cerca de 80%) nas frações particuladas. Ao contrário, as atividades sobre LysNA e ArgNA predominam (cerca de 75%) na fração solúvel. Somente a atividade ArgNAsica da fração solúvel foi ativada por íon cloreto. Embora a atividade sobre AlaNA predomine nas frações particuladas, a fração solúvel contém 37% da atividade total sobre este substrato.

Estabilidade das frações subcelulares - É importante salientar que armazenados a -20°C e submetidos a apenas um ciclo, congelação/descongelação, microsoma e mitocôndria (pesada e leve) mantêm a atividade arilamidásica invariável por 15 dias ou mais (Fig. 6). Mantidas a 4°C as frações perdem progressivamente a atividade. Não foi encontrada explicação para a inativação aparentemente bifásica da atividade sobre MetNA e LeuNA encontrada em alguns casos. Em vista destes resultados todos os demais exper-

TABELA I

Atividades relativas da hidrólise de aminoacil-2-naftilamidas por frações subcelulares do fígado de rato

F r a ç ã o	LysNA	ArgNA	MetNA	AlaNA	LeuNA
Núcleo	1,0	1,5	4,8	3,1	1,7
Mitocôndria pesada	1,0	1,2	4,7	2,2	1,4
Mitocôndria leve	1,0	1,2	5,1	2,7	1,8
Microsoma	1,0	1,8	6,7	4,2	4,0
Solúvel	1,0	1,8	0,4	0,6	0,2

TABELA II

Distribuição percentual da atividade arilamidásica presente em frações subcelulares do fígado de rato[§]

F r a ç ã o	LysNA	ArgNA	MetNA	AlaNA	LeuNA
Núcleo	2	2	5	6	6
Mitocôndria pesada	12	9	40	25	29
Mitocôndria leve	12	9	29	25	34
Microsoma	2	2	9	7	12
Solúvel	72	78	17	37	19

[§]Os valores indicam a percentagem de atividade presente em cada fração, tomando-se como 100 a soma das atividades encontradas nas cinco frações.

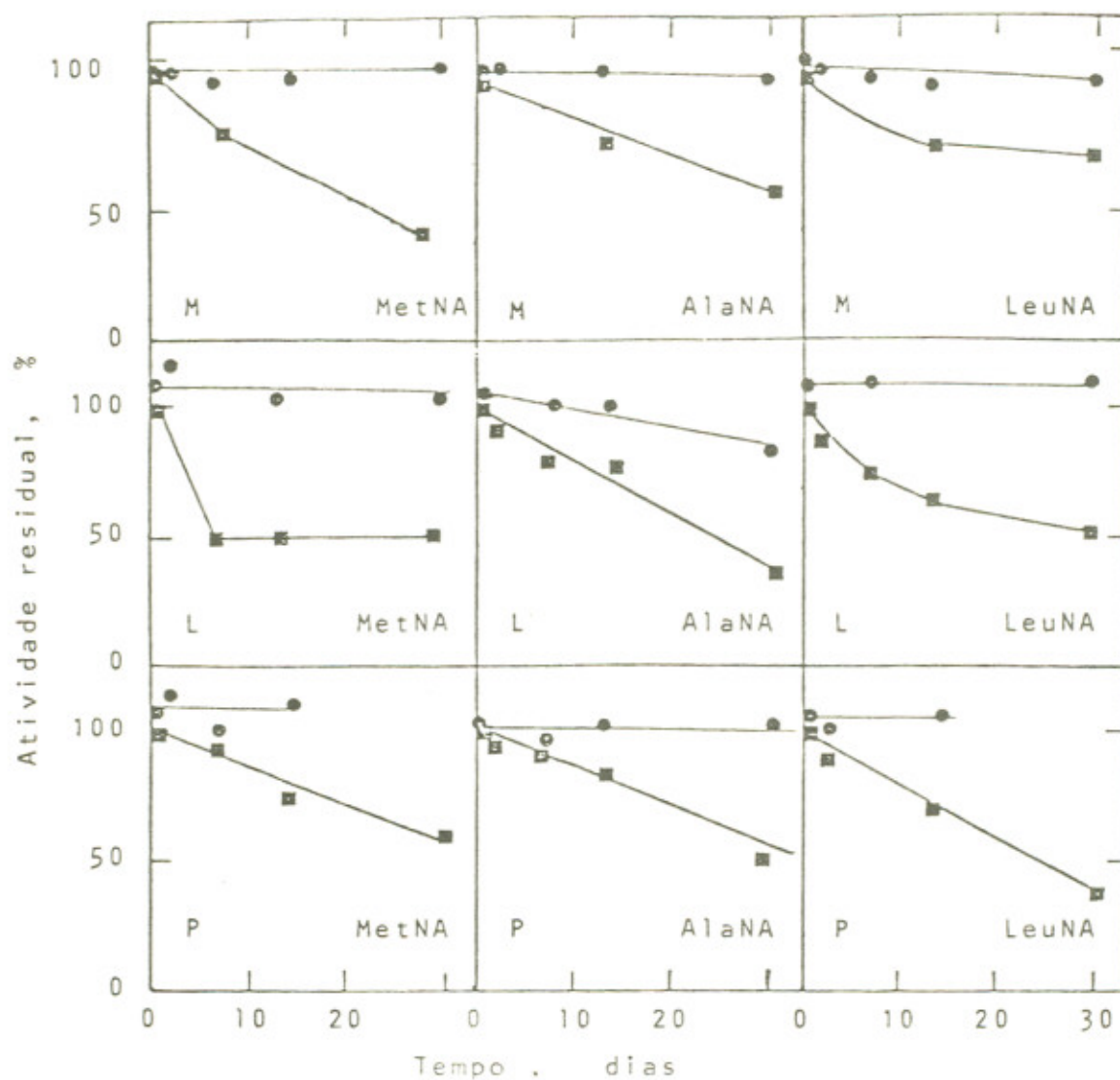


Figure 6. Estabilidade da atividade arilamidásica das frações subcelulares do fígado de rato. As frações, divididas em alíquotas foram armazenadas a 4°C (■) e a -20°C (●). Nos tempos indicados foram tomadas amostras para ensaio com AANA. As amostras mantidas a -20°C foram descongeladas uma única vez. M, mitocôndria pesada; L, mitocôndria leve; P, microsoma.

rimentos foram feitos com frações subcelulares recentes.

Os dados de distribuição subcelular associados ao comportamento das enzimas do homogenato no fracionamento cromatográfico em coluna de DEAE-celulose já mostraram que diferentes arilaminopeptidases estão presentes no fígado de rato. Destas, pelo menos duas atividades sobre MetNA puderam ser detectadas. Os estudos que se seguem visam melhor caracterizar a enzima que age preferencialmente sobre MetNA.

SOLUBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS PARTICULADAS

Solubilização por detergentes - Os efeitos do desoxicolato de sódio, SDS ou Triton X-100 na solubilização de proteínas de membrana e das enzimas está mostrado na figura 7. Observa-se que as quantidades de proteína e de enzimas presentes no sobrenadante da centrifugação do extrato citoplasmático são maiores após o tratamento com os detergentes, confirmando a suposição de que estas enzimas estão associadas com estruturas celulares particuladas.

Solubilização máxima das proteínas foi obtida numa relação detergente/proteína de 1:1 com desoxicolato (Fig. 7A), SDS (Fig. 7B) ou Triton X-100 (Fig. 7C). Diferentemente, a solubilização da MetNAase somente foi alcançada com a relação 5:1 tanto com desoxicolato como com Triton X-100 mas não com SDS. Na verdade a partir desta última relação detergente/proteína uma inibição parcial da enzima foi verificada com os dois detergentes aniônicos. Contrariamente, Triton X-100 até quantidades 20 vezes mais altas do que a de proteína (p/p) não mostrou qualquer efeito inibitório sobre a enzima solubilizada. Adicionalmente, como mostrado na figura 8, nas frações subcelulares isoladas a eficiência de solubilização de atividade por Triton X-100 é aumentada, obtendo-se máxima solubilização na

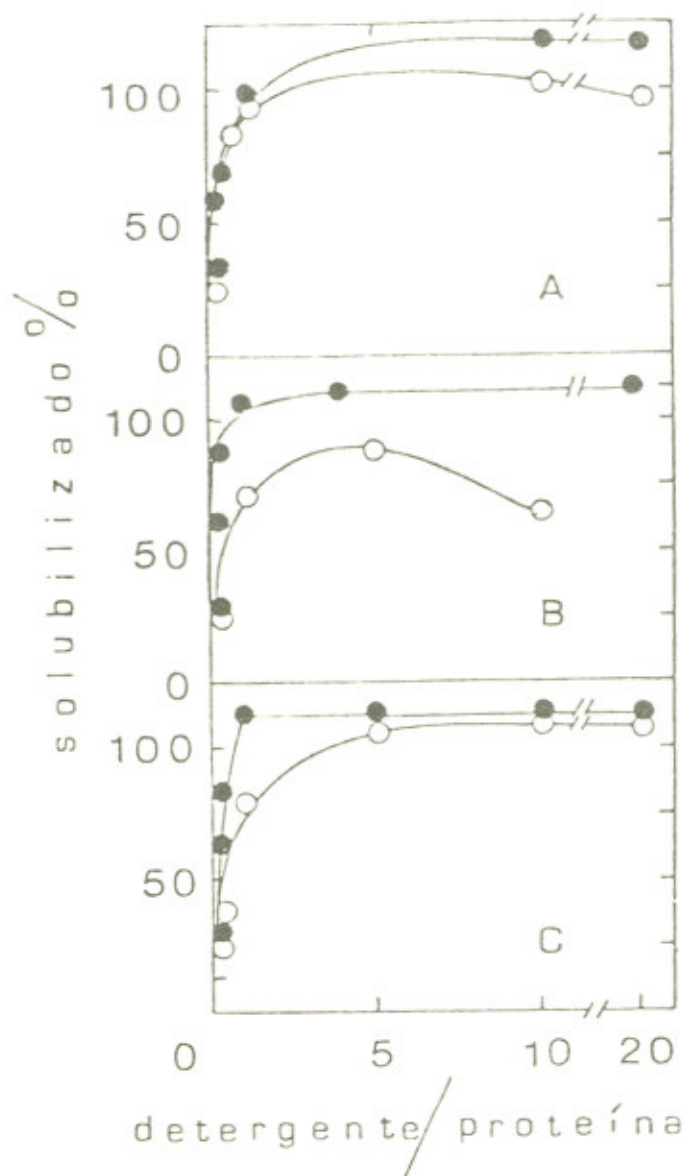


Figura 7. Solubilização de proteína e MetNAase do extrato citoplasmático do fígado de rato. Aliquotas do extrato citoplasmático contendo 3,0 mg de proteína foram tratadas (4°C) sob agitação branda com quantidades crescentes de desoxicolato de sódio (A), dodecilsulfato de sódio (B) e Triton X-100 (C). Relações detergente/proteína (em peso) variando entre 0 e 20. Após 30 min. de tratamento o material não solubilizado foi removido por centrifugação (300.000 g.min; 4°C). Proteína (●) e MetNAase (○) recuperadas no sobrenadante em relação a proteína e atividade presentes no material inicial.

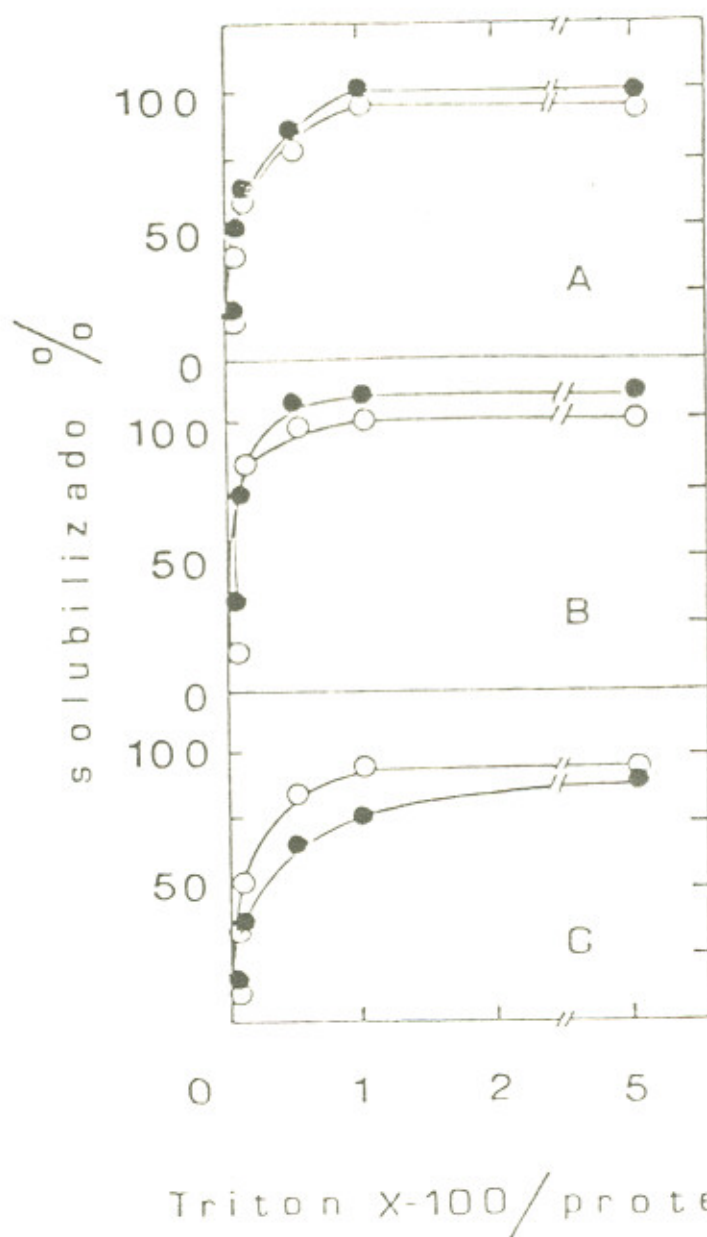


Figura 8. Solubilização de frações subcelulares do fígado de rato por Triton X-100. Alíquotas das frações microsoma (A), mitocôndria pesada (B) e mitocôndria leve (C) contendo cada uma 3,8 mg de proteína foram mantidas sob agitação branda a 4°C com quantidades crescentes de Triton X-100. Relações Triton X-100/proteína (em peso) variando entre 0 e 5. Após 30 minutos o material não solubilizado foi separado por centrifugação (300.000 g.min.; 4°C). Proteína (●) e MetNAase (○) recuperadas no sobrenadante em relação ao material inicial.

razão detergente/proteína de 1:1, novamente sem efeito inibitório mesmo acima desta proporção.

Atividade das enzimas microsomais - O microsoma foi escolhido para estudos adicionais com as enzimas particuladas e melhor caracterização da ligação enzima-membrana.

Para verificar se as enzimas associadas à membrana eram capazes de hidrolisar AANA com a mesma velocidade, tanto na forma particulada como na forma solubilizada, testou-se a atividade arilamidásica da fração microsomal tanto por curvas de dependência de tempo de reação como de concentração da organela. Em ambas as curvas (Figs. 9 e 10) verificou-se novamente hidrólise preferencial de MetNA. Triton X-100 foi então usado como um tratamento conveniente para a solubilização de arilamidases. Tanto as enzimas ligadas à membrana como aquelas solubilizadas apresentaram atividades específicas similares estimadas a partir das velocidades iniciais obtidas nas respectivas curvas, indicando que nenhuma modificação da atividade catalítica ocorreu depois do tratamento com o detergente. Os dados sugerem nitidamente que as enzimas são igualmente ativas nas formas associadas às membranas e solubilizadas.

