

■
Rui Manuel Fontes Gonçalves

Síntese Enzimica de Mono e Dinucleosídeos Polifosfatados.

Acção Catalítica da Sintétase de Acil-Coenzima A de *Pseudomonas fragi* e da Luciférase de *Photinus pyralis*.

Dissertação de candidatura ao grau de doutor apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

PORTO 1999

Rui Manuel Fontes Gonçalves

**Síntese Enzímica de Mono e
Dinucleosídeos Polifosfatados.**

Acção Catalítica da Sintétase de Acil-Coenzima A
de *Pseudomonas fragi* e da Luciférase
de *Photinus pyralis*.

Dissertação de candidatura ao grau de doutor apresentada
à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Porto 1999

Orientador:

Professor Doutor Antonio Sillero, catedrático de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Autónoma de Madrid.

Coorientador:

Professor Doutor José Pinto de Barros, catedrático jubilado de Química Fisiológica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

Art.º 48º,§3º - A Faculdade não se responsabiliza pelas doutrinas expendidas na dissertação.
(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 29 de Janeiro de 1931, Decreto nº 19337)

CORPO CATEDRÁTICO DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Professores Catedráticos

Doutor Alberto Manuel Barros da Silva
Doutor Alexandre Alberto Guerra Sousa Pinto
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Fernandes Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina Silva Leal
Doutor António Luís Tomé Rocha Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio Araújo Teixeira
Doutor Belmiro dos Santos Patrício
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo Magalhães Ramalhão
Doutor Daniel Filipe de Lima Moura
Doutor Eduardo Jorge Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor Henrique José Ferreira Gonçalves Lecour de Meneses
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor José Agostinho Marques Lopes
Doutor José Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Lopes Teixeira Amarante
Doutor Levi Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luís António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Maria Amélia Duarte Ferreira
Doutor Maria Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutor Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Patrício Manuel Vieira Araújo Soares da Silva
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Víctor Manuel Oliveira Nogueira Faria

Professores Jubilados e Aposentados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Carvalho Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor Celso Renato Paiva Rodrigues Cruz
Doutor Daniel Santos Pinto Serrão
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Ferreira
Doutor Francisco de Sousa Lé
Doutor João da Silva Carvalho
Doutor Joaquim Oliveira da Costa Maia
Doutor José Fernando Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto de Barros
Doutor Manuel José Bragança Tender
Doutor Manuel Teixeira Amarante Júnior
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

*“Caminante, son tus huellas
el camino, y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.”*

Antonio Machado

Ao João
À Cristina
Ao meu pai e à memória da minha mãe

PREFÁCIO

Numa reunião do Serviço de Bioquímica em que participei, no verão de 1992, o professor Hipólito Reis informou os presentes que iria haver um curso de enzimologia no então chamado Centro de Citologia Experimental do Porto. Sendo que todos os meus interesses e toda a minha trajectória se orientavam para essa área do conhecimento bioquímico achei que estava aí uma oportunidade que não podia, de forma alguma, desperdiçar. Assim, fiz a pré-inscrição no referido curso mas, dias antes do seu início, fui informado que o meu nome não tinha sido seleccionado. Apesar disso, no primeiro dia do curso, apresentei-me ao respectivo director, o professor Antonio Sillero, e depois de lhe explicar o meu interesse, pedi-lhe autorização para assistir e participar nas sessões teóricas. Foi com surpresa e agrado que ouvi a resposta: podia participar nas sessões teóricas e o director do curso iria tentar saber se também era possível a minha participação nas sessões práticas. O curso acabou por decorrer com mais um aluno do que estava inicialmente previsto.

Durante o curso foram várias as oportunidades para conversar nomeadamente à hora das refeições. No decurso duma dessas conversas, o professor Antonio Sillero perguntou-me se não estaria interessado em colaborar com ele em estudos teóricos de cinética enzimica e em desenvolver a minha tese de doutoramento em Madrid, no laboratório por ele dirigido, sobre um tema da área da enzimologia. Respondi que o meu entusiasmo em aceitar a proposta tinha de ser confrontada com a necessidade de ouvir o meu director de Serviço: o professor Pinto de Barros. O professor Pinto de Barros apoiou o meu entusiasmo e propôs-se ajudar-me a ultrapassar as dificuldades burocráticas inerentes à necessidade de o serviço docente que vinha prestando na faculdade ter de ser interrompido.

Iniciámos então um caminho em que a apresentação desta dissertação é um episódio que culmina uma longa caminhada feita de trabalho, dedicação entusiasta e desejo de aprender.

A função e o metabolismo dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados tem sido ao longo de quase três décadas o tema central da investigação do professor Antonio Sillero e da sua equipa. Estes compostos têm despertado a curiosidade científica de investigadores de todo o mundo desde meados dos anos sessenta e a nossa contribuição para o desenvolvimento desse conhecimento veio dar continuidade ao esforço que tem vindo a ser feito pela comunidade científica em geral e por Antonio Sillero, María Antonia Günther Sillero e seus colaboradores em particular.

Simultaneamente com a divulgação da descoberta, feita no laboratório onde decorreu o trabalho experimental discutido e apresentado nesta memória, de que uma oxiredútase, a luciférase de um pirilampo americano (*Photinus pyralis*), podia catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados foi formulada a hipótese de que a síntese deste tipo de compostos poderia ser catalisada por enzimas capazes de formar, durante o seu mecanismo de reacção, um complexo intermediário contendo um acil-adenilato com libertação concomitante de pirofosfato. Admitindo-se que a síntese de acil-CoA podia ser uma dessas enzimas testámos, com êxito, essa possibilidade usando a síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* [Artigo I]. Dada a recente descoberta da presença de dinucleosídeos penta e hexafosfatados em plaquetas sanguíneas humanas e o interesse crescente dos dinucleosídeos polifosfatados com um número de fosfatos internos superior a quatro como potenciais reguladores extracelulares de múltiplos processos biológicos, demonstrámos que também a síntese destes compostos podia ser catalisada, *in vitro*, pela mesma enzima [Artigos I e II]. As dúvidas sobre o mecanismo enzimico envolvido no processo de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados catalisada pela síntese acil-CoA não foram totalmente esclarecidas. Tendo em conta o tempo disponível

optou-se por esclarecer as dúvidas que também existiam relativamente ao mecanismo de síntese dos mesmos compostos quando o agente catalítico era uma outra enzima da mesma superfamília: a luciférase de *Photinus pyralis*. Na sequência de trabalhos prévios do laboratório de Sillero e Sillero sobre as actividades de síntese de dinucleosídeos polifosfatados e bioluminescente catalisadas por esta enzima esclarecemos melhor os mecanismos enzimáticos envolvidos nestas reacções pondo em relevo o papel da luciferina, da desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato [Artigos III e IV].

