
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

ANNASTELLA GAMBINI, PAOLO CROSTI, PAOLO
TORTORA, GIOVANNI LUCCHINI, RENATO BIANCHETTI

**Proprietà e possibile ruolo regolativo della
N¹⁰—formil—tetraidrofolato: metionil-tRNA
transformilasi in *Euglena gracilis***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 57 (1974), n.3-4, p.
259-267.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1974_8_57_3-4_259_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia vegetale. — *Proprietà e possibile ruolo regolativo della N¹⁰-formil-tetraidrofolato: metionil-tRNA transformilasi in Euglena gracilis* (*). Nota di ANNASTELLA GAMBINI, PAOLO CROSTI, PAOLO TORTORA, GIOVANNI LUCCHINI e RENATO BIANCHETTI, presentata (**) dal Corrisp. E. MARRÈ.

SUMMARY. — The properties of N¹⁰-formyl-tetrahydrofolate: methionyl-tRNA transformylase from *Euglena gracilis* were studied and compared with those of the *E. coli* enzyme.

The *Euglena* enzyme, functioning in formylation of met-tRNA initiator of organellar protein synthesis, shows a partial requirement of Mg⁺⁺, with an optimum of 5 mM, stimulation by K⁺, Km for N¹⁰-formyl-THFA 2.5×10^{-6} M.

These properties are different from those of the bacterial enzyme. For example the affinity for the substrate N¹⁰-formyl-THFA is significantly higher and the apparent Michaelis constant is more than five times lower.

However the more significant difference comes from the finding that *Euglena* enzyme shows multiple molecular weights.

This polymeric structure is probably accompanied by a regulatory role of this enzyme in protein synthesis initiation.

INTRODUZIONE

Come noto, in entrambi i due sistemi di sintesi proteica identificati, e cioè quello di tipo procariotico (batterico) e quello di tipo eucariotico (citoplasmatico), il meccanismo di inizio della sintesi proteica richiede, tra l'altro, la presenza di uno specifico tRNA iniziatore, il metionil-tRNA_F, utilizzato solo nella reazione di inizio e non per l'inserimento della metionina nelle posizioni interne della catena polipeptidica in via di formazione.

In realtà, proprio per quanto riguarda il loro meccanismo di inizio, i due sistemi di sintesi proteica mostrano delle differenze significative: in quello di tipo procariotico il met-tRNA specifico per l'inizio non solo è riconoscibile perché la metionina da esso portata è sempre suscettibile di essere formilata a formil-metionina, ma anche perché la forma formilata è l'unica realmente operante; mentre al contrario, in quello di tipo eucariotico, lo specifico met-tRNA iniziatore lavora solo nella forma non formilata e, in alcuni casi, non è nemmeno formilabile.

Nei batteri la reazione di trasformilazione del met-tRNA iniziatore è considerata punto di regolazione sia della sintesi proteica sia di quella dell'RNA [1, 2, 3].

(*) Istituto di Scienze Botaniche. Centro di Studio del C.N.R. per la Biologia Cellulare e Molecolare delle Piante, Milano (Italia).

(**) Nella seduta del 28 maggio 1974.

Mitocondri e cloroplasti sono dotati di un apparato di sintesi proteica che presenta, in genere, somiglianze più strette con quello di tipo procariotico piuttosto che con quello del citoplasma che li accoglie, e questa caratteristica appare estesa anche al meccanismo di inizio.

Infatti in mitocondri e cloroplasti è stata dapprima dimostrata la presenza di formil-met-tRNA [4, 5], successivamente la sua operatività nell'inizio della sintesi delle catene polipeptidiche [6], ed infine un'ulteriore indagine ha portato a concludere che la forma formilata di esso è la sola realmente operante in condizioni fisiologiche [7].

In cellule eucariotiche, pertanto, i due diversi meccanismi di inizio sono, sia pure spazialmente separati, contemporaneamente presenti ed operanti.

Questa serie di considerazioni sono sostanzialmente alla base di una ipotesi che vede nella diversità dei due meccanismi di inizio la possibilità di una coordinazione regolativa tra le diverse componenti cellulari [8].