A figura 11 mostra a inativação da MetNAase microsomal por SDS. Verifica-se que com 1% de SDS cerca de 75% da atividade enzimática são abolidos. A quantidade de SDS necessária para inibir 75% da atividade do microsoma solubilizado por Triton X-100 é o dobro daquela requerida para provocar a mesma inibição na atividade do microsoma bruto. Isto indica que o tratamento prévio com Triton X-100 protege parcialmente a enzima da inativação por SDS. A estabilidade das enzimas associadas às organelas mostrada na figura 6 foi também testada com microsoma solubilizado com Triton X-100. A figura 12 mostra que a 0°C (banho de gelo) a atividade enzimática

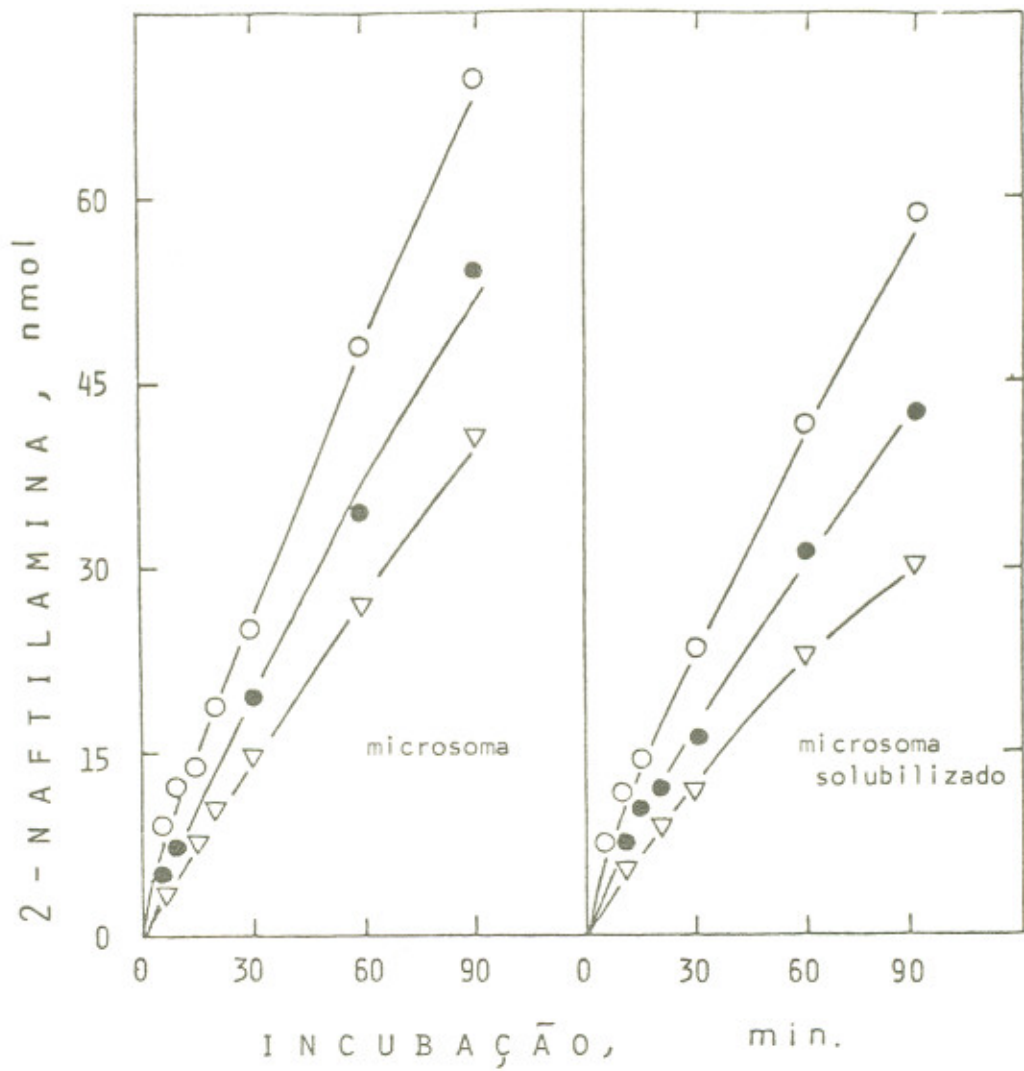


Figura 9. Hidrólise de AANA por microsoma e microsoma solubilizado com Triton X-100 (relação detergente/proteína 5:1), em função do tempo de incubação. Incubações contendo 0,5 mg de proteína. MetNA (o); AlaNA (●) e ArgNA (▽).

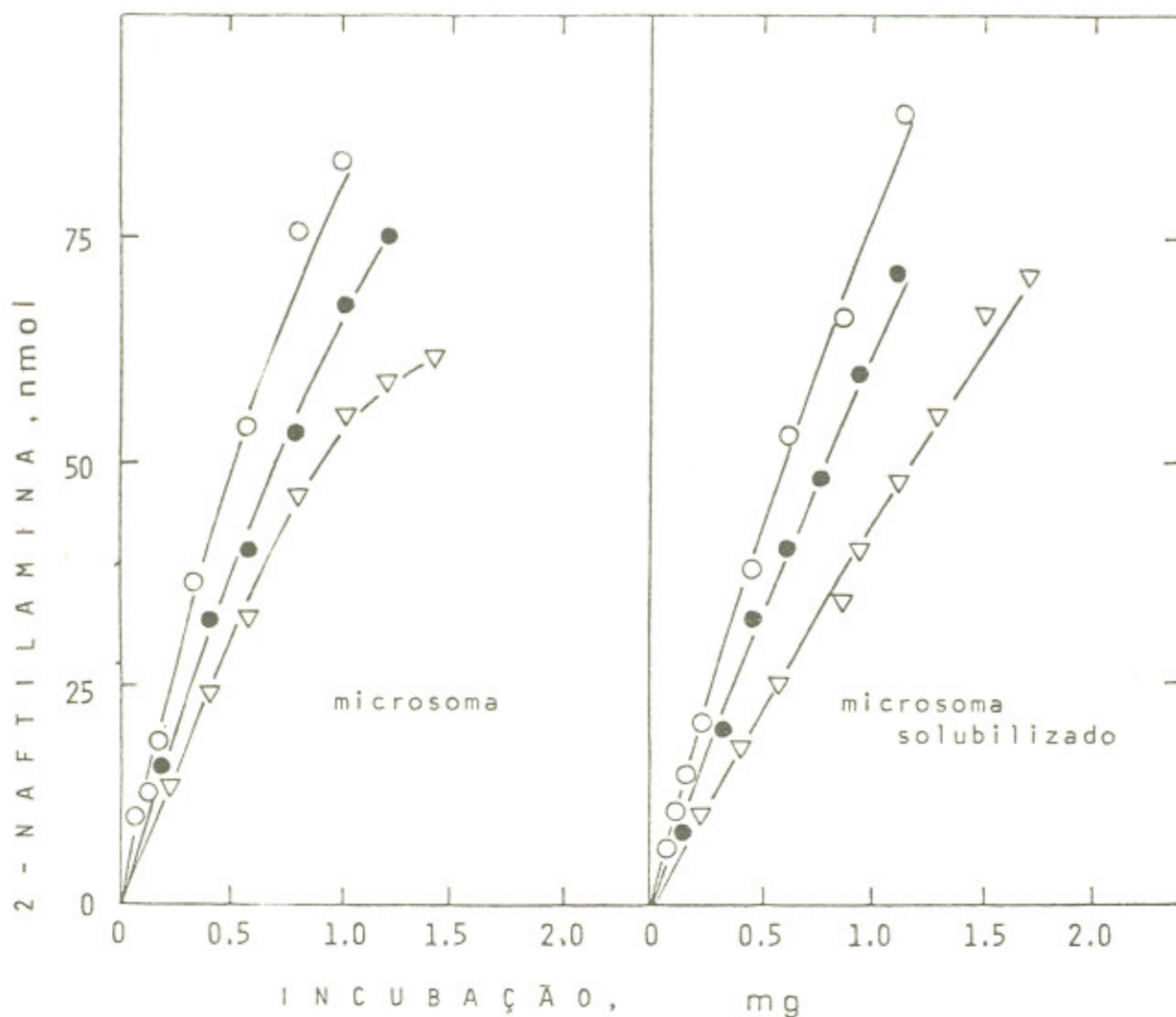


Figura 10. Hidrólise de AANA por microsoma e microsoma solubilizado com Triton X-100 (relação detergente/proteína 5:1) em função da quantidade de proteína no incubado. Velocidades iniciais de hidrólise ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) pelo microsoma e microsoma solubilizado, respectivamente: MetNA (o) 7,3 e 7,0; AlaNA (●) 5,1 e 4,9; ArgNA (▽) 3,5 e 3,3.

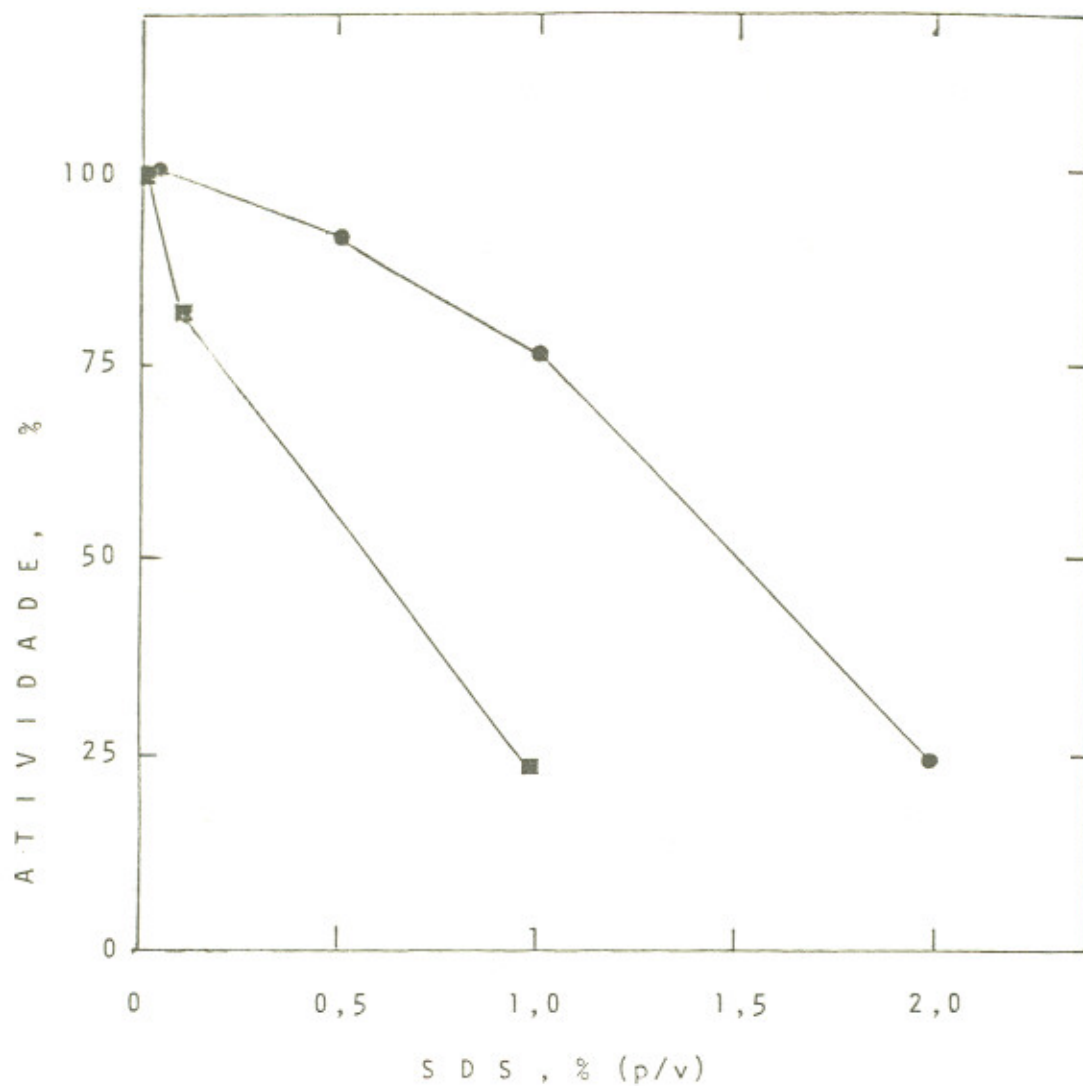


Figura 11. Efeito do Triton X-100 sobre a inativação da MetNAase do microsoma de fígado de rato por SDS. As preparações (2,7 mg de proteína) foram incubadas com diferentes concentrações de SDS por 10 minutos (24°C) e ensaiadas com MetNA. Microsoma (■) e microsoma previamente tratado com Triton X-100 (●) numa relação proteína:detergente 1:5.

permanece estável por 3 horas. Incubações mais prolongadas (não mostrado) na mesma temperatura ou em amostras congeladas apresentam graus de inativação similares ao das enzimas não solubilizadas por Triton X-100 (figura 6). A 24°C e a 37°C (Fig. 12) a enzima é também estável por cerca de 3 horas. Esta observação sugere que a instabilidade da enzima não é devida à contaminação por proteases que pudessem inativar as arilamidases presentes, não sendo também protegida pelo detergente. Quando a preparação é colocada à 55°C ocorre inativação térmica logo nos primeiros minutos (Fig. 12).

Com base no conjunto de resultados acima discutidos foi adotada, para todos os estudos com frações subcelulares, a solubilização das enzimas a 4°C por tratamento com Triton (relação proteína/detergente 1:5, em peso, agitação suave por 30 minutos) seguido de centrifugação para remoção do material não solubilizado.

Tratamento por proteinases - O tratamento com proteinases para solubilizar arilamidases tem sido sugerido (Emmelot et al, 1968; Andria et al, 1976). No caso da MetNAase microsomal houve solubilização parcial da atividade MetNAásica (Tabela III). Mesmo com o aumento do tempo de incubação nem tripsina e nem bromelaína aumentaram a atividade recuperada no sobrenadante. Estas enzimas, portanto não são eficazes como agentes capazes de remover MetNAase da membrana. Considerando a soma das atividades que foram recuperadas no sobrenadante e no precipitado em conjunto, conclui-se que estas proteinases praticamente não inativaram as arilamidases.

Tratamento com NaCl - Após centrifugação do microsoma (controle) aproximadamente um quarto da proteína e da atividade arilamidásica permanecem no sobrenadante (Tabela IV). Quando o microsoma é previamente tratado com NaCl 0,5 M a proteína recuperada no sobrenadante passa de 27%

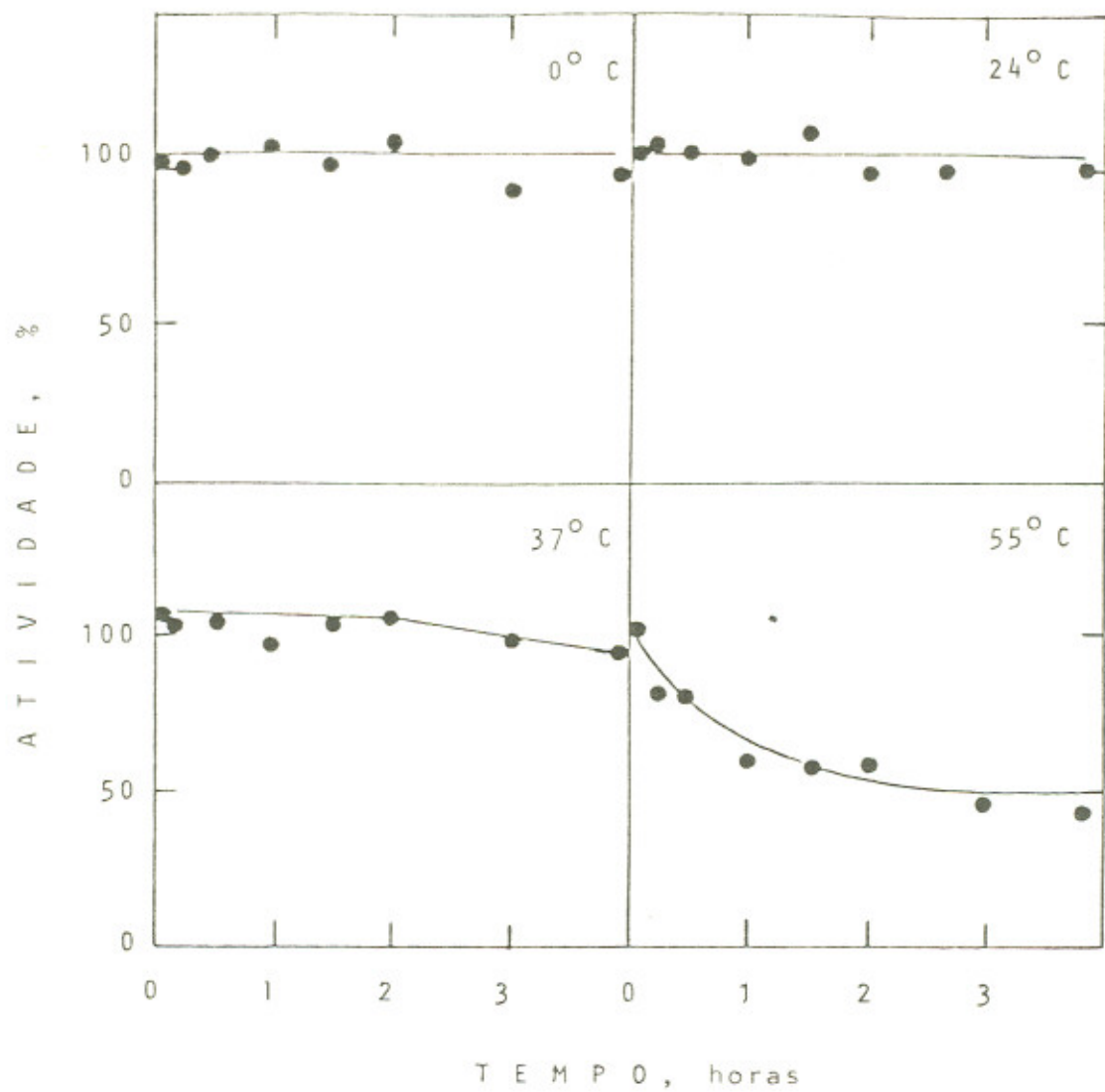


Figura 12. Efeito da temperatura sobre a atividade MetNAásica do microsoma de fígado de rato solubilizado com Triton X-100. Nos tempos indicados foram tomadas alíquotas de amostras mantidas a 0°, 24°, 37° ou 55°C.

TABELA III

Tratamento do microsoma do fígado de rato com tripsina e bromelaína[§]

T r a t a m e n t o	% Atividade	
	Sobrenadante	Total ^{§§}
Nenhum	—	100
Tripsina, 10 min.	46	91
15 min.	53	85
60 min.	59	85
Bromelaína 10 min.	51	105
60 min.	58	93

[§]microsoma (20 mg de proteína) foi incubado com 2,0 mg de tripsina ou 1,0 mg de bromelaína em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, 37°C. A atividade MetNAásica foi determinada no sobrenadante e no precipitado (300.000 g.min; 4°C) de alíquotas dos incubados.

^{§§}sobrenadante + precipitado

TABELA IV

Tratamento do microsoma do fígado de rato com NaCl[§]

Tratamento	Proteína		Atividade	
	sobrenadante	precipitado	sobrenadante	precipitado
Nenhum ^{§§}	100	—	100	—
Controle	27	60	25	63
NaCl 0,5 M	60	30	20	65

[§] microsoma de fígado de rato foi incubado ou não (controle) com NaCl (30 min.; 20°C), após centrifugação (300.000 g.min) a proteína e a atividade de sobre MetNA do sobrenadante e do precipitado foram determinadas.