O carácter unitário do trabalho realizado é posto em evidência na Introdução, onde se revêem aspectos do metabolismo e da função de mono e dinucleosídeos polifosfatados bem como algumas características gerais das sínteses de acil-CoA e das luciférases de pirilampos, e na Discussão, onde se discutem os resultados obtidos com as duas enzimas estudadas. As semelhanças estruturais e funcionais entre as luciférases de pirilampos e de outros insectos coleópteros e as sínteses de acil-CoA que constam na literatura científica são apresentadas no último capítulo da Introdução; a nossa investigação contribuiu para o aprofundamento do conhecimento sobre a função destas enzimas permitindo acrescentar uma nova perspectiva a essas semelhanças.

Um dos critérios possíveis na elaboração da Introdução seria a apresentação, de forma sumária, da hipótese que esteve na base do trabalho apresentado e que se encontra nos primeiros dois parágrafos do capítulo 1.4.d (ver página 28). Dada a escassa atenção que, até há poucos anos, era prestada aos mono e dinucleosídeos polifosfatados e a actualidade da investigação básica e médica que está sendo desenvolvida considerámos que seria útil ao leitor dispor de uma revisão actualizada sobre esta temática (capítulos 1.1-1.4). Na Discussão focamos a atenção no nosso próprio trabalho e o leitor poderá, de acordo com o seu próprio critério, optar por uma leitura apoiada nas revisões que apresentamos na Introdução sobre as sínteses de acil-CoA (capítulo 1.5), as luciférases de insectos coleópteros (capítulo 1.6) ou as enzimas da superfamília da luciférase (capítulo 1.7).

A determinante contribuição do autor desta dissertação para os estudos apresentados reflecte-se no facto de ser o primeiro autor em todos os quatro artigos que constituem o núcleo da memória que agora se apresenta. Foi da sua responsabilidade a planificação, execução e análise dos resultados da esmagadora maioria das experiências realizadas tendo também participado activamente na redacção de todos os artigos publicados. Por razões de política editorial da revista para onde enviamos o Artigo IV (*FEBS Letters*) vimo-nos forçados a eliminar uma figura (contendo gráficos) que complementava a informação relativa a uma experiência que descrevemos nesse artigo. Porque nos pareceu que a apresentação dessa figura assim como as tabelas que estiveram na sua origem podia enriquecer a discussão que fazemos no capítulo 3 desta memória decidimos incluí-las nesse mesmo capítulo.

O trabalho apresentado teria sido impossível sem o apoio, os ensinamentos e a colaboração de todas as pessoas que trabalharam ao meu lado, ao longo destes anos, no laboratório B-23 da Faculdade de Medicina da Universidade Autónoma de Madrid.

Em particular queria destacar o contributo do meu orientador de tese o professor Antonio Sillero. Antonio Sillero é um investigador conceituado na área dos nucleosídeos polifosfatados tendo dado os seus primeiros passos como aluno de Alberto Sols e Severo Ochoa nos finais da década de sessenta. Foi para mim um motivo de esperança e de orgulho ter sido convidado, no verão de 1992, para ser seu colaborador. Após estes anos venho, com humildade, agradecer-lhe essa honra. Sem a sua visão global dos problemas biológicos e sem o seu estímulo permanente, as capacidades que em mim reconheceu não teriam frutificado. O percurso científico da doutora María Antonia Günther Sillero é, em grande parte, paralelo ao

de Antonio Sillero, com ele tendo partilhado o esforço e o êxito na construção do caminho que é hoje reconhecido pela comunidade científica. Em María Antonia Günther Sillero encontrei sempre, no momento oportuno, o conselho imprescindível e o empenhamento pessoal competente e experiente que tornaram possível o trabalho que agora se apresenta.

O apoio e o incentivo para que este trabalho fosse possível começou, no caso do professor Pinto de Barros, muito antes de ele ter início. O professor Pinto de Barros recebeu-me no serviço de Química Fisiológica, como seu assistente, no ano de 1985, orientou os meus primeiros passos como docente e como investigador e nele encontrei sempre palavras de incentivo e de amizade. A minha permanência em Madrid durante o ano lectivo de 1993/94 não teria sido possível sem o seu apoio e empenhamento pessoal.

Nos anos seguintes, para que o trabalho então iniciado tivesse continuidade, foi imprescindível a compreensão da nova direcção dos Serviços de Química Fisiológica e de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Porto. Para o professor Hipólito Reis e para a professora Isabel Azevedo vai também, e com toda a justiça, o meu muito obrigado.

Para Anabel de Diego, Olga Gonzalez e Jara Llenas vai um agradecimento muito especial. O empenho e a competência que demonstraram na ajuda prestada só tem paralelo no apoio humano e no carinho que sempre me dedicaram.

Outras pessoas que trabalharam no laboratório B-23 durante estes anos e com as quais, em algum momento tive oportunidade de conviver, apreciar o seu trabalho e aprender, quer em termos científicos quer humanos, são as seguintes: João Meireles Ribeiro, Alexey Dukhovich, Franklim Marques, Begoña Ortiz, Ana Sancho, Eulálio Zaera, Amparo Torrecilla, Olga Madrid, Eva Ana Atencia, Mercedes del Valle e Sofia Garrido. Para todos eles assim como para Sebastián Cerdán do “Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols” vai também o meu muito obrigado.

Aos meus colegas docentes e investigadores dos serviços de Química Fisiológica e de Bioquímica da Faculdade de Medicina do Porto quero agradecer a disponibilidade para encontrar horários de trabalho docente compatíveis com o meu trabalho de investigação em Madrid. Os seus nomes são: Carlos Marinho, Paulo Dias, Luciana Gonçalves, Josué Pereira, Tiago Guimarães, Maria João Martins, Conceição Calhau, Fátima Martel, Lina Matos, Manuel Nuno Alçada, Rita Negrão, Raquel Soares, Alejandro Santos e Susana Dias. Quero aqui agradecer de modo particular à Maria João Martins o trabalho de leitura crítica do texto em português.

Agradeço as contribuições do José Soares, que desenhou a capa deste trabalho, do Frederico Marinho, da Cristina Gradim e de Juana Sempere que colaboraram na tradução para Francês de um capítulo desta dissertação.