Un primo approccio a questo tema può essere costituito da una indagine volta a determinare le proprietà del sistema operante la « reazione di transformilazione » sul tRNA iniziatore in organelli cellulari quali mitocondri e cloroplasti.

Questa Nota riporta alcune ricerche circa la presenza e le proprietà della transformilasi eucariotica in *Euglena*, cioè dell'enzima che, nel mitocondrio e nel cloroplasto, catalizza la reazione di formilazione del met-tRNA_F, portando così da una forma inattiva ad una forma attiva nella reazione di inizio della sintesi delle catene polipeptidiche operata negli organelli cellulari.

MATERIALI E METODI

Estrazione degli enzimi da Euglena.

Cellule di *Euglena gracilis* (ceppo Z), coltivate in terreno di Cramer e Myers, sono state raccolte in fase logaritmica di crescita (5×10^5 cellule/ml), lavate e rotte mediante French press a 5.000 psi in tampone TRIS-HCl 50 mM pH 7; Mg⁺⁺ 10 mM; mercaptoetanolo 10 mM; glicerolo 10%; EDTA 1 mM.

L'omogenato è stato separato a 30.000 × g per 15 minuti e il sovrantante ottenuto centrifugato a sua volta a 100.000 × g per due ore: a questa frazione ci si riferisce nel testo con l'indicazione di grezzo.

Un'ulteriore purificazione è stata ottenuta con l'uso di colonne di dietilaminoetil-cellulosa e di carbossimetil-Sephadex.

Estrazione dei tRNA da Euglena.

50 g di cellule di *Euglena*, gelate a -80°C, sono state sgelate e risospese in 100 ml di: TRIS-HCl 10 mM pH 7,4; Mg⁺⁺ 5 mM; NaCl 100 mM; sodio-laurilsolfato 1%.

L'RNA è stato estratto con il metodo del fenolo ed il tRNA separato mediante salatura in NaCl 1,5 M e DEAE cellulosa e successivamente dea-

cilato: tutti questi procedimenti sono stati eseguiti secondo il metodo di Holley modificato da Allende [9].

Preparazione del ^3H -met-tRNA.

La reazione catalizzata dagli enzimi attivanti (estratti da Euglena) è stata fatta avvenire a 30°C in presenza di: Hepes 50 mM pH 7,5; EDTA 0,5 mM; mercaptoetanolo 20 mM; Mg^{++} 20 mM; K^+ 20 mM; ATP 6 mM; fosfoenolpiruvato 6 mM; miokinasi 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$; piruvicokinasi 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$; siero albumina bovina 133 $\mu\text{g}/\text{ml}$; ^3H -metionina 5 μM , attività specifica 500 mCu/mmole; tRNA 40 O.D./ml ed enzima 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [10].

La reazione è stata seguita eseguendo prelievi nel tempo; raggiunta, dopo circa un'ora, la quota massima di ^3H -metionil-tRNA, è stato aggiunto all'incubato acetato di potassio (2% finale) a pH 5 e si è caricato il tutto su una colonna di DEAE cellulosa (cm. $1,5 \times 7$) equilibrata con acetato di potassio 0,1 M pH 5 e KCl 0,2 M [11].

Dopo aver lavato circa dieci volte la colonna si sono eluiti i ^3H -met-tRNA portando a 1 M il KCl. Si è precipitato con etanolo a -20°C , si sono dializzati i sali presenti e si è liofilizzato.

Preparazione dell' N^{10} -formil-tetraidrofolico.

Da *Lactobacillus casei*, cresciuto su terreno di De Man-Sharpe [12] è stato estratto, secondo il metodo di Lansford [13] l'enzima che catalizza la formazione dell' N^{10} -formil-THF a partire da acido tetraidrofolico, ATP e ^{14}C -acido formico (attività specifica: 55 mCu/mmole).

Il prodotto finale ^{14}C - N^{10} -formil-THF è stato ottenuto con la seguente miscela di reazione: glicil-glicina 40 mM pH 7,5; formato 3 mM; ATP 6 mM; THF (*d + l*) 8 mM; Mg^{++} 20 mM; NH_4^+ 10 mM; enzima 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [14].