^{§§} corresponde ao microsoma não tratado e não centrifugado.

para 60% enquanto que a atividade arilamidásica permanece invariável. Este resultado indica que o sal não tem efeito na remoção da enzima. A hipótese de que o tratamento salino tenha provocado inativação na enzima e desta forma mascarado sua solubilização deve ser rejeitada pois a soma das atividades do sobrenadante e do precipitado são praticamente iguais tanto no controle quanto na amostra que recebeu o tratamento.

Este comportamento, isto é, a impossibilidade de remoção da enzima da membrana microsomal por NaCl caracteriza proteínas integrantes da membrana (Singer e Nicolson, 1972). Desta forma pode-se sugerir que a MetNAase presente no microsoma é uma enzima deste tipo e, como tal deve possuir uma porção hidrofóbica embutida na membrana que interage com as cadeias de carbono da bicamada lipídica, mantendo exteriorizado o sítio catalítico.

FRACIONAMENTO DAS ARILAMIDASES EM DEAE-CELULOSE

As frações microsoma e mitocôndria (pesada e leve), após tratamento com Triton X-100 (ver métodos), foram fracionadas em DEAE-celulose. As amostras contendo as enzimas solubilizadas foram ajustadas às mesmas condições do tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0 - Triton X-100 0,05% - 2-mercaptoetanol 1,0 mM). O fracionamento cromatográfico, repetido ao menos 3 vezes para cada uma das frações subcelulares, mostrou um padrão de comportamento de adsorção semelhante para todas as frações subcelulares (Fig. 13). A resina reteve parte da proteína e das atividades presentes nas amostras introduzidas nas colunas. Em cada experimento cerca de 60% da atividade enzimática não foi adsorvida no gel.

A atividade MetNAásica foi sistematicamente distribuída em dois picos de atividade. Pico I - o material não retido que consistentemen

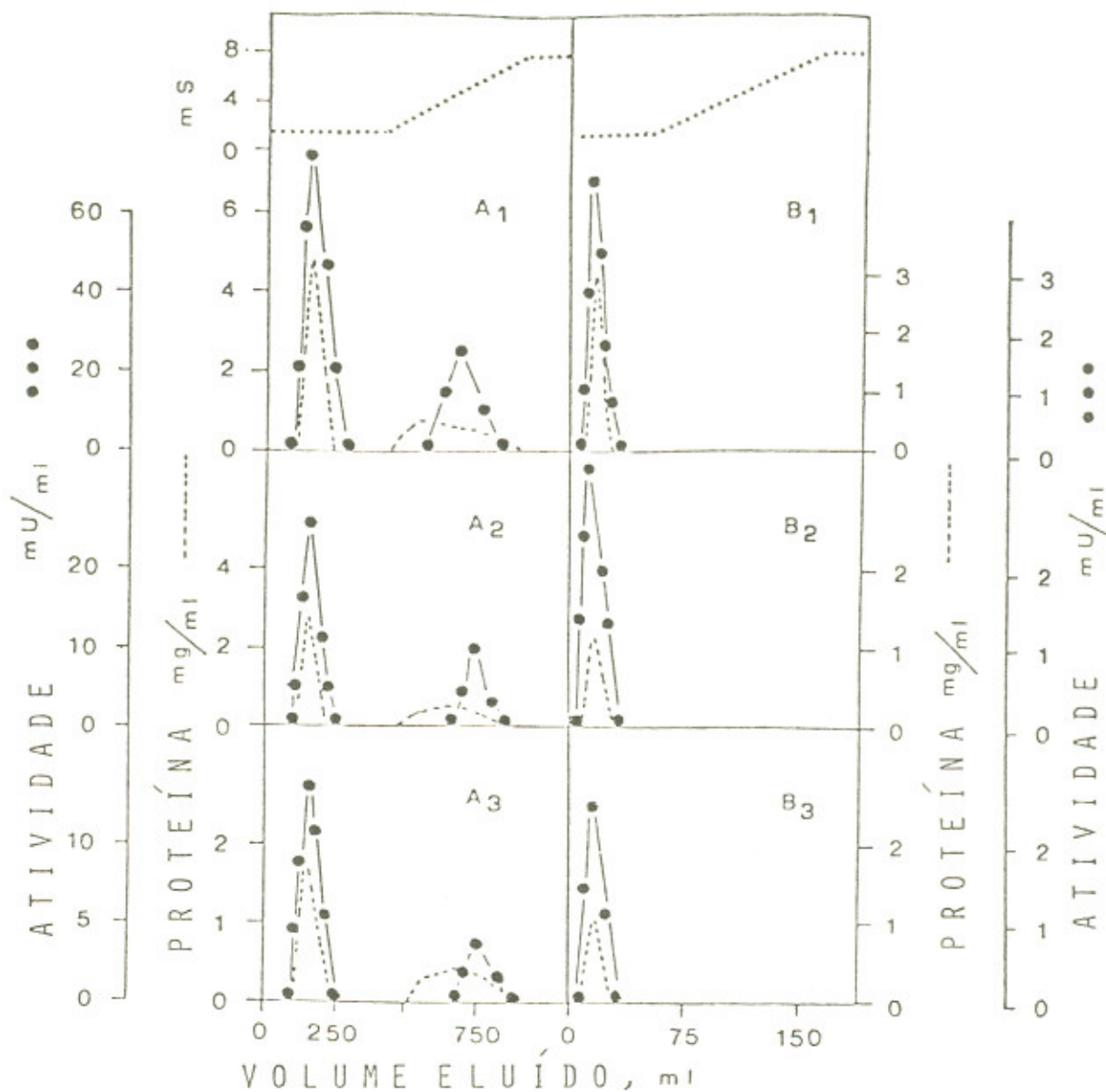


Figura 13. Cromatografia em DEAE-celulose de frações subcelulares do fígado de rato previamente solubilizadas com Triton X-100. As colunas 3,5 x 10,0 cm (A) e 1,4 x 6,7 cm (B), de DEAE-celulose Cellex D foram equilibradas com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e Triton X-100 0,05 % (v/v), pH 7,0. Após a introdução das amostras as colunas foram percoladas com o tampão de equilíbrio e em seguida com gradiente linear de fosfato de sódio (20 - 200 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e Triton X-100 0,05%, pH 7,0). A₁: mitocôndria pesada, 627 mg de proteína; A₂: mitocôndria leve, 441 mg de proteína; A₃: microsoma, 104 mg de proteína; B₁: 20 mg de proteína do pico não retido em A₁; B₂: 18 mg de proteína do pico não retido em A₂; B₃: 9 mg de proteína do pico não retido em A₃. Fluxo de 10 ml.cm⁻².h⁻¹; frações de 15,0 ml (A) ou 2,0 ml (B). MetNA (●); proteína (-----); condutividade (.....).

te (vários experimentos para cada organela) foi recuperado da amostra inicial introduzida na coluna e percolada do gel antes da aplicação do gradiente salino. Pico II - a atividade enzimática adsorvida na resina e somente eluída com 0,12-0,18 M (4 - 5 mS) de fosfato de sódio. Comparando as atividades relativas MetNA/AlaNA das enzimas dos picos I e II observa-se (tabela V) que em cada uma das três frações subcelulares particuladas o material não retido na resina hidroliza preferencialmente MetNA. Esta diferença de especificidade indica que, embora com ação sobre os mesmos substratos, cada pico possui uma atividade enzimática distinta.

Para demonstrar que não houve sobrecarga na coluna, dois outros experimentos foram realizados. No primeiro, o material do pico I de cada organela foi recromatografado em DEAE-celulose nas mesmas condições que anteriormente; a proteína e a atividade introduzidas nesta segunda coluna foram recuperadas totalmente na posição do pico I e nenhuma atividade na posição do pico II (Fig. 3B). No segundo experimento microsoma solubilizado foi cromatografado em coluna de DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato de sódio de menor concentração e mesmo pH (10 mM e não 20 mM). Nessas condições de equilíbrio procurou-se proporcionar a adsorção de ao menos parte da atividade que não era retida pela resina nas condições de equilíbrio anteriores. Além das atividades enzimáticas correspondentes aos picos I e II, obteve-se ainda um pico de atividade intermediário eluído com força iônica de 1,3 mS (Fig. 14). Este valor de condutividade iônica corresponde ao do tampão fosfato de sódio 20 mM. Este pico, que não foi observado nas colunas equilibradas com fosfato de sódio 20 mM não só apresentou preferência para a hidrólise de MetNA como também apresentou uma relação de atividade MetNA/AlaNA semelhante à do pico I da coluna anterior. Desta forma conclui-se que não houve sobrecarga da coluna nos experimentos anteriores e que este é realmente o comportamento eletrostático, frente ao

TABELA V

Atividades relativas (MetNA/AlaNA) das frações não retida (pico I) e retida (pico II) pela coluna de DEAE-celulose

Fração subcelular	Pico I	Pico II
Homogenato	5,7	0,8
Mitocôndria pesada	6,7	2,0
Mitocôndria leve	3,6	1,0
Microsoma	5,0	1,3

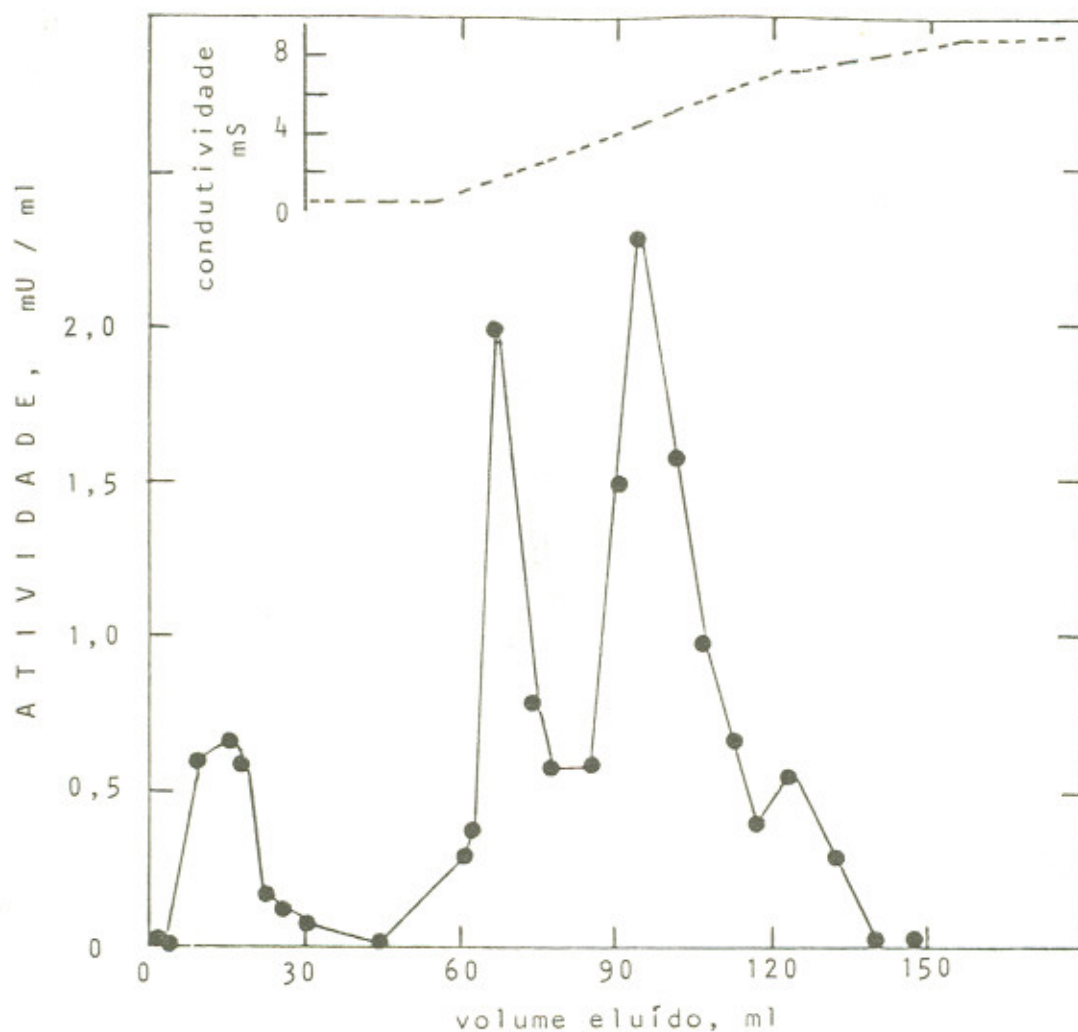


Figura 14. Cromatografia em DEAE-celulose do microsoma do fígado de rato solubilizado com Triton X-100. Coluna (1,4 x 6,7 cm) de DEAE-celulose Cellex D equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e Triton X-100 0,05% (v/v), pH 7,0. Após a introdução da amostra (17 mg de proteína) a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio e em seguida com um gradiente de fosfato de sódio (10 - 200 mM) contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e Triton X-100 0,05%. Fluxo de 10 ml.Cm⁻². h⁻¹. Frações de 2,0 ml. MetNA (●); condutividade (-----).

DEAE-celulose das MetNAases presentes nas amostras. Os resultados mostram que não há identidade entre as enzimas presentes nos picos I e II tanto no que se refere às propriedades de retenção na resina como na preferência para a hidrólise de MetNA indicam claramente que existem duas enzimas que apresentam em comum a atividade arilamidásica. Verifica-se ademais que o comportamento cromatográfico das duas MetNAases aqui observados é similar aquele obtido no fracionamento do homogenato total (cf. Fig. 1).

Estudos adicionais mostrados adiante confirmaram a semelhança da MetNAase do pico I presente em cada organela com a metionina aminopeptidase (MAP) obtida do homogenato total de fígado de rato descrita anteriormente. Por este motivo foi adotada a denominação MAP, provisoriamente, para a MetNAase do pico I distinguindo-a da outra enzima (pico II).

O mesmo processamento cromatográfico com a fração solúvel resultou num perfil de eluição distinto do observado com a cromatografia das frações particuladas (Fig. 15). Para facilitar a comparação está também mostrada a atividade sobre ArgNA, que é a predominante nesta fração. Esta atividade é eluída com força iônica de 2,7 mS e apresenta duas propriedades que são características da arginina aminopeptidase (EC 3.4.11.6): hidroliza apenas ArgNA e LysNA e sofre ativação por cloreto (Mäkinen e Mäkinen, 1971; Freitas Jr. et al, 1979; Termignoni, 1980). Neste fracionamento há um outro pico de atividade eluída com força iônica de 5 mS. As atividades relativas deste pico são: ArgNA 1,0; AlaNA 0,8; LeuNA 0,2 e MetNA 0,1 e não aparece o efeito de ativação por cloreto.

PROPRIEDADES DA MAP

Algumas outras propriedades da metionina aminopeptidase obtida de microsoma (MAP-P), mitocôndria pesada (MAP-M) e mitocôndria leve

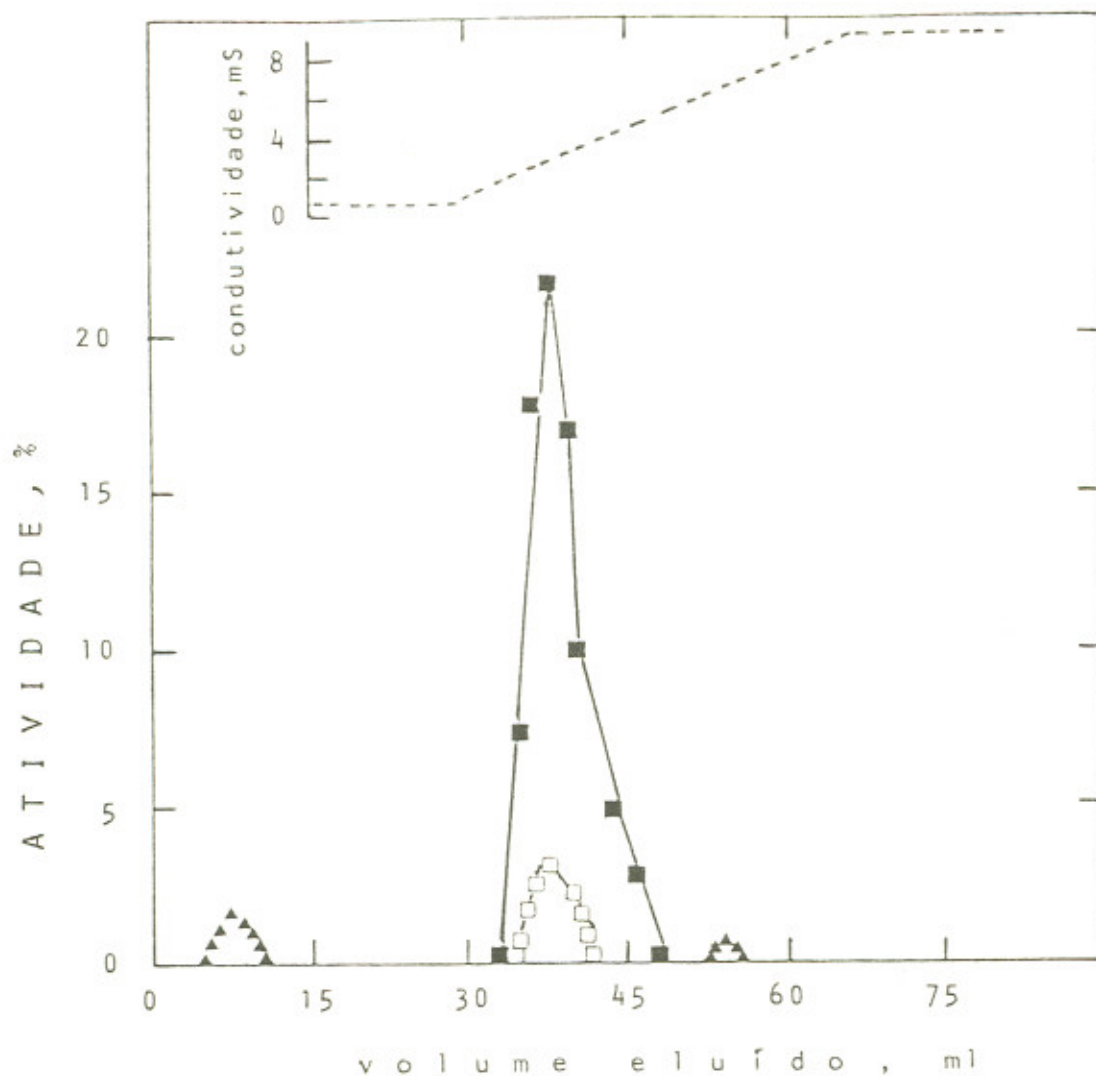


Figura 15. Cromatografia em DEAE-celulose de arilamidases da fração solúvel do fígado de rato. Coluna (1,4 x 6,7 cm) de DEAE-celulose Cellex D equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e Triton X-100 0,05% (v/v), pH 7,0. Após a introdução da amostra a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio e em seguida com um gradiente de fosfato de sódio (20 - 200 mM) contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM e Triton X-100 0,05%. ArgNA ensaiada em ausência (□) e presença (■) de Cl⁻; MetNA (▲); condutividade (----).