Agradeço também à Junta Nacional de Investigação Científica que apoiou este trabalho com uma bolsa de estudos que permitiu custear parcialmente a minha estadia em Madrid.

Por último, quero agradecer ao meu pai, à minha mãe (que já não pôde ver este trabalho), à minha mulher e ao meu filho.

ABREVIATURAS E LISTA DE REACÇÕES

a) Abreviaturas de nucleotídeos.

8-N ₃ Ap ₄ A	8-azidoadenosina(5')tetrafosfo(5')adenosina.
AMP	Adenosina-5'-monofosfato ou adenilato.
Ap ₂ A	Adenosina(5')difosfo(5')adenosina.
Ap ₃ A	Adenosina(5')trifosfo(5')adenosina.
Ap ₄ A	Adenosina(5')tetrafosfo(5')adenosina.
Ap ₄ AαS	Adenosina(5')α-tiotetrafosfo(5')adenosina.
Ap ₄ AβS	Adenosina(5')β-tiotetrafosfo(5')adenosina.
Ap ₄ C	Adenosina(5')tetrafosfo(5')citidina.
Ap ₄ dA	Adenosina(5')tetrafosfo(5')desoxiadenosina.
Ap ₄ dC	Adenosina(5')tetrafosfo(5')desoxicitidina.
Ap ₄ dG	Adenosina(5')tetrafosfo(5')desoxiguanosina.
Ap ₄ dT	Adenosina(5')tetrafosfo(5')desoxitimidina.
Ap ₄ G	Adenosina(5')tetrafosfo(5')guanosina.
Ap ₄ N	Adenosina(5')tetrafosfo(5')nucleosídeo.
Ap ₄ U	Adenosina(5')tetrafosfo(5')uridina.
Ap ₄ X	Adenosina(5')tetrafosfo(5')xantosina.
Ap ₅ A	Adenosina(5')pentafosfo(5')adenosina.
Ap ₆ A	Adenosina(5')hexafosfo(5')adenosina.
Ap _n A	Adenosina(5')polifosfo(5')adenosina. ou diadenosídeos polifosfatados (n= número de resíduos fosfato).
AppCHClppA	P ² ,P ³ -monoclorometileno-diadenosinotetrafosfato.
Ap _s pCHClpp _s A	P ¹ ,P ⁴ -ditio-P ² ,P ³ -monoclorometileno-diadenosinotetrafosfato.
ATPαS	Adenosina-5'-O-[α-tiotrifosfato].
ATPγS	Adenosina-5'-O-[γ-tiotrifosfato].
cAMP	Adenosina-5',3'-monofosfato cíclico.
ddAp ₄ N	2',3'-didesoxiadenosina(5')tetrafosfo(5')nucleosídeo.
dGTP	Desoxiguanosina-5'-trifosfato.
ddGTP	2',3'-didesoxiguanosina-5'-trifosfato.
GMP	Guanosina-5'-monofosfato ou guanilato.
Gp ₄ G	Guanosina(5')tetrafosfo(5')guanosina.
Ip ₅ I	Inosina(5')pentafosfo(5')inosina.
NDP	Nucleosídeo-5'-difosfato ou mononucleosídeo difosfatado.
NMP	Nucleosídeo-5'-monofosfato ou mononucleosídeo monofosfatado.
Np ₃ N	Nucleosídeo(5')trifosfo(5')nucleosídeo. ou dinucleosídeo trifosfatado.
Np ₄ N	Nucleosídeo(5')tetrafosfo(5')nucleosídeo ou dinucleosídeo tetrafosfatado.
Np _n N	Nucleosídeo(5')polifosfo(5')nucleosídeo ou dinucleosídeo polifosfatado (n= número de resíduos fosfato).
NTP	Nucleosídeo-5'-trifosfato ou mononucleosídeo trifosfatado.
p ₄ A	Adenosina-5'-tetrafosfato.
p ₄ dA	2'-desoxiadenosina-5'-tetrafosfato.
p ₄ G	Guanosina-5'-tetrafosfato.
p ₄ N	Nucleosídeo-5'-tetrafosfato ou mononucleosídeo tetrafosfatado.
p ₅ A	Adenosina-5'-pentafosfato.
pAp	Adenosina-5',3'-bisfosfato.
pCp	Citidina-5',3'-bisfosfato.
pA(2')p	Adenosina-5',2'-bisfosfato.

p _n N	Mononucleosídeo-5'-polifosfato ou mononucleosídeo polifosfatado (n= número de resíduos fosfato).
UTP	Uridina-5'-trifosfato.
TTP	2'-desoxitimidina-5'-trifosfato.
Xp ₄ X	Xantosina(5')tetrafosfo(5')xantosina.

b) Abreviaturas de uma letra para aminoácidos¹.

A	Alanina.
C	Cisteína.
D	Aspartato.
E	Glutamato.
F	Fenilalanina.
G	Glicina.
H	Histidina.
I	Isoleucina.
K	Lisina.
L	Leucina.
M	Metionina.
N	Asparagina.
P	Prolina.
Q	Glutamina.
R	Asparagina.
S	Serina.
T	Treonina.
V	Valina.
W	Triptofano.
x	Qualquer aminoácido.
Y	Tirosina.

c) Outras abreviaturas.