Il prodotto della reazione è stato in seguito purificato su colonna di DEAE-cellulosa secondo il metodo di Ho [15].

Test per trasformilasi.

La reazione di transformilazione è stata fatta avvenire, salvo casi specifici indicati nel testo, in presenza di: Hepes 50 mM pH 7,5; EDTA 0,25 mM; mercaptoetanolo 40 mM; Mg^{++} 4 mM; K^+ 20 mM.

I substrati vengono forniti nelle seguenti quantità per un incubato di 1 ml finale: ^3H -met-tRNA_F 19 μmol ; ^{14}C - N^{10} -formil-THF 10 μmol ; e l'enzima da 60 μg a 1 mg di proteine a seconda dello stadio di purificazione.

La reazione è stata bloccata con fenolo e l'RNA contenuto nella fase acquosa precipitato mediante aggiunta di tre volumi di etanolo, a pH 5 e a -20°C .

Il precipitato, separato mediante centrifugazione a $30.000 \times g$ è stato risospeso e nuovamente precipitato con TCA al 5% e raccolto su filtro Millipore.

Il prodotto finale della reazione, ^{14}C -formil- ^3H -metionil-tRNA_F, contiene quindi due isotopi instabili a diversa energia che possono essere valutati separatamente mediante la tecnica della scintillazione liquida.

ESPERIMENTI E RISULTATI

L'enzima N¹⁰-formil-tetraidrofolato: metionil-tRNA transformilasi catalizza la reazione di trasporto di un gruppo formile dal donatore, l'acido N¹⁰-formil-tetraidrofolic (N¹⁰fTHF), al gruppo aminico della parte aminoacilica del met-tRNA_F^{met} iniziatore, secondo la seguente reazione:



Il dosaggio di questa transformilasi presenta notevoli difficoltà di ordine tecnico. Operando dopo essersi sintetizzati entrambi i substrati marcati con

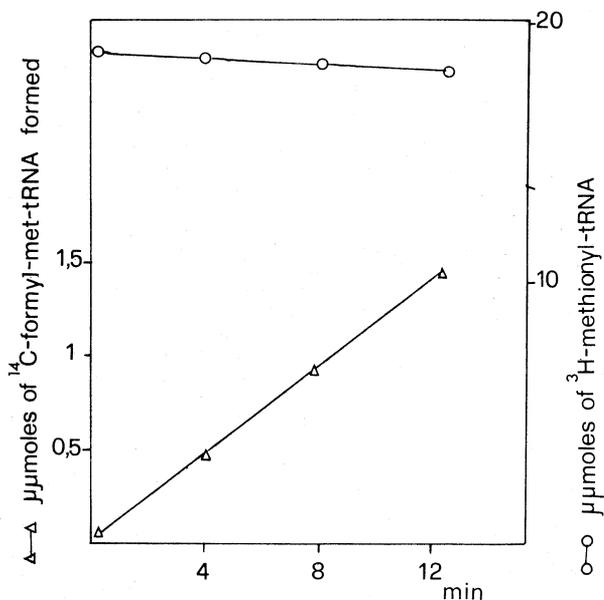


Fig. 1. - I tRNA denaturati con TCA erano raccolti su filtro Millipore e la radioattività misurata, mediante la tecnica a scintillazione liquida, con il metodo della doppia marcatura. Il ^{14}C incorporato rappresenta l'attività della transformilasi; la quantità di ^3H è la misura della disponibilità del met-tRNA_F^{met} durante la reazione.

due diversi isotopi (^{14}C -N¹⁰-formil-THF e ^3H -met-tRNA) è possibile ottenere un perfetto controllo della loro costante disponibilità durante la reazione e quindi avere una perfetta riproducibilità del dosaggio anche con estratti cellulari non particolarmente purificati.

Il vantaggio della tecnica adottata si nota nella fig. 1 in cui si può osservare come l'attività della transformilasi venga realmente dosata, nelle condizioni di temperatura, tempo e concentrazione dei substrati normalmente usati, quale velocità iniziale della reazione; come non vi sia un'apprezzabile

deacilazione a carico del met-tRNA e neppure fenomeni di ossidazione dell' N^{10} -formil-THF.