(MAP-L) foram estudadas e os resultados comparados com as da enzima purificada do homogenato.

Especificidade - Algumas aminas e amidas de aminoácidos foram testadas como substratos para a MAP obtida tanto do homogenato quanto das frações subcelulares. Com todas as preparações o melhor substrato sempre foi MetNA (tabela VI). Independentemente da natureza do resíduo de aminoácido, aminoacil-2-naftilamidas foram melhores substratos que quaisquer das aminas. Curiosamente as AAPNA são praticamente resistentes à hidrólise pela MAP, consistindo este fato numa distinção patente com outras arilamidas descritas. Por outro lado com AANA a preferência para o resíduo de metionina é nítida, especialmente nas frações particuladas. No entanto a especificidade da enzima parece não ser dirigida apenas à natureza do aminoácido N-terminal mas também ao radical que fornece o grupamento amino para a ligação susceptível de hidrólise. A importância do grupamento ligado à carboxila do aminoácido é ressaltada pela verificação de que a enzima praticamente não distingue LeuNH_2 de MetNH_2 ao contrário do que ocorre entre LeuNA e MetNA.

Constantes cinéticas - A figura 16 mostra os gráficos duplo-recíprocos da hidrólise de MetNA, LeuNA e AlaNA por MAP-P, MAP-M e MAP-L. Os valores de K_m calculados pelo método de Wilkinson (1961) a partir destes resultados são menores para a hidrólise de MetNA e LeuNA e muito mais altos com AlaNA (tabela VII). Os valores de V_m , embora de pouca significação, pois as preparações ainda estão impuras, mostram novamente a preferência da MAP para a hidrólise de MetNA. Uma vez que nenhuma das preparações de enzima chegou a ser obtida em estado homogêneo não foi possível calcular os valores de K_{cat} . Entretanto, como os valores de K_m e V_m

TABELA VI

Atividades relativas da metionina aminopeptidase de frações subcelulares do fígado de rato sobre derivados de aminoácidos

Substrato	MAP, origem			
	homogenato	mitocôndria pesada	mitocôndria leve	microsoma
DL-MetNA	100	100	100	100
L-LeuNA	75	45	44	60
DL-AlaNA	15	15	28	21
D-MetNH ₂	7	13	14	12
L-LeuNH ₂	19	19	19	14
L-AlaNH ₂	2	2	0	0
L-MetpNA	1	3	2	2
L-LeupNA	9	5	5	8
L-AlapNA	1	2	2	3

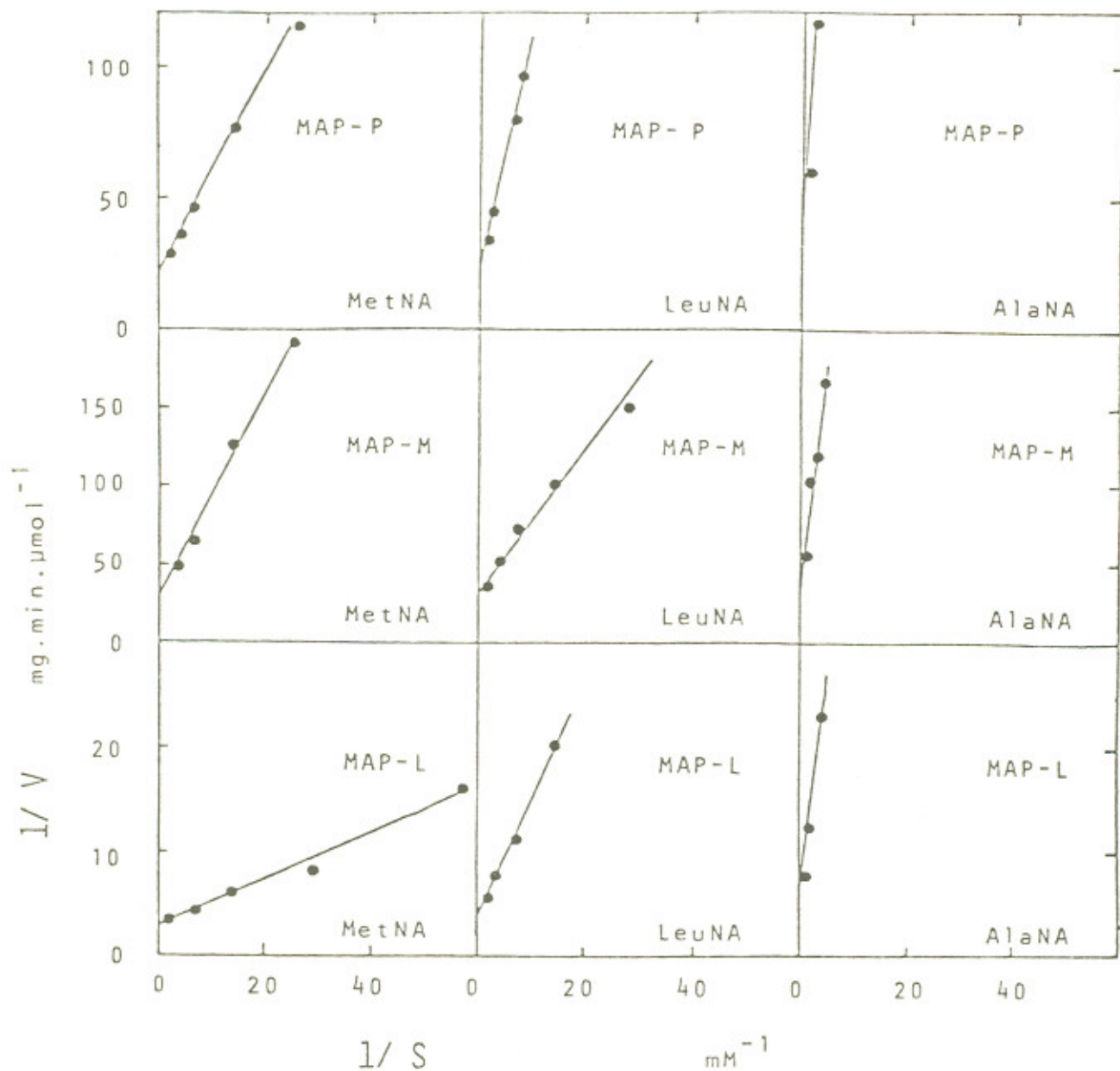


Figura 16. Gráficos duplo-recíprocos da hidrólise de AANA por MAP-P, MAP-M e MAP-L. As preparações foram incubadas com concentrações de substrato variando entre 8,8 μM e 1,1 mM (nem todas as concentrações estão indicadas na figura) em tampão fosfato de sódio 10 mM - NaCl 0,15 M - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0.

TABELA VII

Constantes cinéticas da hidrólise de aminoácil-2-naftilamidas pela metionina aminopeptidase

Substrato	MAP-P			MAP-M			MAP-L		
	K_m $\times 10^5$ M	V_m $\frac{\text{nmoles}}{\text{min.mg}}$	eficiência [§] catalítica	K_m $\times 10^5$ M	V_m $\frac{\text{nmoles}}{\text{min.mg}}$	eficiência [§] catalítica	K_m $\times 10^5$ M	V_m $\frac{\text{nmoles}}{\text{min.mg}}$	eficiência [§] catalítica
MetNA	19	51	1,0	22	58	1,0	7	328	1,0
LeuNA	26	34	0,5	18	33	0,7	25	236	0,2
AlaNA	130	22	0,06	158	39	0,1	160	311	0,04

[§] comparação entre os valores da relação V_m/K_m

para os três substratos foram obtidos simultaneamente com a mesma preparação da enzima de cada origem, foi possível calcular e comparar a eficiência catalítica relativa com que a MAP de cada preparação cataliza a hidrólise dos diferentes substratos. Assim, considerando a relação V_m/K_m para a hidrólise de MetNA como unitária, observamos que independentemente de sua origem (microsomal ou mitocôndria) a MAP hidroliza MetNA com eficiência de 1,5 a 5 vezes maior que LeuNA (Tabela VII). Mas com relação à AlaNA esta eficiência da MAP é de 10 a 25 vezes superior quando o substrato é MetNA.

Dependência do pH - O pH ótimo de atividade da MAP das três frações subcelulares estudadas situa-se na faixa entre 7,0 e 7,5 (Fig. 17). O pH 7,0 foi o escolhido para a realização dos demais experimentos com a atividade arilamidásica.

Efeito do EDTA - Incubações com EDTA até 10 mM não produziram qualquer grau de inibição das preparações da MAP. Contrariamente, em algumas das preparações de MAP-P, MAP-M e MAP-L o tratamento com EDTA (0,1 a 10 mM) produziu ativação de até 40%. Esta ativação sugere que as enzimas são inibidas por cátions divalentes. A possibilidade de contaminação da água por metais pesados passou a ser uma preocupação constante durante os estudos com a enzima.

Dependência do grupo -SH - O estudo da ação de reagentes de grupo -SH de proteínas foi feito com preparações previamente processadas por cromatografia de exclusão em gel Sephadex G-25 para remoção do 2-mercaptoetanol adicionado durante a preparação da enzima. A inibição da MAP-P, MAP-M e MAP-L por p-hidroximercuribenzoato de sódio é mostrada na figura 18. As concentrações de pOHMB necessárias para inibir 50% da atividade en-

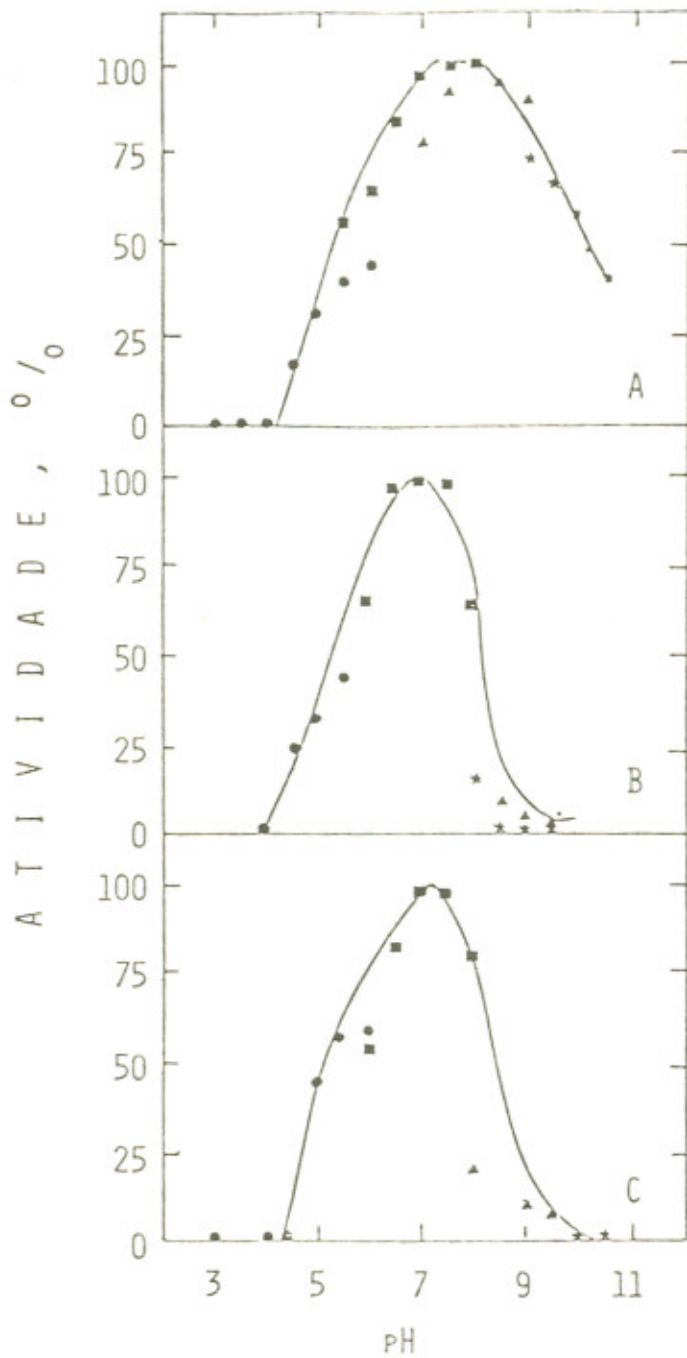


Figura 17. Dependência de pH da metionina aminopeptidase. Aliquotas de MAP-P (A); MAP-M (B) e MAP-L (C) foram incubadas com MetNA em tampão (10 mM) contendo 2-mercaptoetanol (1,0 mM). Citrato de sódio (●); fosfato de sódio (■); Tris-HCl (▲); bicarbonato de sódio (★).

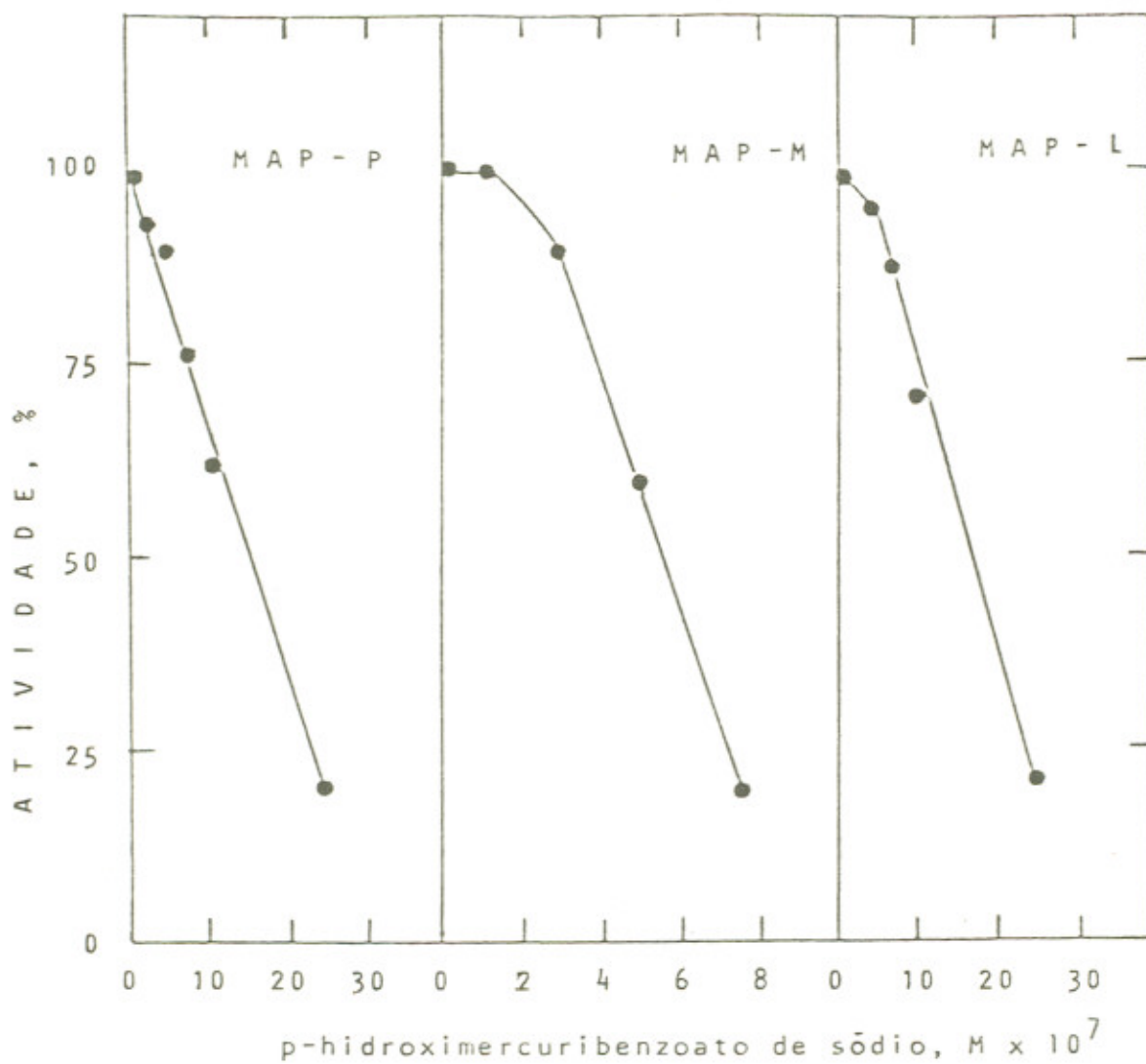


Figura 18. Inibição da metionina aminopeptidase por p-hidroximercuribenzoato de sódio. As preparações foram previamente cromatografadas em coluna de Sephadex G-25 (1,6 x 40,0 cm) para retirada do 2-mercaptoetanol. Imediatamente antes do ensaio com MetNA as amostras foram incubadas com o inibidor, em fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 durante 15 minutos a 20°C.

zimática foram 0,6; 1,5 e 1,7 μM , respectivamente para MAP-M, MAP-P e MAP-L. Considerando-se que as preparações ainda estão impuras parece razoável supor que a inibição por pOHMB possa ser ainda mais eficiente patenteando a alta sensibilidade da enzima a este reagente de grupo -SH.