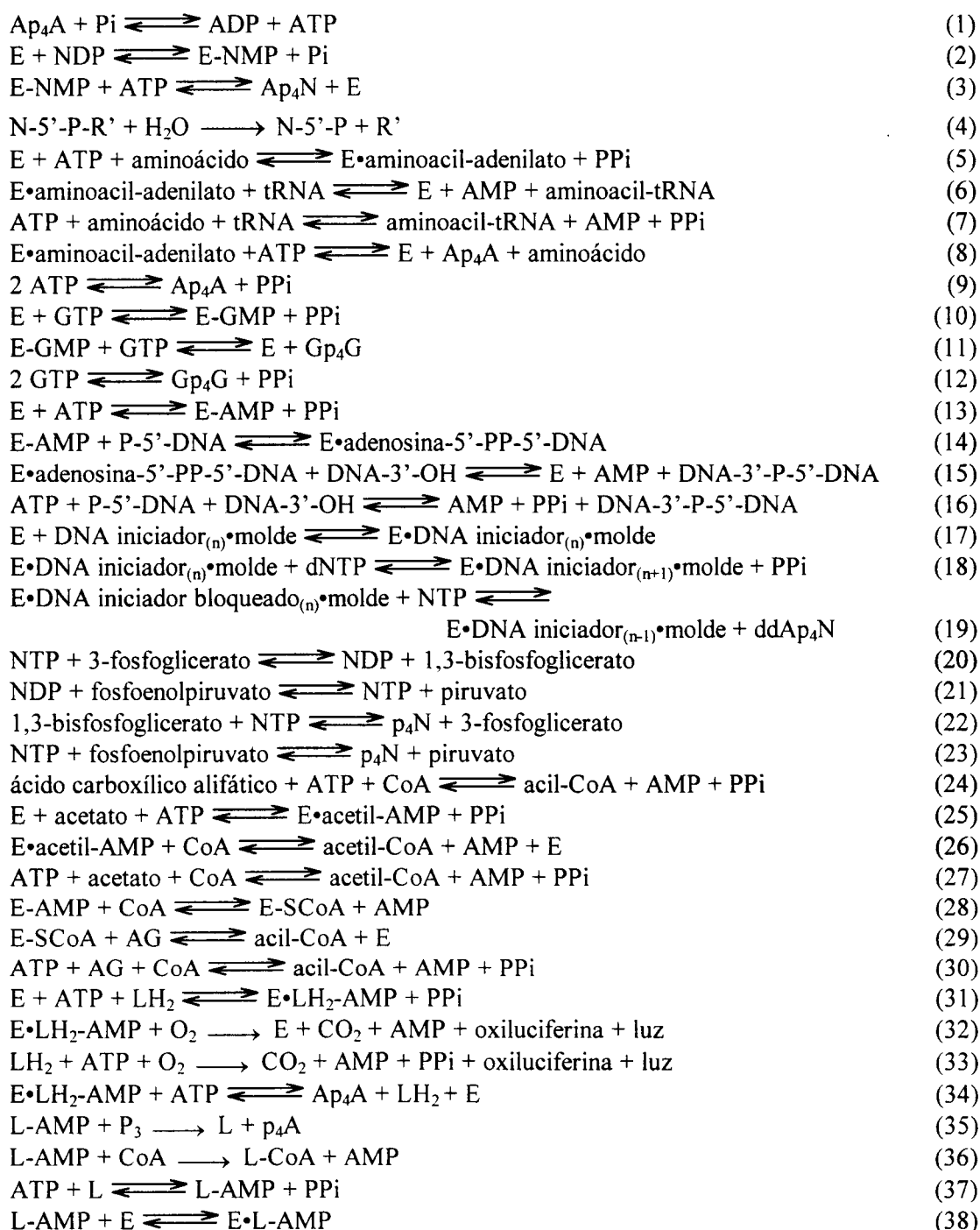
Acetil-AMP	Acetil-adenilato.
Acil-AMP	Acil-adenilato.
AG	Ácido gordo.
E	Enzima.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético.
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]etanosulfônico.
HPLC	Cromatografia líquida de alta definição.
L	Desidroluciferina.
L-AMP	Desidroluciferil-adenilato.
LH ₂	Luciferina.
LH ₂ -AMP	Luciferil-adenilato.
m/m	Massa/massa.
MES	Ácido 2-(n-morfolino)etanosulfônico.
P ₃	Tripolifosfato.
P ₄	Tetrapolifosfato.
PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida.

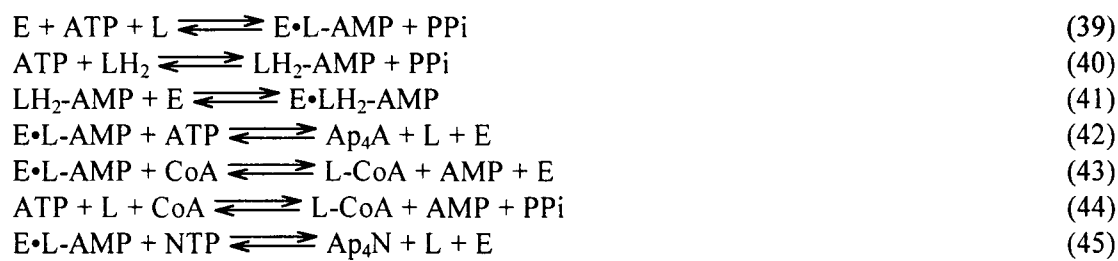
¹Quando, representando uma sequência de aminoácidos de um proteído, várias letras são escritas entre parêntesis rectos significa que existem várias possibilidades diferentes para uma mesma posição (ver exemplos no capítulo 1.7).

Pi	Fosfato inorgânico.
PPase	Pirofosfatase.
PPi	Pirofosfato inorgânico.
rf	Factor de retardação em TLC.
SDS	Dodecilsulfato de sódio.
TLC	Cromatografia em camada fina.
v/v	Volume/volume.

d) Lista de reacções.

Para facilitar a leitura desta memória apresentamos nesta lista as equações de reacção por ordem de aparecimento no texto.