È stato riportato in precedenza che la solubilizzazione della transformilasi in *Saccharomyces cerevisiae* necessita della presenza di KCl 1 M nel tampone di estrazione [16].

Si è cercato quindi di verificare un'analogia richiesta nell'estrazione della transformilasi in *Euglena* (cfr. Tabella I).

TABELLA I

Livello dell'attività formiltetraidrolato: metionil-tRNA transformilasica in Euglena gracilis.

Campioni	Mezzo d'estrazione	Attività totale $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{g}$ peso fresco	Proteine totali mg	Attività specifica $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ di proteine
1	Tampone (*)	98	18	5,4
2	Tampone + 1 M KCl . .	136	28	4,9
3	Riestrazione del campione 1 con tampone + 1 M KCl	35	11	3,2
4	Solo tampone a cui è stato aggiunto 1 M KCl ad estrazione avvenuta	117	18	6,5

(*) TRIS-HCl 50 mM pH 7; Mg^{++} 10 mM; mercaptoetanolo 10 mM; EDTA 1 mM.

Estraendo in presenza di KCl 1 M, si è notato un recupero di attività maggiore del controllo; in quest'ultimo, però, l'attività specifica è risultata più alta. Questo è stato confermato dalla bassa attività specifica riscontrata nell'attività enzimatica estratta con KCl 1 M da un campione che aveva subito una prima estrazione senza lo ione K^+ .

Dai dati riportati si può pensare che il catione K^+ abbia un'azione fondamentale di protezione. Per chiarire questo problema si è aggiunto KCl 1 M ad un campione subito dopo l'estrazione senza KCl. Il campione in esame, dopo aver subito la normale dialisi a cui sono stati sottoposti tutti i campioni considerati, ha presentato un aumento di attività del 20 %.

Questo incremento di attività, tuttavia, non giustifica da solo la differenza di recupero tra i campioni estratti con KCl e i controlli per cui l'azione del catione K^+ in *Euglena* appare importante, se non indispensabile, per una completa solubilizzazione della transformilasi, oltre ad avere un effetto di protezione.

Prima di procedere alla caratterizzazione della transformilasi, si è cercato di purificarla con un frazionamento su colonna di DEAE-cellulosa, prendendo in esame anche la distribuzione della met-tRNA sintetasi.

Dalla fig. 2 la transformilasi mostra di essere scarsamente trattenuta dalla resina, infatti più del 50% dell'attività scende in un volume di eluato pari al volume del letto della colonna.

Prendendo in considerazione questo fatto, per un'ulteriore purificazione si è usata una colonna con resina carica negativamente come la carbossimetil-Sephadex.

Dal frazionamento con quest'ultima colonna si è avuta una purificazione finale di 900 volte.