A adição de 2-mercaptoetanol repõem a atividade que é parcialmente perdida pela enzima quando da remoção do redutor na coluna de Sephadex G-25. Igualmente a enzima inibida por tratamento com pOHMB tem sua atividade reposta quando de nova adição de 2-mercaptoetanol (Tabela VIII). As diferenças na reativação das enzimas por 2-mercaptoetanol podem ser devidas aos diferentes graus de oxidação que tenham ocorrido espontaneamente durante o manuseio das preparações ou ainda devido ao nível de oxidação dos grupos -SH das proteínas hepáticas no momento do sacrifício do animal. Estes resultados mostram que grupos -SH são importantes para a atividade catalítica da metionina aminopeptidase e talvez sejam responsáveis por, pelo menos, parte da alta instabilidade demonstrada pela enzima parcialmente purificada.

Inibição por metionina - Diferentemente do encontrado com outras arilamidases, a metionina, produto da hidrólise de MetNA é um mau inibidor da MAP. Os valores de K_i são, respectivamente para MAP-P, MAP-M e MAP-L 9, 11 e 20 mM (Fig. 19). Comparados com os correspondentes valores de K_m para MetNA os valores de K_i são cerca de 50 (MAP-P e MAP-L) e 280 (MAP-M) vezes maiores. O dado sugere que aparentemente não deve haver regulação da enzima pelos níveis de produto.

Efeito da bestatina - Este conhecido inibidor específico de aminopeptidases (Umezawa et al, 1976; Umezawa e Aoyagi, 1977; Wagner e Dixon, 1981) em concentrações de até 1×10^{-4} M não produziu qualquer efeito

TABELA VIII

Ativação da metionina aminopeptidase por 2-mercaptoetanol[§]

2-mercaptoetanol mM	pOHMB μM	% atividade		
		MAP-P	MAP-M	MAP-L
0	0	100	100	100
1	0	230	360	120
0	30	0	0	0
1	30	200	300	122

[§] o 2-mercaptoetanol presente nas preparações de enzima foi previamente removido em coluna de Sephadex G-25; incubação com pOHMB (15 min, 20°C) e posterior incubação com 2-mercaptoetanol (15 min, 20°C).

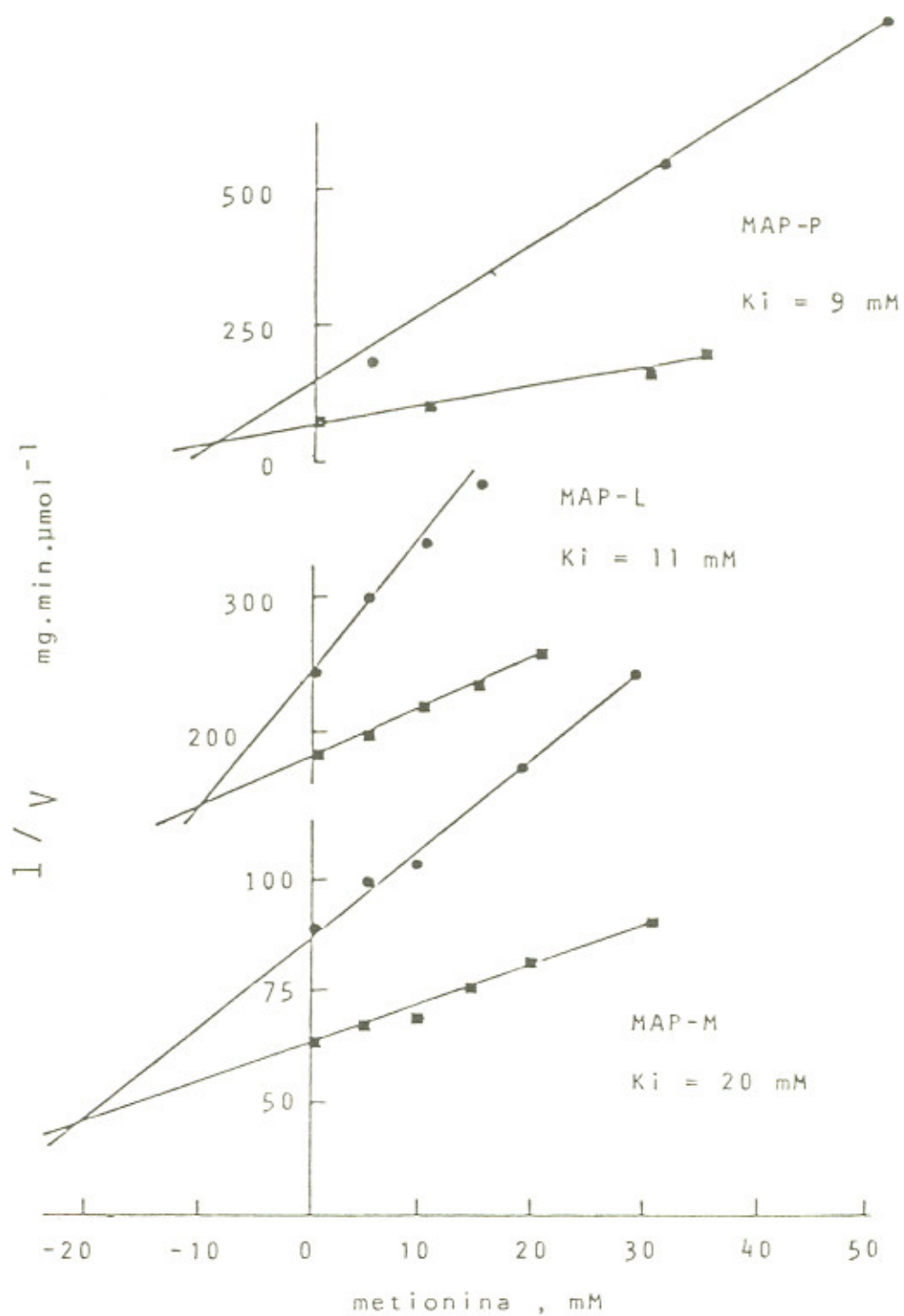


Figura 19. Inibição da metionina aminopeptidase por metionina. Alíquotas de MAP-P, MAP-L e MAP-M foram pré-incubadas por 15 minutos a 20°C com as concentrações de metionina indicadas na figura e em seguida incubadas com MetNA $70 \mu\text{M}$ (●) e $280 \mu\text{M}$ (■). Os valores de K_i foram calculados pelo método de Dixon (1953).

na atividade da MAP-L, MAP-M e MAP-P. Este inibidor apresenta usualmente valores de K_i para aminopeptidases a ordem de 1×10^{-6} a 1×10^{-7} M.

Hidrólise de Met-Ala-Ser - Para verificar se a MAP de cada fração subcelular era capaz de hidrolizar a ligação peptídica e não somente a ligação amida de substratos artificiais, as preparações foram incubadas com o tripeptídeo Met-Ala-Ser. As três preparações estudadas hidrolizaram as duas ligações peptídicas do substrato (Figs. 20 e 21). Estes resultados deixam claro que além de sua ação sobre aminoacil-2-naftilamidas a enzima não é uma arilamidase estrita mas uma aminopeptidase verdadeira.

Conversão de cininas - A figura 22 mostra a atividade cini-no-conversora da metionina aminopeptidase das frações microsoma, mitocôndria pesada e mitocôndria leve do fígado de rato. As três preparações da enzima hidrolizam a metionina N-terminal da MLBK com uma velocidade cerca de 3 vezes maior do que a velocidade de remoção da lisina. Comparando as atividades específicas da hidrólise da metionina da MLBK (MAP-P 0,7 mU/mg; MAP-M 0,8 mU/mg; MAP-L 2,5 mU/mg) com as velocidades de hidrólise da MetNA (Tabela VII), observa-se que a MetNA é melhor substrato do que MLBK.

Atividade sobre peptídeos nascentes - Na figura 23 está mostrado o radioautograma da cromatografia em papel da preparação de peptídeos nascentes de hemoglobina de coelho incubada com metionina aminopeptidase purificada do homogenato do fígado de rato. Observa-se que com a incubação, ocorreu um aumento da radioatividade na posição correspondente à migração da metionina. Esta posição de migração foi verificada através da realização de um cromatograma com metionina não marcada e revelação com ninhidrina. O resultado mostra claramente que a enzima hidrolisou a metio-

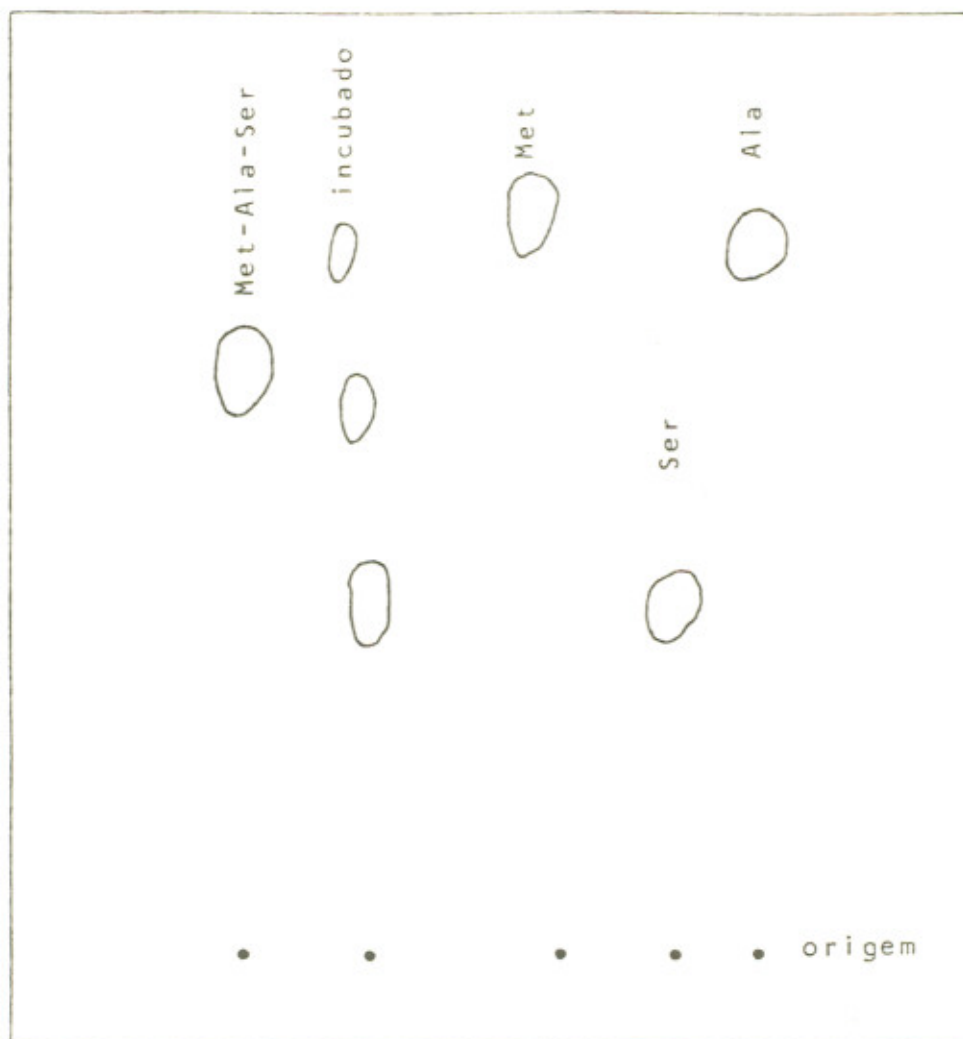


Figura 20. Cromatografia em papel do incubado de Met-Ala-Ser com metionina aminopeptidase do microsoma. A preparação de MAP-M (0,1 mg de proteína) foi incubada com o tripeptídeo (280 μ M) em tampão fosfato de sódio 10 mM - NaCl 0,15 M - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, 12 h, 37°C. O incubado foi aplicado em papel Whatman nº 1 juntamente com padrões do peptídeo e de aminoácidos. A cromatografia foi desenvolvida com butanol:ácido acético:água (4:1:1) e revelada com ninhidrina.

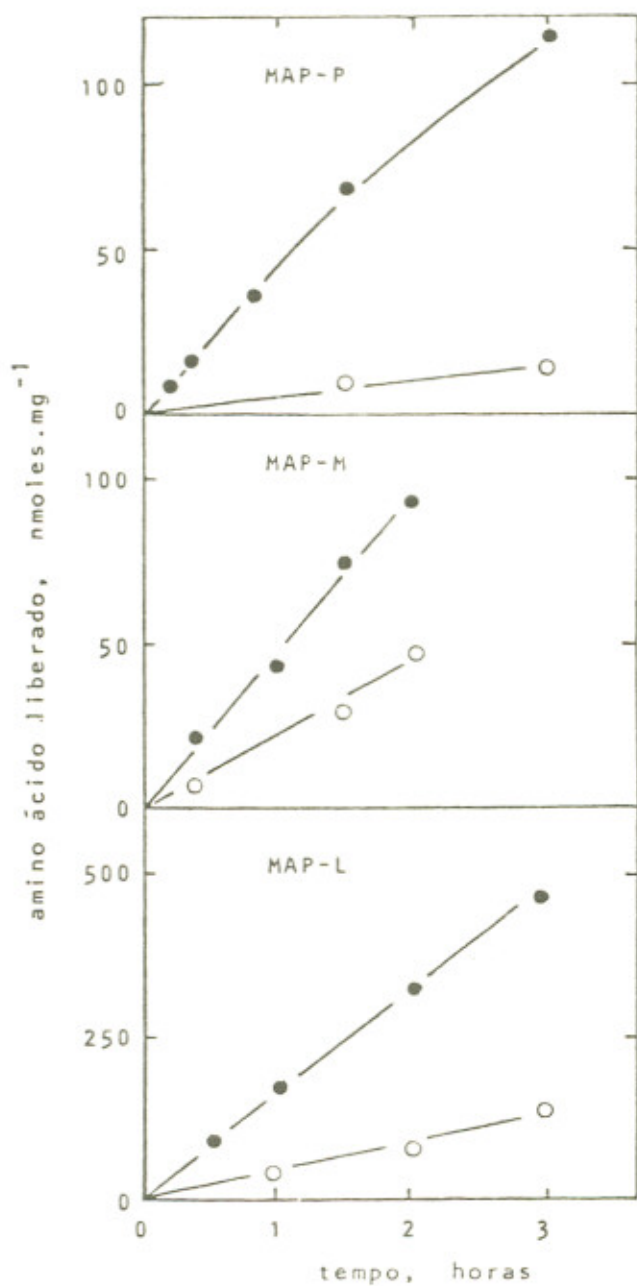


Figura 22. Hidrólise da MLBK por MAP-P, MAP-M e MAP-L. A incubação com MLBK (280 μ M) foi realizada em tampão fosfato de sódio 10 mM - NaCl 0,15 M - 2 mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0. Nos tempos indicados foram retiradas a l^íqu^otas da mistura de incubação para a análise de aminoácidos livres (ver métodos). Metionina (●); lisina (○).

Figura 23. Radioautograma da cromatografia da incubação de peptídeos nascentes de hemoglobina de coelho com MAP-homogenato. Um terço da preparação de peptídeos nascentes de hemoglobina de coelho (ver métodos) foi incubada com 0,4 mg de proteína da preparação de MAP-homogenato em tampão fosfato de sódio 10 mM - NaCl 0,15 M - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0 (12 h; 37°C). Após a incubação a mistura foi aplicada em papel Whatman nº 1 (B). Outro terço da preparação de peptídeos nascentes (controle) foi dissolvida no mesmo tampão e também aplicada no papel cromatográfico (A). A cromatografia foi desenvolvida em butanol:ácido:água (4:1:1). A exposição do filme de raio-X foi de 8 dias. Está indicada a posição de migração de metionina não marcada que foi dissolvida no mesmo tampão, cromatografada juntamente com a mistura de incubação e o controle dos peptídeos e reveladas com ninhidrina.