ÍNDICE

1 – Introdução.....	1
1.1 - Estrutura dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados.....	1
1.2 - Distribuição e variações de concentração dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados nos seres vivos.....	2
1.3 - Papel biológico dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados.....	4
1.3.a - Aspectos gerais.....	4
1.3.b - Efeito de dinucleosídeos polifosfatados na actividade biológica de enzimas e outros proteídeos intracelulares.....	4
1.3.b.1 - Efeitos no metabolismo das purinas.....	4
1.3.b.2 - Os dinucleosídeos polifosfatados como iniciadores da síntese de polinucleotídeos.....	5
1.3.b.3 - Os dinucleosídeos polifosfatados como análogos de estados de transição de cinases.....	5
1.3.b.4 - Efeitos sobre o metabolismo intracelular do Ca^{2+} e canais de K^{+}	6
1.3.c - Secreção de dinucleosídeos polifosfatados por plaquetas sanguíneas, medula suprarrenal e outras células neuronais. Efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares.....	7
1.3.c.1 - Secreção de dinucleosídeos polifosfatados para o meio extracelular.....	7
1.3.c.2 - Metabolismo extracelular de mono e dinucleotídeos.....	8
1.3.c.3 - Efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares.....	9
1.3.c.4 - Os dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares: possível significado fisiológico ou patológico.....	12
1.3.c.5 - Perspectivas de uso terapêutico de dinucleosídeos polifosfatados.....	14
1.3.d - Dinucleosídeos polifosfatados, divisão celular e síntese de DNA.....	15
1.3.e - Relação entre os dinucleosídeos polifosfatados e um possível gene supressor de tumores (FHIT).....	16
1.3.f - Dinucleosídeos polifosfatados como “alarmonas”. Papel na adaptação a condições ambientais desfavoráveis.....	17
1.3.g - Papel biológico do p_A e outros mononucleosídeos tetrafosfatados.....	18
1.4 - Metabolismo de mono e dinucleosídeos polifosfatados.....	19
1.4.a - Hidrólise e fosforólise enzimáticas de dinucleosídeos polifosfatados.....	19
1.4.a.1 - Dinucleosídeo-tetrafosfátase assimétrica (EC 3.6.1.17).....	19
1.4.a.2 - Dinucleosídeo-trifosfátase (EC 3.6.1.29).....	20
1.4.a.3 - Dinucleosídeo-tetrafosfátase simétrica (EC 3.6.1.41).....	20
1.4.a.4 - Fosforílase dos dinucleosídeos tetrafosfatados (EC 2.7.7.53).....	21
1.4.a.5 - Fosfodiésterases I (EC 3.1.4.1).....	22
1.4.b - Hidrólise enzimática de mononucleosídeos polifosfatados.....	23
1.4.c - Síntese enzimática de dinucleosídeos polifosfatados.....	23
1.4.c.1 - Sintétases de aminoacil-tRNA (EC 6.1.1.x).....	23
1.4.c.1.1 - Mecanismo de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados.....	24
1.4.c.1.2 - Especificidade de substrato.....	25
1.4.c.1.3 - Efeitos moduladores na actividade de síntese de dinucleosídeos polifosfatados.....	26
1.4.c.1.4 - Síntese de dinucleosídeos polifosfatados <i>in vivo</i> por acção de sintétases de aminoacil-tRNA.....	26
1.4.c.2 - Transférase de guanilato do GTP (EC 2.7.7.45) e transférase de guanilato do RNA mensageiro (EC 2.7.7.50).....	27
1.4.d - A síntese de dinucleosídeos polifosfatados poderá ser catalisada pelas enzimas capazes de formar como intermediários complexos contendo adenilato.....	28
1.4.d.1 - Ligases de DNA (EC 6.5.1.1) e RNA (EC 6.5.1.3) do bacteriófago T4.....	28
1.4.d.2 - Transcriptase reversa (EC 2.7.7.49).....	29
1.4.e - Síntese enzimática de mononucleosídeos polifosfatados.....	30
1.5 - Sintétases de acetil- e acil-CoA (EC 6.2.1.x).....	31
1.5.a - Sintétase de acetil-CoA (EC 6.2.1.1).....	32
1.5.a.1 - A actividade de síntese de acetil-CoA. Aspectos funcionais e estruturais das sintétases de acetil-CoA.....	32
1.5.a.2 - Síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados pela sintétase de acetil-CoA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33

1.5.b - Sintétase de acil-CoA de cadeia longa (EC 6.2.1.3).	33
1.5.b.1 - Localização da enzima.	33
1.5.b.2 - Estudos de purificação e caracterização.	34
1.5.b.3 - Estudos de biologia molecular.	35
1.5.b.4 - Regulação da actividade enzimica.	36
1.5.c - Outras sintétases de acil-CoA.	37
1.5.c.1 - Sintétase de propionil-CoA (EC 6.2.1.17).	37
1.5.c.2 - Sintétase de butiril-CoA e/ou sintétase de acil-CoA de cadeia média (EC 6.2.1.2).	37
1.5.c.3 - Sintétase de araquidonil-CoA (EC 6.2.1.15).	38
1.5.c.4 - Sintétase de acil-CoA de cadeia muito longa (EC 6.2.1.?).	38
1.5.c.5 - Sintétase de fitanoil-CoA (6.2.1.24).	38
1.5.c.6 - Sintétase de dicarboxilil-CoA (EC 6.2.1.23).	39
1.5.d - Mecanismos enzimicos das sintétases de acetil- e acil-CoA.	39
1.5.d.1 - Mecanismo enzimico das sintétases de acetil-CoA e de acil-CoA de cadeia média.	39
1.5.d.2 - Mecanismo enzimico das sintétases de acil-CoA de cadeia longa.	41
1.6 - A luciférase de <i>Photinus pyralis</i> e de outros insectos coleópteros (EC 1.13.12.7).	42
1.6.a - A reacção bioluminescente catalisada por luciférase de insectos coleópteros. A luciférase de <i>Photinus pyralis</i> .	42
1.6.a.1 - Aspectos gerais.	42
1.6.a.2 - A reacção bioluminescente. Reagentes, produtos, mecanismo e a natureza do emissor.	43
1.6.a.3 - A cinética da reacção bioluminescente. Inibição da produção de luz, síntese de desidroluciferina e efeito da coenzima A e de outros compostos.	46
1.6.a.4 - Estudos de biologia molecular e estruturais das luciférase de insectos coleópteros.	49
1.6.a.5 - Aspectos de aplicação da reacção bioluminescente da luciférase no doseamento do ATP e em estudos de regulação da expressão de genes.	50
1.6.b - Síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados pela luciférase de <i>Photinus pyralis</i> .	51
1.7 - Semelhanças estruturais e funcionais entre sintétases de acil-CoA, luciférase de insectos coleópteros e outras enzimas da superfamília da luciférase.	53
2 – Síntese de Mono e Dinucleosídeos Polifosfatados pela Sintétase de Acil-CoA de <i>Pseudomonas fragi</i> e pela Luciférase de <i>Photinus pyralis</i>	56
2.1 - A sintétase de acil-CoA de <i>Pseudomonas fragi</i> catalisa a síntese de adenosina-5'-polifosfatos e dinucleosídeos polifosfatados.	57
2.2 - A sintétase de acil-CoA catalisa a síntese de diadenosina hexafosfato (Ap ₆ A).	65
2.3 - Efeito da desidroluciferina, coenzima A e nucleosídeos trifosfatados na reacção luminescente. Síntese da desidroluciferina pela luciférase de pirilampo.	71
2.4 - O desidroluciferil-adenilato é o intermediário mais importante na síntese de Ap ₄ A catalisada pela luciférase de pirilampas na presença de luciferina.	78
3 – Discussão	84
3.1 - A convicção de que os mono e os dinucleosídeos polifosfatados são moduladores de processos biológicos justifica o interesse do estudo da sua síntese.	84
3.2 - A sintétase de acil-CoA e a síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados. A hipótese e os seus fundamentos.	85
3.3 - A sintétase de acil-CoA de <i>Pseudomonas fragi</i> catalisa a síntese de p ₄ A, p ₅ A, Ap ₄ A, Ap ₅ A, Ap ₆ A e heterodinucleotídeos contendo adenina.	86
3.4 - Caracterização da actividade de síntese de p ₄ A da sintétase de acil-CoA de <i>Pseudomonas fragi</i> . A luciférase de <i>Photinus pyralis</i> como termo de comparação.	88
3.5 - A participação da sintétase de acil-CoA na síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados, <i>in vivo</i> . Uma hipótese em aberto.	92
3.6 - Os mecanismos de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados pela sintétase de acil-CoA e pela luciférase de <i>Photinus pyralis</i> .	94