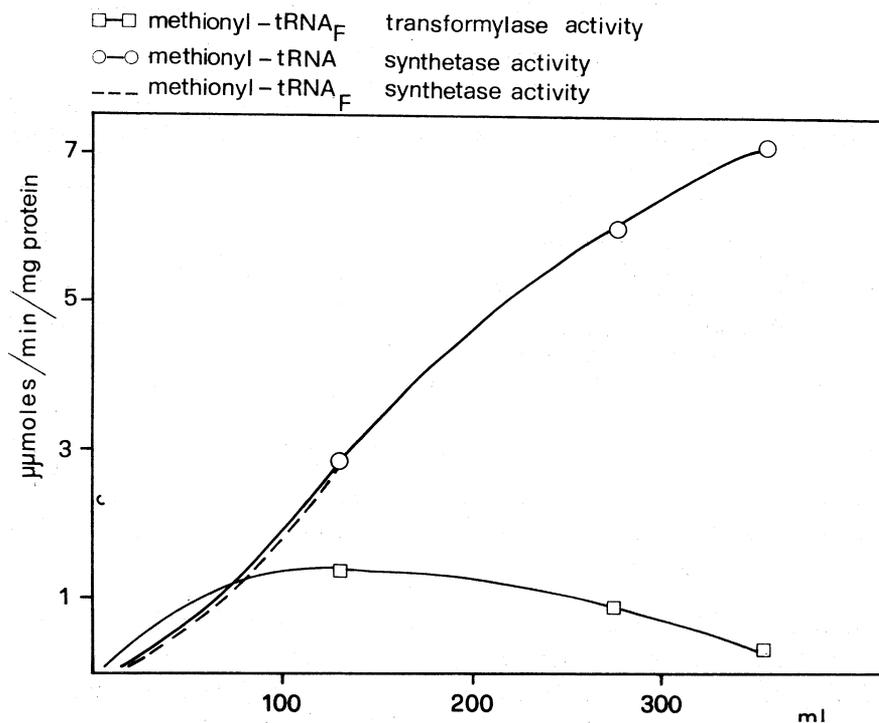


Fig. 2. - Frazionamento su colonna DEAE equilibrata con TRIS-HCl 10 mM pH 7,5; Mg^{++} 10 mM; mercaptoetanolo 20 mM; EDTA 0,1 mM, di un soprannatante 100.000 \times g di un estratto da *Euglena gracilis*. L'eluizione è stata fatta con il medesimo tampone addizionato con 0,35 M KCl.

Circa il frazionamento della met-tRNA sintetasi, su DEAE-cellulosa, è interessante notare, che, nelle prime frazioni, dove è riscontrabile la più alta attività transformilasica specifica, è presente pure una met-tRNA sintetasi che carica specificamente il $tRNA_F^{met}$.

Sono queste prime frazioni quelle usate per il successivo studio della transformilasi.

Una prima caratterizzazione dell'enzima ha comportato la ricerca di quale fosse la concentrazione ottimale di Mg^{++} e di K^+ per la reazione di transformilazione, come pure la K_m per il substrato N^{10} -formil-THF.

Dai dati trovati (Mg^{++} ottimale: $4 \times 10^{-3} M$; K^+ ottimale: $2 \times 10^{-2} M$; K_m per l' N^{10} -formil-THF: $3 \times 10^{-6} M$) emerge una netta diversità di proprietà tra questa transformilasi di tipo eucariotico e quella di tipo procariotico (enzima di *E. coli*) [17].

Questo fatto ha stimolato l'interesse a ricercare se l'enzima di Euglena potesse presentare anche delle differenze di peso molecolare.

Per determinare il peso molecolare ci si è serviti del metodo di gel-filtrazione su colonna Sephadex G 75 [18].