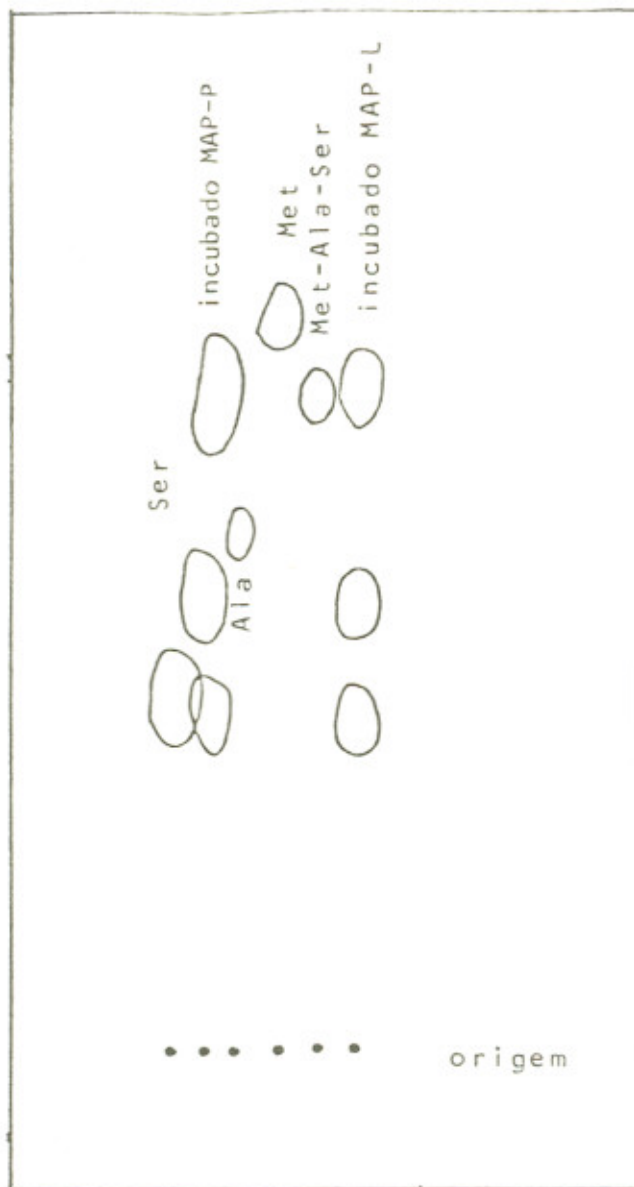
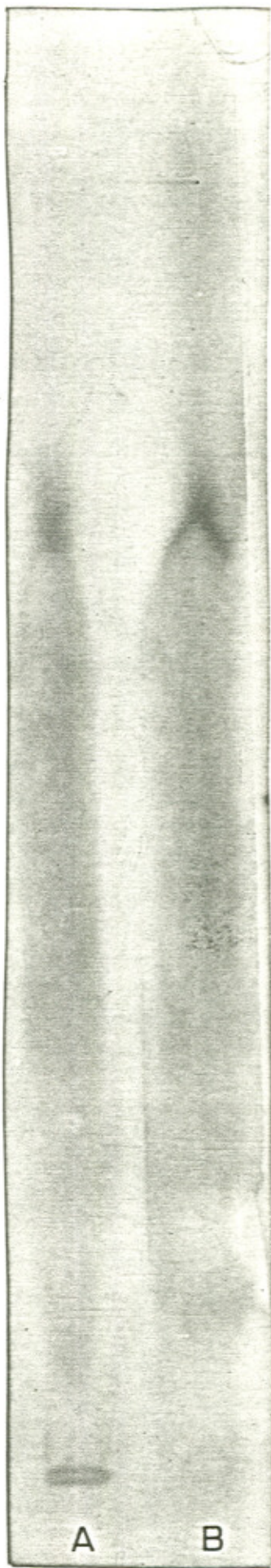


Figura 21. Cromatografia em papel do incubado de Met-Ala-Ser com metionina aminopeptidase. As preparações de MAP-P (0,1 mg de proteína) e MAP-L (0,05 mg de proteína) foram incubadas com o tripeptídeo (280 μ M) em tampão fosfato de sódio 10 mM - NaCl 0,15 M - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, 12 h, 37°C. Os incubados e, padrões de aminoácidos e substrato foram aplicados em papel Whatman nº 1. A cromatografia foi desenvolvida com butanol:ácido acético:água (4:1:1) e revelada com ninhidrina.



Met

origem

A

B

nina N-terminal dos peptídeos nascentes. O desaparecimento concomitante da radioatividade do ponto de aplicação da amostra que ocorreu com a incubação é uma evidência adicional da atividade da enzima.

Medindo-se a radioatividade das regiões correspondentes aos pontos de aplicação e ao Rf da metionina observa-se que a radioatividade o ponto de aplicação diminuiu de 905 cpm (contrôle) para 682 cpm (incubado) e a radioatividade correspondendo a metionina livre aumentou de 3955 cpm (controle) para 10.121 cpm (incubado). Este nível de radioatividade basal no experimento controle que migra na posição da ^{14}C -metionina é devido à metionina radioativa não separada totalmente dos peptídeos nascentes na coluna que os purificou (Fig. 3).

Estes resultados mostram claramente que a metionina aminopeptidase é capaz de remover metionina N-terminal de peptídeos nascentes.

D I S C U S S Ã O

DISTRIBUIÇÃO SUBCELULAR DAS ATIVIDADES ARILAMIDÁSICAS

A aplicação do método de centrifugação diferencial de DeDuve (DeDuve e Berthet, 1953; DeDuve et al, 1955) foi importante para permitir a localização da MAP e de outras arilamidases nas estruturas subcelulares do fígado de rato. Considerando, ademais, os valores das constantes de sedimentação tomadas para calcular as condições de centrifugação, as enzimas marcadoras distribuíram-se entre as frações subcelulares conforme o esperado (Fig. 4). Comparando nossos resultados com os obtidos por DeDuve et al (1955) verifica-se pequena discrepância na distribuição de proteína, mas isto se deve, provavelmente, ao fato de que aqueles autores avaliaram a concentração de proteína nas organelas através da dosagem de nitrogênio total e no presente trabalho a proteína foi determinada pelo método do azul de coomassie. Os resultados aqui obtidos e os de DeDuve caracterizam muito bem o fato de que os métodos de fracionamento subcelular permitem a obtenção de frações subcelulares enriquecidas, mas que ainda contêm alguma contaminação por fragmentos de outras membranas, não invalidando, contudo, os resultados obtidos. Assim, em nossos experimentos as enzimas marcadoras comportaram-se de acordo com os resultados de DeDuve. Com relação à distribuição das arilamidases os resultados sugerem a existência de três enzimas ou de três grupos de enzimas com atividade sobre AANA. A verdadeira

distribuição de qualquer delas depende do conhecimento de suas especificidades e também da possibilidade de serem ensaiadas de maneira independente. Por exemplo, tanto a metionina aminopeptidase como a alanina aminopeptidase descritas anteriormente (Freitas Jr. et al, 1981; Behal et al, 1966) reconhecem como substrato MetNA e AlaNA (embora com relações de atividade MetNA/AlaNA diferentes). Mesmo supondo-se que uma delas seja exclusivamente da mitocôndria pesada e que a outra seja exclusivamente da mitocôndria leve, estas duas frações teriam atividade sobre ambos substratos. Deste modo não seria possível concluir qual a real distribuição destas enzimas. Some-se a isto a possibilidade de que cada fração tenha não apenas uma das enzimas mas as duas, e em proporções diferentes, para concluir que, para conhecer a distribuição subcelular de arilamidases com especificidade para vários substratos distintos é necessário associar-se o conhecimento de outras propriedades aos dados de atividade.

A distribuição da atividade arilamidásica foi ligeiramente diferente da obtida anteriormente em outras condições de centrifugação (Freitas Jr. et al, 1981). Em relação às condições de centrifugação descritas naquele trabalho foram introduzidas várias modificações visando a obtenção de resultados mais representativos. Para evitar a autólise o fígado foi removido tão rapidamente quanto possível e imediatamente cortado, homogeneizado e iniciado o processo de centrifugação. Deste modo a etapa de exanguinação que era usada anteriormente foi suprimida. As velocidades e os tempos de centrifugação foram modificados tendo em vista os valores das constantes de sedimentação das organelas e a geometria dos rotores. Assim foi fundamental a calibração prévia de cada um dos sistemas centrífugas/rotores utilizados. Comparando com aqueles resultados o fracionamento obtido nas novas condições mostra que, em relação ao microsoma, as frações mitocôndria pesada e leve são mais ricas em atividade sobre MetNA, AlaNA e

Leu-NA. Mesmo assim nos dois sistemas de fracionamento mais de dois terços da atividade MetNAásica do fígado de rato foram encontrados nas frações particuladas.

As atividades sobre MetNA, AlaNA e LeuNA distribuíram-se principalmente entre as frações particuladas, mas com padrões de distribuição distintos (Fig. 4). A atividade LeuNAásica está mais associada à fração mitocôndria leve ao passo que as atividades MetNAásica e AlaNAásica estão associadas igualmente às frações mitocôndria pesada e mitocôndria leve e a atividade sobre as naftilamidas de aminoácidos básicos está localizada na fração solúvel. Estes resultados do fracionamento subcelular do fígado de rato sugerem a existência de arilamidases com diferentes especificidades: uma enzima com atividade maior ou exclusiva sobre ArgNA e LysNA que pertence à fração solúvel; uma, ou mais enzimas encontradas na mitocôndria leve e com alta atividade sobre LeuNA e ainda, por último, uma ou mais enzimas com ação sobre MetNA e AlaNA e presente na fração mitocôndria pesada.

A distribuição da atividade sobre LeuNA preferencialmente na fração mitocôndria leve é semelhante a encontrada em células HeLa (Lundgren e Roos, 1974). A fração mitocôndria + lisosoma destes autores, que é semelhante à nossa fração mitocôndria leve, também concentrou atividade LeuNAásica. No refracionamento da fração mitocôndria + lisosoma em gradiente de sacarose estes autores obtiveram atividade LeuNAásica associada à enzimas lisosomais. Este dado não concorda com resultados anteriores deste laboratório nos quais a fração lisosomal de fígado de rato apresentou-se livre de atividade arilamidásica (Freitas Jr. et al, 1981). A este propósito convém ressaltar que para Smith et al. (1965) a aminopeptidase (leucina aminopeptidase) que purificaram é de origem lisosomal. As condições de fracionamento que utilizaram não permitem que se obtenha uma fração enriqueci

da apenas em lisosoma. Na realidade a fração que obtiveram era formada por mitocôndria e lisosoma como a fração mitocôndria + lisosoma de Lundgren e Ross (1974) e semelhante à nossa fração mitocôndria leve. Hopsu e Ekfors (1969) também não detectaram atividade arilamidásica em lisosomas.

Em lisosomas preparados de animais tratados com Triton WR 1339 também foi encontrada a presença de atividade arilamidásica (Mahadevan e Tappel, 1967; Kaulen et al, 1970). Estes resultados, entretanto não podem ser tomados como definitivos pois, na análise de resultados obtidos com esta técnica não é possível deixar de considerar a possibilidade de que o detergente, antes de ser englobado pelos lisosomas, tenha interagido com outras frações de modo a levar proteínas de outras organelas à fração lisosomal.

A distribuição da atividade sobre ArgNA e a constatação de que somente a atividade ArgNAásica da fração solúvel é ativada pelo íon cloreto (Fig. 15) confirmam resultados anteriores que dão esta localização à arginina aminopeptidase (Mäkinen et al, 1970; Freitas Jr. et al, 1979; Freitas Jr. et al, 1981).

A atividade arilamidásica de diversos órgãos e tecidos do rato é geralmente mais alta quando o substrato é MetNA (Mäkinen e Raekalio, 1968; Freitas Jr. et al, 1981). Neste trabalho isto foi confirmado para o tecido hepático e em todas as frações particuladas as relações entre as velocidades de hidrólise de MetNA e a de qualquer das outras AANA sempre foi maior do que a relação inversa. A presença desta MetNAase particulada sugere que a enzima poderia estar envolvida em funções metabólicas das organelas.

MetNAase COMO ENZIMA DE MEMBRANA

A caracterização da MetNAase como enzima de membrana foi feita no próximo passo experimental. Com o tratamento com detergentes a solubilização da proteína e da enzima ocorreram paralelamente (Figs. 7 e 8). Este fato está de acordo com a hipótese de que a atividade MetNAásica deve-se à enzima ou enzimas ligadas à membrana. Caso ocorresse o contrário, isto é, se a atividade fosse devida à enzimas não ligadas à membrana, mas simplesmente a enzimas contidas na organela este paralelismo não ocorreria. Neste caso quando a concentração de detergente fosse apenas suficiente para provocar ruptura da membrana a atividade seria liberada completamente para o sobrenadante, o que não aconteceria com a maior parte da proteína ligada à membrana. A insensibilidade da atividade MetNAásica ao Triton X-100 é similar a da maioria das proteínas ligadas à membrana, pois usualmente este detergente não induz mudanças conformacionais que provoquem perda da atividade das proteínas (Helenius e Simons, 1975). Este comportamento inócuo do Triton X-100 foi confirmado para cada uma das frações subcelulares separadamente (Fig. 8). Tomando a fração microsoma observou-se ainda que a solubilização não modificou a velocidade inicial de hidrólise de AANA (Figs. 9 e 10). Conclui-se assim que o tratamento com Triton X-100 é um método seguro para obter arilamidases de frações do fígado de rato em forma solúvel. Para a solubilização da aminopeptidase de microvilosidades do intestino de suínos o detergente de escolha também é Triton X-100 (Maroux et al, 1973).

As quantidades de Triton X-100 utilizadas para obter a solubilização total da MetNAase (relação Triton X-100:proteína 1:5) está próxima das relações 1:4 e 1:7 utilizadas respectivamente por Helenius e Simons (1975) e Macnair e Kenny (1979) e sugeridas como necessárias à caracteriza

ção de enzimas de membrana. A ligação do Triton X-100 com proteínas se dá unicamente por meio de interações hidrofóbicas (Helenius e Simons, 1975). Diferentemente os detergentes iônicos interagem não só com regiões hidrofóbicas mas também com regiões hidrofílicas de proteínas. Isto poderia explicar o efeito de inativação da MetNAase observado com o SDS. Por outro lado o efeito protetor do Triton X-100 no que se refere à inativação por SDS (Fig. 11) pode ser reflexo da diferença no modo de interação dos detergentes com a proteína. Supondo-se que o sítio catalítico da enzima se localize em uma região hidrofóbica compreende-se porque o Triton X-100, que interage apenas com regiões hidrofóbicas não inativa a enzima. O SDS, ao contrário, que também pode interagir com regiões hidrofílicas, poderia estar modificando a região do centro catalítico da enzima. A proteção que o Triton X-100 confere à enzima no que diz respeito ao efeito inibitório do SDS (Fig. 11) pode ser explicada pelo aumento no tamanho da região hidrofóbica que ocorre quando a proteína passa a fazer parte de uma micela. Assim após a solubilização com Triton X-100 o SDS adicionado pode interagir não só com as regiões hidrofóbicas das proteínas presentes mas também com a porção hidrofóbica das micelas de Triton X-100.

A hipótese da localização do sítio catalítico numa região hidrofílica formando uma protuberância na membrana não é descabida. As aminopeptidases de microvilosidades de intestino de coelho bem como as de intestino e rim de suíno têm uma estrutura que segue este modelo (Andria et al, 1976; Louvard et al, 1976; Desnuelle, 1979; Benajiba e Maroux, 1981).

O emprego de enzimas proteolíticas para solubilização da atividade sobre MetNA resultou infrutífero. A ineficiência da tripsina em solubilizar arilamidases do microsoma (Tabela III) está de acordo com os resultados apresentados por Emmelot et al. (1968). Estes autores verificaram que o tratamento de membranas de fígado de rato com tripsina não provoca

qualquer perda na atividade LeuNAásica original. Após centrifugação a atividade sobre MetNA recuperada no sobrenadante do material tratado com a proteinase foi da mesma ordem daquela recuperada no sobrenadante de membranas tratadas apenas com tampão (Tabela III). Por outro lado arilamidases de rim de suíno (Wachsmut et al, 1966) e de intestino delgado de suíno e de coelho (Maroux et al, 1973; Andria et al, 1976; Ferracci e Maroux, 1980; Benajiba e Maroux, 1981) são susceptíveis à hidrólise por tripsina sem perda da atividade. Entretanto esta susceptibilidade foi verificada somente após purificação ou solubilização com detergentes. No método utilizado por Behal et al. (1966) para a obtenção da alanina aminopeptidase é necessário o emprego de autólise. Neste caso, contudo há perda de atividade aminopeptidásica.

De acordo com o modelo de estrutura de membrana proposto por Singer e Nicolson (1972) proteínas podem se ligar a membranas de duas maneiras distintas: a) por interações hidrofóbicas entre a proteína e as cadeias hidrocarbonadas dos lipídeos da membrana; e b) por interações eletrostáticas entre a proteína e proteínas já ligadas à membrana pelo primeiro mecanismo. Proteínas que estão ligadas à membrana pelo primeiro mecanismo são denominadas proteínas integrantes da membrana e proteínas ligadas pelo segundo sistema são denominadas proteínas periféricas. Proteínas periféricas são facilmente solubilizadas por tratamento da membrana com alta concentração salina (Singer e Nicolson, 1972). Como o tratamento com NaCl 0,5 M não solubilizou a atividade MetNAásica da membrana microsomal (Tabela IV) conclui-se que a enzima responsável por esta atividade é integrante da membrana, sugerindo mais uma vez que a MetNAase tem uma estrutura semelhante à proposta para as aminopeptidases de microvilosidades de intestino de coelho e intestino e rim de suíno (Desnuelle, 1979; Benajiba e Maroux, 1981).

SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MAP EM FRAÇÕES SUBCELULARES

A obtenção das atividades arilamidásicas de cada fração subcelular em forma solúvel permitiu que se continuassem os estudos visando determinar quais as enzimas presentes em cada uma destas frações. Para tal, o fracionamento em DEAE-celulose se impôs porque a eficácia do método na separação de arilamidases do fígado de rato já havia sido comprovada (Freitas Jr. et al, 1979; Termignoni, 1980; Freitas Jr., 1981). Os fracionamentos em DEAE-celulose foram realizados em presença de Triton X-100 sempre em concentrações superiores à concentração micelar crítica para evitar a diluição do detergente no tampão de eluição. Desta maneira a integridade das micelas formadas por detergente e por proteína pode ser preservada (Helenius et al, 1979).