3.7 - O mecanismo de síntese de Ap_4A pela luciferase de <i>Photinus pyralis</i> . A luciferase também catalisa a oxidação da luciferina a desidroluciferina: uma informação essencial durante muito tempo ignorada.....	96
3.8 - O desidroluciferil-adenilato é o principal intermediário na síntese de Ap_4A mesmo quando se adiciona luciferina ao meio de ensaio. Dois novos métodos de estudo das reacções catalisadas pela luciferase de <i>Photinus pyralis</i>	98
3.9 - A reacção bioluminescente e os seus produtos. A síntese enzimica de oxiluciferina estudada por HPLC.	105
3.10 - A inibição da produção de luz após o clarão: uma reflexão com novos dados.	106
3.11 - A coenzima A como inibidora da síntese de Ap_4A e estimuladora da reacção bioluminescente e o efeito de nucleotídeos não adenílicos na reacção bioluminescente.	108
3.12 - Considerações Finais.	111
4 – Resumo e Conclusões.....	113
5 – Summary and Conclusions.....	115
6 – Résumé et Conclusions	117
7 – Referências Bibliográficas	119

1- INTRODUÇÃO

Esta memória apresenta o estudo da síntese de nucleosídeos polifosfatados usando como agentes catalíticos a sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* e a luciférase de *Photinus pyralis*, duas enzimas que, de acordo com critérios baseados em semelhanças estruturais e funcionais, são classificadas numa mesma superfamília de enzimas. A hipótese que está na base do nosso trabalho com a sintétase de acil-CoA é apresentada no capítulo 1.4.d (página 28) e é mais amplamente justificada no capítulo 3.2 (página 85). O nosso trabalho sobre a luciférase surgiu como um desenvolvimento natural do estudo iniciado com a sintétase de acil-CoA e as razões que justificam os estudos com esta enzima são apresentadas no capítulo 3.6 (página 95). Por se entender que o enquadramento da investigação realizada era essencial para se compreender o seu significado apresenta-se uma revisão sobre a estrutura, ocorrência em seres vivos, papel biológico e metabolismo dos nucleosídeos polifosfatados assim como sobre as características mais relevantes das sintétases de acil-CoA, das luciférases de insectos coleópteros e de outras enzimas que são semelhantes a estas, quer funcional quer estruturalmente.

Com o contributo de vários autores, foi publicado em 1992, uma colecção de onze revisões abrangendo múltiplos aspectos da investigação relacionada com os dinucleosídeos polifosfatados [1-11]. Essas revisões serviram-nos como ponto de partida para a investigação bibliográfica de que damos testemunho nos primeiros quatro subcapítulos desta Introdução (1.1-1.4) e, quando um determinado aspecto da problemática apresentada já havia sido, nessa altura, objecto de revisão, tentámos ser especialmente sintéticos.

1.1- Estrutura dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados.

O termo “dinucleoside polyphosphates” (que traduziremos por dinucleosídeos polifosfatados) foi introduzido por Sillero e colaboradores em 1977 [12] para agrupar dinucleotídeos que possuem uma cadeia de fosfatos internos inacessível à acção hidrolítica de fosfátases inespecíficas.

Em todos os dinucleosídeos polifosfatados (Np_nN) relevantes no contexto desta dissertação o número de resíduos fosfato varia entre 3 e 7 ($n=3-7$) e a cadeia de fosfatos está ligada nas suas extremidades aos grupos hidroxilo 5' da ribose (ou desoxiribose) dos nucleosídeos constituintes (N) (ver Figura I). Consoante os dois resíduos nucleosídicos são iguais ou distintos assim os dinucleosídeos polifosfatados se designam como homo ou heterodinucleotídeos. De acordo com a Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica o nome químico genérico desta classe de compostos seria nucleosídeo(5')oligofosfo(5')nucleosídeo ou P_{1,P_n} -bis(5'-nucleosidil)oligofosfato [2]. Enquanto o esquema que a primeira destas expressões representa é, actualmente, usado com bastante frequência para designar individualmente estes compostos a segunda expressão tem sido ignorada. Para designar, por exemplo, o Ap_4A usam-se expressões como adenosina(5')tetrafosfo(5')adenosina, simplesmente diadenosina tetrafosfato ou mais raramente diadenosina 5',5'''- P^1,P^4 - tetrafosfato.

No contexto desta dissertação designaremos como mononucleosídeos polifosfatados os mononucleotídeos que contêm uma cadeia de quatro ou mais resíduos fosfato ligados ao grupo hidroxilo 5' da pentose (p_nN ; $n \geq 4$). Um exemplo é a adenosina tetrafosfato (p_4A).