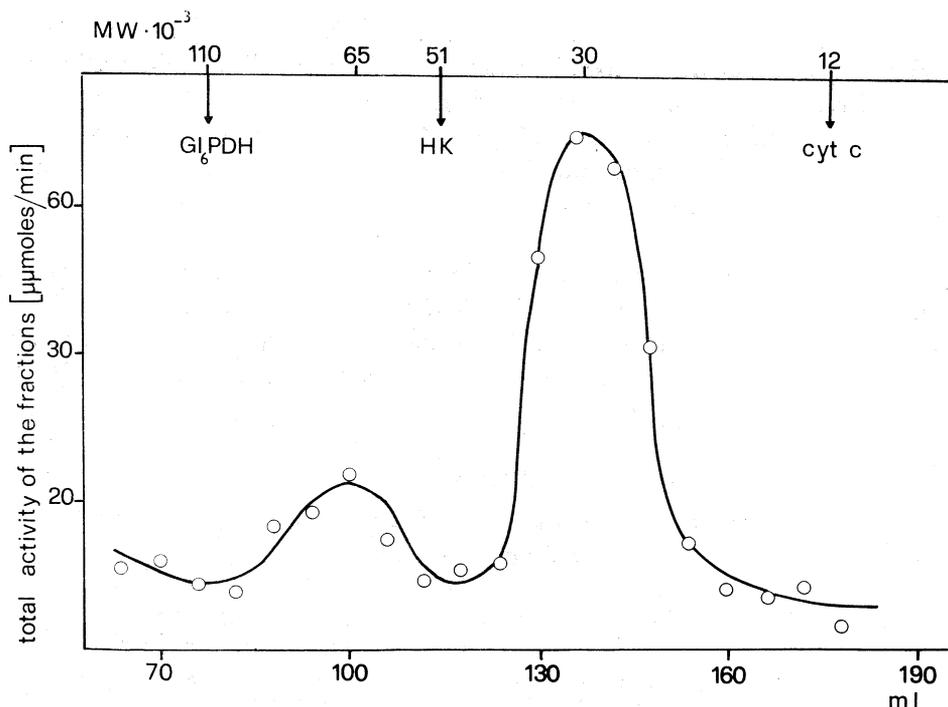


Fig. 3. - Andamento della eluizione dell'attività transformilasica da una colonna Sephadex G 75 (2,5 × 55 cm) equilibrata con TRIS-HCl 50 mM pH 7,5; KCl 100 mM. In ordinata è indicata l'attività totale transformilasica delle frazioni. Nelle ascisse vi sono i volumi ed i pesi molecolari dei marcatori: Glucosio 6 fosfato deidrogenasi (Gl₆PDH) esochinasi (HK), citocromo *c* (Cyt. C).

Come si può vedere dalla fig. 3 l'attività transformilasica presenta due picchi di attività nelle zone di peso molecolare 65.000 e 34.000.

Questo enzima sembra quindi essere costituito da una proteina che può presentarsi sotto forme polimeriche diverse.

Anche questa proprietà differenzia nettamente i due tipi di transformilasi, quella eucariotica e quella procariotica, essendo il peso molecolare di questa ultima pari a 25.000 secondo Dickerman [17].

In successivi esperimenti si è affrontato il problema di possibili effettori sull'attività enzimatica; queste ricerche sono ancora in corso e mostrano un quadro di modificazione dell'attività enzimatica assai complesso, in parte ancora da chiarire.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

La reazione di transformilazione del met-tRNA iniziatore è considerata come una tappa regolatrice delle sintesi delle proteine e dell'RNA [1, 2, 3] nei batteri.

Tale possibilità di regolazione viene in genere connessa, però, più alla disponibilità di N¹⁰-formil-THF che a meccanismi di modulazione della sua utilizzazione.

Una regolazione affidata al livello dell'N¹⁰-formil-THF nel sistema di trasformilazione del met-tRNA iniziatore negli organelli citoplasmatici non sembra invece in grado di operare efficacemente.

Infatti, negli organelli, il livello di N¹⁰-formil-THF disponibile per la reazione di inizio della sintesi proteica dovrebbe essere largamente determinato dal bilancio delle reazioni citoplasmatiche di formazione ed utilizzazione di questo substrato.

Il passaggio, negli organismi eucariotici, ad un sistema costituito da più componenti che hanno la possibilità di interscambio di substrati giustificherebbe quindi appieno la necessità di spostare il meccanismo di regolazione da una semplice variazione di livello di un substrato ad una più modulabile, come l'attività degli enzimi che lo utilizzano.

TABELLA II

Proprietà della formiltetraidrofolato: metionil-tRNA transformilasi in E. coli ed Euglena gracilis.

	<i>E. coli</i>	<i>Euglena gracilis</i>
Mg ⁺⁺	parziale richiesta optimum 20 mM	parziale richiesta optimum 4 mM
Km formilTHF	$1,33 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-6}$
K ⁺	sostituisce parzialmente il Mg ⁺⁺	parziale richiesta; optimum 20 mM
Peso molecolare	25.000; nessuna subunità	65.000; 34.000 probabili dimeri e tetrameri
Nucleotidi solubili . . .	nessun effetto	modelli di attivazione ed inibi- zione da chiarire

I dati qui riportati consentono, in accordo con questa possibilità, una serie di considerazioni che appaiono evidenti quando alcune caratteristiche mostrate dall'enzima presente in *Euglena* vengono comparate con quelle di *E. coli* (cfr. Tabella II).