As evidências obtidas com a análise da distribuição subcelular da atividade sobre MetNA, que inicialmente haviam sugerido a presença da metionina aminopeptidase nas frações mitocôndria pesada, mitocôndria leve e microsoma foram confirmadas através da separação de arilamidases em DEAE-celulose (Fig. 13). A presença da metionina aminopeptidase nas frações subcelulares particuladas foi confirmada por várias experiências: a) comportamento na cromatografia de troca iônica (Fig. 13 e Fig. 14); b) especificidade sobre derivados de aminoácidos (Tabela VI); c) parâmetros cinéticos (Fig. 16 e Tabela VII); d) dependência de grupo -SH (Fig. 18 e Tabela VIII). Os resultados destas experiências confirmaram que o homogenato do fígado de rato contém duas enzimas aparentemente distintas, ambas com atividade sobre MetNA: a primeira não adsorvida pela resina de DEAE-celulose a pH 7,0 e uma outra que é bem retida pela resina. Na incubação com substrato peptídico (MLBK) somente a enzima não adsorvida possui atividade aminopeptidásica (MAP) (Freitas Jr., 1981). Estudos comparativos mostra

ram que a verdadeira aminopeptidase hidrolisa preferencialmente metionina N-terminal. As propriedades da MAP permitem distinguí-la claramente de outras aminopeptidases verdadeiras, incluindo a alanina aminopeptidase que apresenta marcada atividade preferencial sobre AlaNA.

Quanto à multi-localização da MAP, os resultados mostram que as preparações de MAP de mitocôndria (pesada e leve) e de microsoma apresentam atividades relativas sobre derivados de aminoácidos muito semelhantes (Tabela VI). O refracionamento cromatográfico em DEAE-celulose (Fig. 13) reforçou também a conclusão de que a metionina aminopeptidase está presente nas três frações subcelulares.

Os valores de K_m MetNA também são semelhantes para as três preparações de metionina aminopeptidase. As variações entre o menor e o maior valor de K_m foi de apenas três vezes (7×10^{-5} a $22 \times 10^{-5}M$). Esta diferença pode ser devida às condições de solubilização empregadas. Por outro lado a grande dependência da atividade catalítica à presença de grupo -SH na forma reduzida é outra característica comum à enzima purificada do homogenato e às preparações obtidas das frações subcelulares particuladas. Tal dependência poderia também estar associada com a alta instabilidade apresentada pela enzima parcialmente purificada.

A maior atividade sobre AANA do que sobre AANH₂ e AApNA apresentada pela metionina aminopeptidase não é uma característica comum às outras aminopeptidases. A aminopeptidase de intestino de suíno (EC 3.4.11.2) tem um comportamento oposto pois hidroliza AApNA com maior velocidade do que AANA (Maroux et al, 1973). Por sua vez a aminopeptidase de mucosa intestinal de cobaio tem maior atividade sobre LeuNH₂ do que sobre LeupNA (Donlon e Fottrell, 1973).

A participação do radical que está ligado ao aminoácido com o grupo amino livre na especificidade das aminopeptidases parece também im

portante. Esta influência, constatada com a MAP, é verificada quando o substrato cromogênio é substituído por peptídeos. Ela foi também verificada com a aminopeptidase M (EC 3.4.11.2): a liberação de glicina de Gly-Leu desaparece quando o resíduo de leucina é substituído por glicina (George e Kenny, 1973). A metionina aminopeptidase obtida de fígado de rato por perfusão também hidrolizou com velocidades diferentes peptídeos que possuíam em comum apenas o resíduo de aminoácido N-terminal (Termignoni, 1980). A importância do resíduo de aminoácido que ocupa a posição 2 ficou também evidenciada em estudos de inibição de aminopeptidases por peptídeos (Fleischer et al, 1964).

A diferença de atividade sobre os substratos MetNA e LeuNA (Tabela VII) que a metionina aminopeptidase apresenta deve-se fundamentalmente à velocidade de hidrólise pois os valores de K_m para estes dois substratos são praticamente iguais. A enzima tem velocidade máxima sobre AlaNA maior do que sobre LeuNA, mas o K_m da enzima para AlaNA é cerca de 10 vezes maior do que aquele sobre LeuNA. Considerando-se os valores das relações V_m/K_m dos AANA, isto é, comparando-se a eficiência catalítica relativa da enzima, conclui-se novamente que o melhor substrato para a metionina aminopeptidase é MetNA.

Nos estudos pioneiros realizados por Emil L. Smith (Smith et al, 1955) sobre a participação de íons metálicos no mecanismo de catálise enzimática já havia sido demonstrado que a leucina aminopeptidase do rim de suíno (assim denominada porque o ensaio da atividade era feito com LeuNA) é uma metaloenzima. Posteriormente foi verificado que várias outras aminopeptidases também tinham a atividade catalítica dependente de cátions divalentes como Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} (Behal et al, 1966; Auricchio et al, 1972; Donlon e Fottrel, 1973) ou mesmo Cl^- (Hopsu et al, 1966b). Esta parece ser uma propriedade comum às aminopeptidases. A MAP, entretanto,

no que se refere a este particular apresenta-se como uma enzima bastante distinta das demais aminopeptidases. A insensibilidade da MAP ao tratamento com EDTA entretanto não é suficiente para caracterizá-la como tendo um mecanismo de catálise no qual não haja participação de metais pois algumas aminopeptidase possuem o cofator metálico tão fortemente ligado que este só pode ser removido em condições especiais de tratamento com EDTA (Schawbe, 1969; Sidorowicz et al, 1980), as quais não foram usadas neste trabalho.

HIDRÓLISE DE PEPTÍDEOS

A preferência da enzima para a hidrólise de ligação peptídica envolvendo metionina que foi observada com o uso de AANA também foi confirmada com os peptídeos MLBK e LBK. A diferença entre as velocidades de hidrólise dos resíduos de metionina e de lisina confirma que a conversão de MLBK à BK se dá por remoção sucessiva dos aminoácidos N-terminais (Terminoni, 1980; Freitas Jr. et al, 1981). A capacidade da MAP em converter cininas sugere, mas não é suficiente para provar a participação da enzima nos mecanismos de conversão de cininas. A ativação destes peptídeos vaso-ativos pode ser apenas uma atividade secundária da enzima. A localização intracelular da enzima não favorece esta hipótese, pois não parece razoável imaginar uma localização mitocondrial ou microsomal para uma enzima com esta função. Para este papel seria mais indicado uma enzima que fosse secretada ao meio extracelular ou então que se localiza-se na membrana celular.

A possibilidade de que a metionina aminopeptidase seja identificada como a enzima hipotética que participaria na síntese proteica removendo o resíduo de metionina iniciador não pode ser abandonada. Com efeito, a remoção de metionina de peptídeos nascentes de hemoglobina de coelho

pela MAP sugere que ela possa ter esta função. A não especificidade de espécie reforça ainda mais esta hipótese pois síntese protéica "in vitro" pode ser obtida em sistemas livres de células com mRNA, tRNA e enzimas obtidos de mais de uma espécie. A localização subcelular da MAP em organelas que sintetizam proteínas como microsoma e mitocôndria é também uma evidência compatível com o papel proposto para a enzima. A localização da MAP em ribosoma não é necessária para que ela seja capaz de remover a metionina iniciadora da cadeia pois nesta organela ocorrem apenas as etapas envolvidas na síntese da cadeia polipeptídica. As etapas que levam à maturação de proteínas não mitocondriais ocorrem no microsoma e no complexo de Golgi.

O aumento de uma enzima com preferência para a hidrólise de MetNA - talvez a própria metionina aminopeptidase - em tecido de cicatrização, isto é em tecido de alta taxa de síntese protéica (Mäkinen e Raekalio, 1968) é uma evidência não explorada pelos autores e compatível com o papel fisiológico proposto para a MAP.

Outros estudos, usando inibidores específicos, serão contudo necessários para se comprovar diretamente qualquer função da MAP na fase de processamento da cadeia polipeptídica nascente.

C O N C L U S Õ E S

1 - Fígado de rato contém uma aminopeptidase verdadeira, a metionina aminopeptidase (MAP) que tem alta especificidade para a hidrólise da ligação envolvendo a carboxila de resíduos de metionina que possuam o grupo amina livre.

2 - No fígado de rato a MAP localiza-se nas frações mitocôndria pesada, mitocôndria leve e microsoma.

3 - Cromatografia de troca iônica separa a MAP inequivocamente de outras arilamidases também presentes nestas organelas.

4 - A MAP é uma enzima ligada à membrana microsomal e mitocondrial e sua atividade catalítica depende de grupo -SH livre. Estas duas propriedades parecem importantes na determinação do alto grau de instabilidade que a enzima parcialmente purificada apresenta.

5 - A MAP pode ser removida da membrana com Triton X-100, mas não por detergentes aniônicos que a inativam.

6 - A MAP apresenta propriedades que a distingue das demais aminopeptidases descritas.

7 - A MAP é capaz de converter MLBK em BK.

8 - A liberação de metionina por ação da MAP sobre peptídeos nascentes de hemoglobina, se confirmada em outros modelos experimentais, poderá vir a reservar-lhe um papel importante na biossíntese de proteínas.

P E R S P E C T I V A S

As evidências que sugerem a participação da metionina aminopeptidase no mecanismo de síntese de proteínas indicam alguns caminhos para a continuação do estudo dessa nova enzima e de seu possível papel metabólico.

Seria desejável que os esforços visando à obtenção da MAP em forma estável e homogênea prosseguissem para que suas propriedades moleculares fossem estabelecidas. Entre estas propriedades a forma pela qual a enzima se liga à membrana parece ser uma das mais importantes. Para tal é necessário a fragmentação controlada da molécula por meio de proteases de modo a serem obtidos poucos peptídeos. A análise destes fragmentos viria estabelecer a validade da hipótese que divide a enzima em duas regiões: uma hidrofóbica e responsável por sua ligação à membrana e outra hidrofílica, provavelmente protuberante, que contém a região do sítio catalítico.

Os estudos do comportamento da enzima frente ao EDTA em função da temperatura e também o uso de outros quelantes poderia esclarecer definitivamente se a metionina aminopeptidase (como outras aminopeptidases) contém como cofator um cátion fortemente ligado, ou então se ela não é uma metalo-enzima.

Para estabelecer a participação da metionina aminopeptidase na síntese protéica esta hipótese deve ser submetida a novos testes. Um deles seria a verificação de que a MAP é capaz de remover a metionina

N-terminal de peptídeos nascentes de outras proteínas além da hemoglobina. Se bem que sistemas tão simples como o da síntese de proteína em reticulócitos não sejam facilmente disponíveis. Uma forma de contornar esta situação seria por meio de técnicas de síntese em sistemas livres de células com mRNA específico para diversas proteínas. O sistema hemoglobina, entretanto, ainda não foi esgotado. Dada a pouca quantidade de peptídeos nascentes que se obtém com este modelo, o emprego de peptídeos sintéticos de vários tamanhos e com a sequência N-terminal da hemoglobina poderia ser utilizado vantajosamente como substrato. Desta maneira poderia ficar estabelecido, por exemplo, em que etapa da elongação a metionina iniciadora da cadeia polipeptídica é removida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andria, G.; Marzi, A. e Auricchio, S. α -gluamyl- β -naphthylamide hydrolase of rabbit small intestine. Localization in the brush border and separation from other brush border peptidases. Biochim. Biophys. Acta 419: 42-50, 1976.
- Araújo, P.S.; Mieis, V. e Miranda, O. Subcellular distribution of low- and high-molecular weight acid phosphatases. Biochim. Biophys. Acta 452: 121-130, 1976.
- Ashton, F.M. e Dahmen, W.J. A partial purification and characterization of two amino peptidases from *Curcubita maxima* cotyledons. Phytochemistry 6: 641-643, 1967.
- Auricchio, S.; Pierro, M.; Andria, G. e Ritis, G. Enzymatic activities of the brush border membrane of rat intestine hydrolyzing β -naphthylamides of amino acids, leucineamide and dipeptides. Biochim. Biophys. Acta 274: 420-425, 1972.
- Barret, A.J. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. Anal. Biochem. 47: 280-297, 1972.
- Barret, A.J. Introduction to the history and classification of tissue proteinases. In: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barret, ed.), Elsevier, Amsterdam, 1977, pp. 1-53.

- Barrett, A.J. The many forms and functions of cellular proteinases. Fed. Proc. 39: 9-14, 1980.
- Bauer, J.D. Numerical evaluation of formed elements of blood. In: Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis (A.C. Sonnewirth e L. Jarett, ed.), 8ª edição, C.V. Mosby, St. Louis, 1980, pg 806.
- Behal, F.J.; Klein, R.A. e Dawson, F.B. Separation and characterization of aminopeptidase and arylamidase components of human liver. Arch. Biochem. Biophys. 115: 545-554, 1966.
- Behal, F.J.; Little, G. e Klein, R.A. Arylamidase of human liver. Biochim. Biophys. Acta 178: 118-127, 1969.
- Benajiba, A. e Maroux, S. Purification and characterization of an aminopeptidase A from hog intestinal brush-border membrane. Eur. J. Biochem. 107: 381-388, 1980.
- Benajiba, A. e Maroux, S. Subunit structure of pig small-intestinal brush-border aminopeptidase N. Biochem. J. 197: 573-580, 1981.
- Bergmeyer, H.U. Neue Werte für die molaren Extinktion-Koeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13: 507-508, 1975.
- Borges, D.R.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Characterization of a kinin-converting arylaminopeptidase from human liver. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281: 403-414, 1974.
- Brandi, C.M.W.; Prado, E.S.; Prado, M.J.A. e Prado, J.L. Kinin-converting aminopeptidase from human urine. Partial purification and properties. Int. J. Biochem. 7: 335-341, 1976.
- Camargo, A.C.M.; Ramalho-Pinto, F.J. e Greene, L.J. Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones. J. Neurochem. 19: 37-49,

- 1972.
- Chambers, J.A.A. e Rickwood, D. Fractionation of subcellular organelles by differential centrifugation. In: Centrifugation: a practical approach (D. Rickwood, ed.). Information Retrieval, London, 1978, pg 33-46.
- Chaney, A.L. e Marbach, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8: 130-132, 1962.
- Coletti-Previero, M.-A.; Mattras, H.; Descomps, B. e Previero, A. Purification and substrate characterization of a human enkephalin-degrading aminopeptidase. Biochim. Biophys. Acta 657: 122-127, 1981.
- DeDuve, C. e Berthet, J. Reproducibility of differential centrifugation experiments in tissue fractionation. Nature 172: 1142, 1953.
- DeDuve, C.; Pressman, B.C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R. e Appelmans, F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochem. J. 60: 604-617, 1955.
- Desnuelle, P. Intestinal and renal aminopeptidase: a model of a transmembrane protein. Eur. J. Biochem. 101: 1-11, 1979.
- De Wied, D.; Kovács, G.L.; Bohus, B.; van Ree, J.M. e Greven, H.M. Neuroleptic activity of the neuropeptide BLPH₆₂₋₇₇ ({{Des-Tyr¹}} γ -endorphin; DTyE). Eur. J. Pharmacol. 49: 427-436, 1978.
- Dixon, M. The determination of enzyme inhibitors constants. Biochem. J. 55: 170-171, 1953.
- Donlon, J. e Fottrell, P.F. Purification and characterization of one of the forms of peptide hydrolases from guinea-pig small intestinal mucosa. Biochim. Biophys. Acta 327: 425-436, 1973.
- Emmelot, A.; Visser, A. e Benedetti, E.L. Studies on plasma membranes. VII A leucil- β -naphthylamide containing repeating unit on the surface

- of isolated liver and hepatoma plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta 150: 364-375, 1968.
- Erdős, E.G.; Renfrew, A.G.; Sloane, E.M. e Wohler, J.R. Enzymatic studies on bradykinin and similar peptides. Annals New York Acad. Sci. 104:222-235, 1963.
- Erlanger, B.F.; Kokowsky, N. e Cohen, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Arch. Biochim. Biophys. 95: 271-278, 1961.
- Ferracci, H. e Maroux, S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. Biochim. Biophys. Acta 599:448-463, 1980.
- Ferreira, C. e Terra, W.R. Properties of arylamidases found in cytosol, microvilli and luminal contents of *Rhynchosciara americana* midgut caeca. Insect. Biochem. 12: 413-417, 1982.
- Fields, R. The measurement of amino groups in proteins and peptides. Biochem. J. 124: 581-590, 1971.
- Fleisher, G.A.; Pankow, M. e Warmaka, C. Leucine aminopeptidase in human serum: comparison of hydrolysis of L-leucylglycine and L-leucyl- β -naphthylamide. Clinica Chim. Acta 9: 259-268, 1964.
- Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. Two arylamidases from human liver and their kinin-converting activity. Int. J. Biochem. 10: 81-89, 1979.
- Freitas Jr., J.O.; Termignoni, C.; Borges, D.R.; Sampaio, C.A.M.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Methionine aminopeptidase associated with liver mitochondria and microsomes. Int. J. Biochem. 13: 991-997, 1981.
- Freitas Jr., J.O. Distribuição de arilamidases em tecidos de vertebrados, localização subcelular e purificação das enzimas do fígado de rato com

- a caracterização de uma arilaminopeptidase. Tese, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1981.
- Garcia, E.S. e Guimarães, J.A. Proteolytic enzymes in the *Rhodnius prolixus* midgut. Experientia 35: 305-306, 1979.
- George, J.G. e Kenny, A.J. Studies on the enzymology of purified preparations of brush border from rabbit kidney. Biochem. J. 134: 43-57, 1973.
- Goldenberg, H. e Fernandez, A. Simplified method for the estimation of inorganic phosphorus in body fluids. Clin. Chem. 12: 817-882, 1966.
- Gomori, G. Chromogenic substrates for aminopeptidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87: 559-561, 1954.
- Gorvel, J.P.; Benajiba, A. e Maroux, S. Purification and characterization of the rabbit intestinal brush-border aminopeptidase A. Biochim. Biophys. Acta 615: 271-274, 1980.
- Green, M.N.; Tsou, K.-C.; Bressler, R. e Seligman, A.M. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with L-leucyl- β -naphthylamide hydrochloride. Arch. Biochem. Biophys. 57:459-474, 1955.
- Guimarães, J.A.; Prado, E.S. e Prado, J.L. Plasma aminopeptidase capable of converting kallidin (L-lysine-bradykinin) to bradykinin and plasma L-lysyl- β -naphthylamidase. An. Acad. bras. Ciênc. 43: 834, 1971.
- Guimarães, J.A. Enzima cinino-conversora do soro humano. Preparação e propriedades. Tese, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1972.
- Guimarães, J.A.; Borges, D.R.; Prado, E.S. e Prado, J.L. Kinin converting aminopeptidase from human serum. Biochem. Pharmacol. 22:3157-3172, 1973
- Hambrook, J.M.; Morgan, B.A.; Rance, M.J. e Smith, C.F.C. Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homoge-

- nates. Nature 262: 782-783, 1976.
- Hayashi, M. e Oshima, K. Purification and properties of oxytocinase (cysteine aminopeptidase) from monkey placenta. J. Biochem. 80:389-396, 1976.
- Helenius, A. e Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. Biochim. Biophys. Acta 415: 29-79, 1975.
- Helenius, A.; McCaslin, D.R.; Fries, E. e Tanford, C. Properties of detergents. In: Methods in Enzymology (S.P. Colowick e N.O. Kaplan, ed.) Academic Press, New York, vol. 56, 1979, pg 734-749.
- Hersh, L.B.; Smith, T.E. e McKelvy, J.F. Cleavage of endorphins to des-Tyr endorphins by homogeneous bovine brain aminopeptidase. Nature 286: 160-162, 1980.
- Hopsu-Havu, V.K.; Mäkinen, K.K. e Glenner, G.G. Formation of bradykinin from kallidin-10 by aminopeptidase B. Nature 212: 1271-1272, 1966a.
- Hopsu, V.K.; Mäkinen, K.K. e Glenner, G.G. Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and effector studies. Arch. Biochem. Biophys. 114: 567-575, 1966b.
- Hopsu-Havu, V.K. e Ekfors, T.O. Distribution of a depeptide naphthylamidase in rat tissues and its localization by using diazo coupling and labeled antibody techniques. Histochemie 17: 30-38, 1969.
- Housman, D.; Jacobs-Lorena, M.; Rajbhandary, U.L. e Lodish, H.F. Initiation of haemoglobin synthesis by methionyl-tRNA. Nature 227: 913-918, 1970.
- Hovsepian, S.; Ferracci, H.; Maroux, S. e Fayet, G. Kinetic studies of the localization of aminopeptidase N in monolayer and in follicle-associated cultures of porcine thyroid cells. Cell Tissue Res. 224:601-611, 1982.