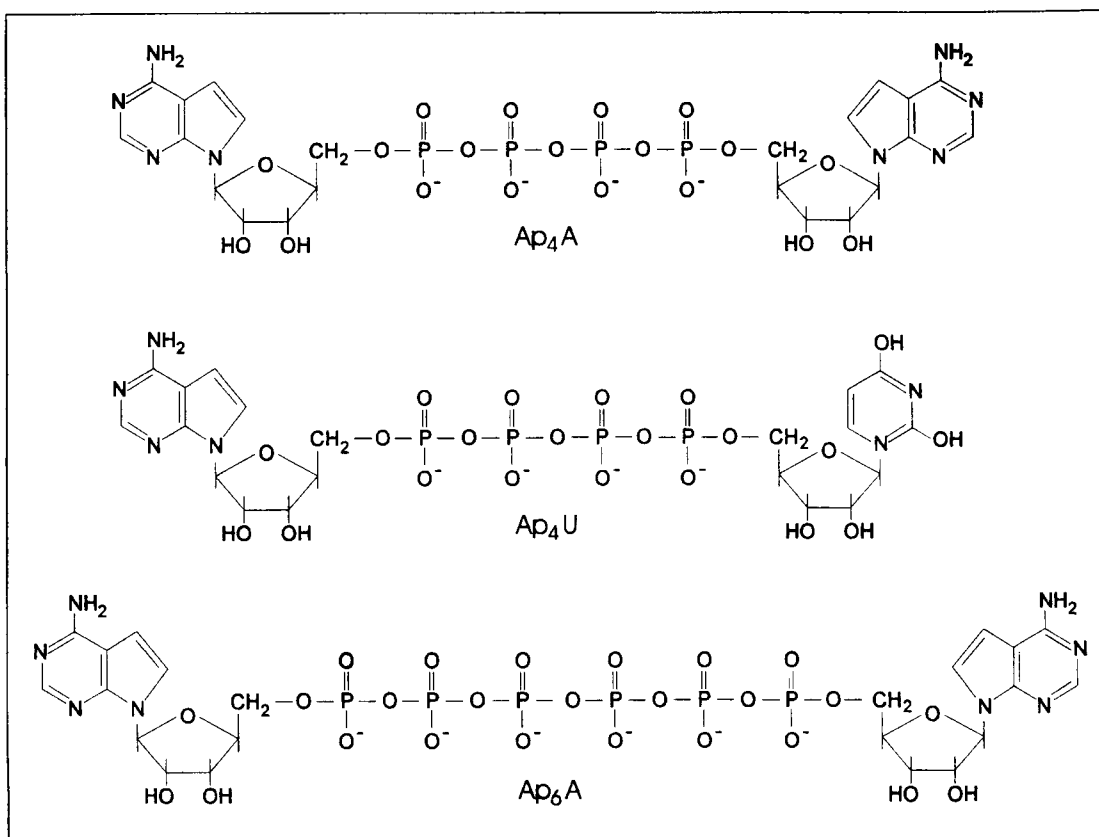


Figura I - Dinucleosídeos polifosfatados.

Fórmulas desenvolvidas da adenosina(5')tetrafosfo(5')adenosina (Ap₄A), da adenosina(5')tetrafosfo(5')uridina (Ap₄U) e da adenosina(5')hexafosfo(5')adenosina (Ap₆A).

1.2 - Distribuição e variações de concentração dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados nos seres vivos.

As primeiras referências à presença em preparações biológicas de compostos do tipo Np_nN (n≥3) foram da responsabilidade de Finamore e Warner que, na década de sessenta, descreveram a presença de Gp₄G e Gp₃G, em concentrações de ordem de grandeza mM, em gástrulas enquistadas de *Artemia salina* [13, 14].

Ainda nos anos sessenta, Zamecnik e Stephensen [15] avaliaram a concentração de Ap₄A em fígado de rato em 30 nM. Posteriormente foram sendo observadas concentrações de Ap₄A e outros dinucleotídeos, de ordem de grandeza μM ou inferior, em praticamente todas as células e tecidos examinados como, por exemplo, cérebro, coração, músculo, rim e outros tecidos de rato ou cobaio, diversas linhas celulares de mamíferos, tecidos de *Photinus pyralis*, ovócitos de *Xenopus laevis*, células embrionárias de *Drosophila*, fungos como *Physarum polycephalum* e *Saccharomyces cerevisiae* e diversos procariontes [3, 16-19].

Em determinados estudos foi encontrada uma associação entre concentrações celulares relativamente elevadas de Ap₄A e velocidades elevadas de proliferação celular [20, 21] ou determinadas fases do ciclo celular [20-22]. Esses estudos são controversos (ver capítulo 1.3.d) e, contribuindo para essa controvérsia, as concentrações mais elevadas descritas para o Ap₄A em eucariontes referem-se a tipos celulares que não se multiplicam como, por exemplo, os espermatozoides de *Psammechinus miliaris* (28 μM) [23] e, como discutido adiante, as plaquetas sanguíneas e as células cromafins da medula supra-renal.

O primeiro estudo em que se descreveram aumentos na concentração de dinucleosídeos polifosfatados em resposta a condições ambientais desfavoráveis (de valores inferiores a 1 μM para 102 μM no caso do Ap₄A) foi feito pela equipa de Ames [24] em culturas de *Salmonella*

typhimurium tratadas com um agente simultaneamente oxidante e bacteriostático: o 6-amino-7-cloro-5,8-dioxoquinolina. Posteriormente foram descritos aumentos da concentração de dinucleosídeos polifosfatados neste e noutros sistemas biológicos submetidos a condições ambientais desfavoráveis como a hipertermia [25-31], o baixo pH [32], o tratamento com etanol [26, 27, 33] ou com agentes oxidantes [24-26, 28, 29, 34, 35].

Recentemente foram descritas variações na concentração de diadenosídeos polifosfatados em duas linhas celulares derivadas de células sanguíneas humanas submetidas a tratamento pelo interferão (aumento de Ap_3A) [18], em células β dos ilhéus de Langerhans de ratinho tratadas com glicose, leucina ou α -cetoisocaproato (aumento de Ap_3A e Ap_4A) [19, 36] e no tecido muscular cardíaco de cobaia submetido a isquemia (diminuição de Ap_5A) [17].

No caso dos mononucleosídeos polifosfatados o primeiro dado apontando a possibilidade de o p_4A e o p_5A poderem existir em seres vivos foi a observação, ainda na década de cinquenta, de que certas preparações de ATP obtidas a partir de músculo de boi e de *Saccharomyces cerevisiae* continham aqueles compostos como contaminantes [37, 38]. Posteriormente, observou-se a presença de p_4A em extratos de músculo de cavalo e de coelho [39, 40] e em fígado de rato [15] tendo a sua concentração sido estimada em cerca de 1000 vezes menor que a de ATP (concentrações de ordem de grandeza μM). Concentrações mais elevadas de p_4A e p_5A (apenas 50 vezes menores que as de ATP) foram observadas em *Saccharomyces cerevisiae* durante a fase de esporulação [41].

Concentrações relativamente elevadas de diadenosídeos polifosfatados foram encontradas em plaquetas sanguíneas humanas [42-48], de rato [42], de coelho [42], de boi [44, 49] e de gato [49]. Em vários estudos com plaquetas sanguíneas humanas, os valores de concentração do Ap_4A e do Ap_3A referidos (0,4-0,51 nmol/mg de proteído) [42, 44, 45] eram, na mesma base, mais de 1000, 100 ou 10 vezes superiores aos avaliados, respectivamente, em fígado normal de ratinho [20], fígado normal de rato [50] ou células de hepatoma [20]. Num estudo recente, a equipa de Zidek doseou a concentração de diadenosídeos polifosfatados de origem plaquetária em 105 voluntários saudáveis avaliando, na mesma base, concentrações de Ap_4A e Ap_3A cerca de vinte vezes superiores às referidas acima (médias de 8,9 e 10,7 nmol/mg de proteído, respectivamente) [47]. Nas plaquetas humanas existiriam para além de Ap_4A e Ap_3A , quantidades algo menores de outros dinucleosídeos polifosfatados como Ap_5A e Ap_6A [46, 47, 51], Ap_nG e Gp_nG ($n=3-6$) [46]. De acordo com a equipa de Zidek a quantidade de Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A e Ap_6A de origem plaquetária seria, em média e por litro de sangue, de 193, 224, 100 e 32 nmol, respectivamente [47]. Tendo em conta que estes dinucleosídeos polifosfatados se armazenam nos grânulos densos das plaquetas [43, 44, 46] a concentração local nestes organelos será seguramente muito superior à que corresponde ao sangue considerado como um todo.