Infatti, mentre l'enzima procariotico non mostra alcuna delle caratteristiche proprie degli enzimi regolatori, l'enzima di organello appare esistere in forme multiple corrispondenti, probabilmente, a dimeri e forse anche a

tetrameri di subunità di peso molecolare assai vicino a quello riscontrato per l'enzima batterico.

Come noto, infatti, la presenza di una struttura quaternaria in una proteina enzimatica, costituisce la base strutturale perché una regolazione di tipo allosterico possa estrinsecarsi.

I risultati di esperimenti preliminari qui non riportati suggeriscono fortemente che almeno alcuni dei probabili effettori siano da individuarsi nella classe dei nucleotidi solubili tri e difosfati.

Tuttavia gli effetti esercitati da essi sull'attività enzimatica debbono essere ancora analizzati in esperimenti più complessi in cui si tenga conto, tra l'altro, della probabile interconversione tra le diverse forme di enzima accertate.

Questo dovrebbe infine permettere l'elaborazione di un quadro generale corrispondente ad un preciso schema regolativo.

È interessante ora ricordare che, mentre esperimenti di ibridazione hanno dimostrato che lo specifico tRNA iniziatore organellare è codificato dal DNA dell'organello stesso [16] la transformilasi di mitocondri di lievito appare codificata dal DNA nucleare e sintetizzata utilizzando il sistema di sintesi proteica citoplasmatico [19].

La probabile ipotesi di un'origine degli organelli citoplasmatici da una fusione di organismi di tipo procariotico con eucarioti di tipo primitivo può essere spiegata solo come integrazione di parti del genoma procariotico in quello dell'eucariote. Questo fenomeno può avere gettato le basi di un diverso sviluppo evolutivo che ha portato ad una maggiore complessità di struttura e di funzione della transformilasi organellare.

BIBLIOGRAFIA

- [1] EISENSTADT J. e LENGYEL P. (1966) - « Science », 154, 524.
- [2] SHIH A., EISENSTADT J. e LENGYEL P. (1966) - « Proc. Nat. Ac. Sc. U. S. », 56, 1599.
- [3] DANCHIN A. (1973) - « FEBS letters », 34, 327.
- [4] SMITH A. E. e MARCKER K. A. (1968) - « J. Mol. Biol. », 38, 241.
- [5] BURKARD G., ECLANCHER B. e WEIL J. H. (1969) - « FEBS letters », 4, 285.
- [6] BIANCHETTI R., LUCCHINI G. e SARTIRANA M. L. (1971) - « B.B.R.C. », 42, 97.
- [7] LUCCHINI F., TORTORA P., CROSTI P., BIANCHETTI R. - « B. B. A. » (in press).
- [8] SARTIRANA M. L. e BIANCHETTI R. (1970) - *Symposium on biosynthesis of protein and control mechanisms*, « Gior. Bot. Ital. », 104, 229.
- [9] ALLENDE J. E. (1969) - *Techniques in protein biosynthesis*. Ed. Campbell 2, 67.
- [10] SHERN A. e HOROWITZ N. H. (1969) - « Biochemistry », 8, 295.
- [11] CHIEN-CHUNG LI e CHUAN-TAO YU (1969) - « B.B.A. », 182, 440.
- [12] DE MAN e SHARPE (1960) - « J. Appl. Bact. », 23, 130.
- [13] LANSFORD E. M., TURNER R. B., WEATHERSBEE C. J. e SHIVE W. (1964) - « J. Biol. Chem. », 239, 497.
- [14] HIATT A. (1965) - « J. Plant. Physiol. », 40, 189.
- [15] HO P. P. K. e LAUDIE J. (1967) - « B.B.A. », 148, 622.
- [16] HALBREICH A. e RABINOWITZ M. (1968) - « Proc. Nat. Acad. Sci., USA », 61, 114.
- [17] WEISSBACH H. (1967) - « J. Biol. Chem. », 242, 1522.
- [18] ANDREWS P. (1964) - « Biochem. J. », 91, 222.
- [19] BARATH Z. e KUNTZEL H. (1972) - « Proc. Nat. Acad. Sc. USA », 69, 1371.