- International Union of Biochemistry Enzyme nomenclature, Academic Press, New York, 1979, pg. 301-305.
- Jackson, R. e Hunter, T. Role of methionine in the initiation of haemoglobin synthesis. Nature 227: 672-676, 1970.
- Kaulen, H.D.; Henning, R. e Stoffel, W. Biochemical analysis of the pinocytotic process. II comparison of some enzymes of the lysosomal and the plasma membrane of the rat liver cell. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 351: 1555-1563, 1970.
- Kawata, S.; Takayama, S.; Ninomiya, K. e Makisumi, S. Porcine liver aminopeptidase B. Substrate specificity and inhibition by amino acids. J. Biochem. 88: 1601-1605, 1980.
- Kenny, A.J. Proteinases associated with cell membranes. In: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barrett, ed.). Elsevier, Amsterdam, 1977, pg. 393-444.
- Kerwar, S.S.; Weissbach, H. e Glenner, G.G. An aminopeptidase activity associated with brain ribosomes. Arch. Biochem. Biophys. 143: 336-337, 1971.
- Kinght, M. e Klee, W.A. The relationship between enkephalin degradation and opiate receptor occupancy. J. Biol. Chem. 253: 3843-3847, 1978.
- Kobuku, T.; Akutsu, H.; Fuginoto, S.; Ueda, E.; Hiwada, K. e Yamanura, Y. Purification and properties of endopeptidase from rabbit red cells and its process of degradation of angiotensin. Biochim. Biophys. Acta 191: 668-676, 1969.
- Koida, M.; Glass, J.D.; Schwartz, I.L. e Walter, R. Mechanism of inactivation of oxytocin by rat kidney enzymes. Endocrinology 88:633-643,1971

- Ledeme, A.; Hennon, G.; Vincent-Fiquet, O. e Plaquet, R. Purification and enzymatic properties of an L-leucine aminopeptidase from swine liver. Biochim. Biophys. Acta 660: 262-270, 1981.
- Lee, C.C.T. e Merkel, J.R. Selective release and purification of two periplasmic alteromonas B-207 aminopeptidases. Biochim. Biophys. Acta 661: 39-44, 1981.
- Lehky, P.; Lisowski, J.; Wolf, D.P.; Wacker, H. e Stein, E.A. Pig kidney particulate aminopeptidase a zinc metalloenzyme. Biochim. Biophys. Acta 321: 274-281, 1973.
- Leighton, F.; Poole, B.; Beaufay, H.; Baudhuin, P.; Coffey, J.W.; Fowler, S. e De Duve, C. The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339. J. Cell Biol. 37: 482-513, 1968.
- Linderstrømng-Lang, K. Über Darmerepsin. Hoppe-Seyler's Z. Phys. Chem. 182: 151-174, 1929.
- Louvard, D.; Semeriva, M. e Maroux, S. The brush-border intestinal aminopeptidase, a transmembrane protein as probed by macromolecular photolabeling. J. Mol. Biol. 106: 1023-1035, 1976.
- Louvard, D. Apical membrane aminopeptidase appears at site of cell-cell contact in cultured kidney epithelial cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4132-4136, 1980.
- Lundgren, E. e Ross, G. Plasma membrane-bound and lysosomal isozymes of amino acid naphthylamidase. Biochim. Biophys. Acta 358: 208-218, 1974.
- Macnair, R.D.C. e Kenny, A.J. Proteins of the kidney microvillar membrane. The amphipathic form of dipeptidyl peptidase IV. Biochem. J. 179:

379-395, 1979.

- Mahadevan, S. e Tappel, A.L. Arylamidases of rat liver and kidney. J. Biol. Chem. 242: 2369-2374, 1967.
- Mäkinen, P.L. e Raekallio, J. Purification and properties of an arylaminopeptidase of rat wound tissue, acting chiefly on the 2-naphthylamides of L-methionine and L-valine. Acta Chem. Scand. 22:3111-3119, 1968.
- Mäkinen, P.L.; Raekallio, J. e Mäkinen, K.K. On the localization of aminopeptidase B and separation of its two molecular forms by automated recycling chromatography. Acta Chem. Scand. 24: 1101-1102, 1970.
- Mäkinen, K.K. e Mäkinen, P.L. Effect of sodium chloride on substrate constant and maximum velocity in the enzymes hydrolysis of N-L-aminoacyl-2-naphthylamides and N-L-aminoacyl-p-nitroanilines. Acta Chem. Scand. 25: 969-975, 1971.
- Marcker, K.A. e Smith, A.E. On the universality of the mechanism of polypeptide chain initiation. Bull Soc. Chim. Biol. 51:1453-1458, 1969.
- Marks, N.; Datta, R.K. e Lajtha, A. Parital resolution of brain arylamidase and aminopeptidase. J. Biol. Chem. 243: 2882-2889, 1968.
- Maroux, S.; Louvard, D. e Baratti, J. The aminopeptidase from hog intestinal brush border. Biochim. Biophys. Acta 321: 282-295, 1973.
- Matheson, A.T. e Tattrie, B.L. A modified Yemm and Coking ninhydrin reagent for peptidase assay. Canadian J. Biochem. 24: 95-103, 1964.
- McDonald, J.K. e Schwabe, C. Intracellular exopeptidases. In: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barrett, ed.). Elsevier, Amsterdam, 1977, pg 311-391.

- Meizel, S. e Cotham, J. Partial characterization of a new bull sperm a-rylamidase. J. Reprod. Fert. 28: 303-307, 1972.
- Neill, S.D. e Ball, H.J. Aminopeptidase activity of *Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma dispar* and *Mycoplasma bovis*. J. Gen. Microbiol. 119: 103-107, 1980.
- Ninomiya, K.; Tanaka, S.; Kawata, S. e Makisumi, S. Purification and properties of an aminopeptidase from seeds of japanese apricot. J. Biochem. 89: 193-201, 1981.
- Ono, T.; Eto, L. e Arakawa, K. Origin of urinary enzymes hydrolysing β -naphthylamides of L-leucine and L-glutamic acid. Clin. Chim. Acta 19: 257-263, 1968.
- Paiva, A.C.M. e Paiva, T.B. The importance of the N-terminal end of angiotensin II for its pressor and oxytocic activities. Biochem. Pharmacol. 5: 187-191, 1960.
- Parsons, M.E.; Godwin, K.O. e Pennington, J.T. Further studies on aminopeptidases of rat muscle. Int. J. Biochem. 10: 217-221, 1979.
- Patterson, E.K.; Hsiao, S. e Keppel, A. Studies on dipeptidases and aminopeptidases. I. distinction between leucine aminopeptidase and enzymes that hydrolyze L-leucil- β -naphthylamide. J. Biol. Chem. 238: 3611-3620, 1963.
- Prado, E.S.; Webster, M.E. e Prado, J.L. Aminopeptidase no plasma equino que converte calidina para bradicinina. Ciênc. Cult. 21: 537, 1969.
- Rossier, J. e Chapouthier, G. Enkephalines et endorphines: les opius du cerveau. Recherche 138: 1296-1306, 1982.
- Ruffin, P.; van Brussel, E.; Bigoet, J. e Biserte, G. Caractérisation

- partielle de deux aminopeptidases (arylamidases) extracellulaires du dermatophyte *Keratinomyces ajelloi*. Biochimie 61: 495-500, 1979.
- Schechter, I. e Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. Biochem. Biophys. Res. Comm. 27: 157-162, 1967.
- Schimke, R.T. e Bradley, M.O. Properties of protein turnover in animal cells and a possible role for turnover in "quality" control of proteins. In: Proteases and Biological Control (E. Reich, D.B. Rifkin e E. Shaw, ed.) CSH, 1975, pg 515-530.
- Schnebli, H.P.; Phillipps, M.A. e Barclay, R.K. Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain. Biochim. Biophys. Acta 569: 89-98, 1979.
- Schröder, E. Structure-activity relationships of kinin. In: Handbook of Experimental Pharmacology (E.G. Erdös, ed.), Springer-Verlag, Berlin, 1970, vol. 25, pg 324.
- Schwabe, C. Peptide hydrolases in mammalian connective tissue. I. Survey of activities and preliminary characterization of certain peptides. Biochemistry 8: 771-782, 1969.
- Sidorowicz, W.; Jackson, G.G. e Behal, F.J. Multiple molecular forms of human pancreas alanine aminopeptidase. Clin. Chim. Acta 104: 169-179, 1980.
- Sidorowicz, W.; Zownir, O. e Behal, F.J. Action of human pancreas alanine aminopeptidase on biologically active peptides: kinin converting activity. Clin. Chim. Acta 111: 69-79, 1981.
- Simmons, W.H. e Brecher, A.S. Inactivation of melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor by a manganese-stimulated bovine brain

- aminopeptidase. J. Biol. Chem. 248: 5780-5784, 1973.
- Singer, S.J. e Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731, 1972.
- Sjöholm, I. e Yman, L. Preparation of highly purified oxytocinase (cystine aminopeptidase) from retroplacental serum. Acta Pharm. Suécica 3: 377-388, 1966.
- Sjöholm, I. e Yman, L. Degradation of oxytocin, lysine-vasopressin, angiotensin II and angiotensin-II-amide by oxytocinase (cystine aminopeptidase). Acta Pharm. Suécica 4: 65-76, 1967.
- Smith, E.E.; Kaufman, J.T. e Rutenburg, A.M. The partial purification of an amino acid naphthylamidase from human liver. J. Biol. Chem. 240: 1718-1721, 1965.
- Smith, E.L. e Spackman, D.H. Leucine aminopeptidase V. Activation, specificity and mechanism of action. J. Biol. Chem. 212: 271-299, 1955.
- Spackman, D.H.; Stein, W.R. e Moore, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30: 1190-1206, 1958.
- Spector, T. Refinement of the coomassie blue method of proteins quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for $\leq 0,5$ to 50 mg of protein. Anal. Biochem. 86: 142-146, 1978.
- Stanes, W.L.; Szechinski, J. e Behal, F.J. Human-liver alanine aminopeptidase. A kinin-converting enzyme sensitive to β -lactam antibiotics. Eur. J. Biochem. 124: 363-370, 1982.
- Termignoni, C.; Carlini, C.; Guimarães, J.A. e Prado, J.L. *Canavalia en*

- siformis*, a rich source of aminopeptidase. Ciênc. Cult. 30(supl.):613, 1978.
- Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. Methionyl aminopeptidase from rat liver. Annais Acad. brasil. Ciênc. 51: 770, 1979.
- Termignoni, C. Perfusão do fígado de rato com Triton X-100: remoção e caracterização de uma aminopeptidase cinino-conversora e de uma arilamida-se. Tese, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1980.
- Tuppy, H.C. e Nesvadba, H. Über die Aminopeptidaseaktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren. Monatsh. Chem. 88: 977-988, 1957.
- Umezawa, H.; Aoyagi, T.; Suda, H.; Hamada, M. e Takeuchi, T. Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. J. Antibiotics 29: 97-99, 1976.
- Umezawa, H. e Aoyagi, T. Activites of proteinase inhibitors of microbial origin. In: Proteinases in mammalian cells and tissues (A.J. Barrett, ed.), Elsevier, Amsterdam, 1977, pg 637-662.
- Wachsmuth, E.D.; Fritze, I. e Pfeleiderer, G. An aminopeptidase occurring in pig kidney. I. An improved method of preparation. Physical and enzymatic properties. Biochemistry 5: 169-174, 1966.
- Wacker, H. The role of carbohydrate moieties in the activity and properties of aminopeptidase from pig kidney. Biochim. Biophys. Acta 334: 417-422, 1974.
- Wagner, F.W.; Ray, L.E.; Ajabnoor, M.A.; Ziemba, P.E. e Hall, R.L. *Bacillus subtilis* aminopeptidase: purification, characterization and some

- enzymatic properties. Arch. Biochem. Biophys. 197: 63-72, 1979.
- Wagner, G.W. e Dixon, J.E. Inhibitors of rat brain enkephalin aminopeptidase. J. Neurochem. 37: 709-713, 1981.
- Webster, M.E. e Pierce, J.V. The nature of the kallidins released from human plasma by kallikreins and other enzymes. Annals New York Acad. Sci. 104: 91-197, 1963.
- Webster, M.E. e Prado, E.S. Glandular kallikrein from horse and human urine and from hog pancreas. In: Methods in Enzymology (S.P. Colowick e N.O. Kaplan, ed.). Academic Press, New York, vol. 19, 1970, pg 681-699
- Wigle, D.T. e Dixon, G.H. Transient incorporation of methionine at the N-terminus of protamine newly synthesized in trout testis cells. Nature 227: 676-680, 1970.
- Wilkinson, G.N. Statistical estimation in enzyme kinetics. Biochem. J. 80: 324-332, 1961.
- Wilson, D.B. e Dintzis, H.M. Protein chain initiation in rabbit reticulocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66: 1282-1289, 1970.
- Yoshida, A.; Watanabe, S. e Morris, J. Initiation of rabbit haemoglobin synthesis: methionine and formylmethionine at the N-terminal. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67: 1600-1607, 1970.
- Yoshida, A. e Lin, M. NH₂-terminal formylmethionine- and NH₂-terminal methionine-cleaving enzymes in rabbits. J. Biol. Chem. 247: 952 - 957, 1972.

Apêndice

Parte desta tese está relacionada ou constitui objeto dos seguintes trabalhos e comunicações:

A) TRABALHOS

Freitas Jr., J.O.; Termignoni, C.; Borges, D.R.; Sampaio, C.A.M.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Methionine aminopeptidase associated with liver mitochondria and microsomes. Int. J. Biochem. 13:991-997, 1981

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Localization and characterization of liver methionine aminopeptidase. Arch. Biochem. Biophys. (submetido)

Freitas Jr., J.O.; Termignoni, C.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Mitochondrial methionine aminopeptidase. Properties of the solubilized enzyme. Biochim. Biophys. Acta (submetido)

B) COMUNICAÇÕES

Termignoni, C.; Carlini, C.; Guimarães, J.A. e Prado, J.L. *Canavalia ensiformis*, a rich source of aminopeptidase. Ciênc. Cult. 30(supl.) 613, 1978.

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. Methionyl aminopeptidase from rat liver. An. Acad. brasil.

Ciênc. 51: 770, 1979.

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. Further characterization of methionyl aminopeptidase from rat liver. Arq. Biol. Tecnol. 23: 182, 1980.

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Borges, D.R.; Sampaio, C.A.M.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Methionine aminopeptidase removed from rat liver by perfusion with Triton X-100. Arq. Biol. Tecnol. 24: 105, 1981.

Freitas Jr., J.O.; Termignoni, C.; Sampaio, C.A.M.; Borges, D.R.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Properties of three arylaminopeptidases from rat liver. Arq. Biol. Tecnol. 24: 105, 1981.

Freitas Jr., J.O.; Termignoni, C.; Borges, D.R.; Prado, J.L. e Guimarães, J.L. Rat liver arylaminopeptidases: their distinction by subcelular distribution plus susceptibility to activators. Arq. Biol. Tecnol. 25: 121, 1982.

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Borges, D.R.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. Properties of microsomal methionine aminopeptidase, a membrane-bound enzyme. Arq. Biol. Tecnol. 25: 133, 1982.