A avaliação feita por Sillero e colaboradores [45] da concentração de Ap_4A nos grânulos cromafins da glândula supra-renal bovina (0,15 nmol/mg de proteído) aponta para valores de concentração da mesma ordem de grandeza dos determinados nas plaquetas. No entanto, um estudo da equipa de Miras-Portugal [52] refere concentrações de 32 nmol/mg de proteído o que corresponderia, de acordo com estes autores, a cerca de 6 mM. A equipa de Miras-Portugal descreveu ainda a presença de Ap_5A e Ap_6A nos grânulos cromafins da glândula supra-renal bovina [52, 53] e de Ap_4A e Ap_5A em vesículas sinápticas do órgão eléctrico do *Torpedo* em concentrações estimadas em 5-10 mM [54]. Em terminais sinápticos de cérebro de rato a mesma equipa descreveu a presença de Ap_4A e Ap_5A (cerca de 0,16 nmol/mg de proteído) [55].

A presença de p_4A na medula supra-renal bovina [45, 56, 57] assim como em plaquetas sanguíneas de coelho [58] também foi descrita. Na medula supra-renal bovina a sua concentração, avaliada no laboratório de Sillero e Sillero, seria de 0,18 nmol/mg de proteído

[45]; nos grânulos cromafins foi avaliada no laboratório de Miras-Portugal em 2,2 nmol/mg de proteído [57]. A concentração de p_4A nas plaquetas sanguíneas de coelho avaliada por Lee e colaboradores (0,62 nmol/ 10^9 plaquetas) [58] era, na mesma base, da mesma ordem de grandeza das do Ap_4A e do Ap_3A , avaliadas por Luthje e Ogilvie em plaquetas sanguíneas humanas [43].

Recentemente descreveu-se a presença de Ap_2A (e também Ap_3A) em grânulos específicos do miocárdio de porco, presumindo-se que os mesmos nucleotídeos observados no tecido muscular cardíaco humano tenham igual localização intracelular [59]. A descrição da presença de Ap_7A em plaquetas sanguíneas humanas, em concentrações algo inferiores às dos outros diadenosídeos polifosfatados, foi também muito recentemente publicada [48].

1.3 - Papel biológico dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados.

1.3.a- Aspectos gerais.

Nas décadas de setenta e oitenta a maioria dos trabalhos sobre o papel biológico dos mono e dinucleosídeos polifosfatados visavam o estudo destes compostos enquanto mediadores intracelulares, mas a descoberta da sua existência em organelos secretores veio provocar nos últimos anos uma mudança na orientação geral desta investigação. Neste contexto, a história da investigação do papel biológico dos dinucleosídeos polifosfatados tem alguns aspectos curiosos. Depois de ter sido seriamente contestado o papel que lhes foi atribuído como indutores da proliferação celular actuando como mediadores intracelulares (ver capítulo 1.3.d) foram obtidos resultados experimentais que apoiam a possibilidade de poderem ter, de facto, esse papel mas actuando em receptores da superfície celular (ver capítulo 1.3.c.3).

Denotando a actualidade e o dinamismo da investigação do papel biológico dos mono e dinucleosídeos polifosfatados, nomeadamente o seu papel como mediadores extracelulares, diferentes aspectos desta problemática foram objecto de revisões na última década [6, 7-9, 60-73].

1.3.b- Efeito de dinucleosídeos polifosfatados na actividade biológica de enzimas e outros proteídos intracelulares.

1.3.b.1- Efeitos no metabolismo das purinas.

O papel de activador enzimico foi pela primeira vez associado a um dinucleosídeo polifosfatado quando, em 1976, a equipa de Sillero e Sillero publicou o efeito do Gp_4G sobre a redútase de GMP de *Artemia salina* [74]. A gástrula de *Artemia salina* é incapaz de realizar a síntese *de novo* de purinas e, durante o seu desenvolvimento a larva nadadora, o Gp_4G acumulado nos cistos é utilizado como fonte de purinas; o efeito activador acima referido poderia ser essencial na conversão de nucleotídeos de guanina em nucleotídeos de adenina [60]. O efeito activador do Gp_4G sobre a redútase do GMP, foi posteriormente confirmado na enzima de eritrócitos humanos [75]. Na presença de Gp_4G a actividade da redútase de GMP podia aumentar para o dobro, sendo o valor do K_a de 30 nM [74]. Para além do Gp_4G também concentrações submicromolares de vários nucleotídeos de guanosina e desoxiguanosina, particularmente o dGTP, podem activar a redútase de GMP presumindo-se que partilham um mesmo local de ligação na enzima [75].

A simetria aparente das vias metabólicas dos nucleotídeos púricos inspirou o estudo do efeito do Ap_4A na desaminase de AMP de músculo de rato [76]. Em coerência com a simetria destas vias metabólicas, o Ap_4A podia activar esta hidrólase ($K_a=5 \mu M$) [76]. Nenhum dos outros nucleotídeos estudados era activador sendo que, curiosamente, o ATP era

inibidor [76]. Recentemente, Delaney e colaboradores [77] observaram que o Ap_5A e o Ap_6A também eram activadores da desaminase de AMP de cérebro de rato.

A 5'-nucleotidase citosólica com especificidade em relação GMP e IMP pode, *in vitro*, catalisar quer a hidrólise quer a síntese (fosfotransferência) destes nucleotídeos desconhecendo-se qual das actividades predomina *in vivo* [78, 79]. O efeito activador do Ap_4A (em concentrações de ordem de grandeza μM) na actividade hidrolítica observou-se, primeiramente, nas enzimas de *Artemia salina* e fígado de rato no laboratório de Sillero e Sillero [80] e foi posteriormente confirmado, usando este e outros dinucleotídeos contendo adenina (Ap_5A , Ap_6A , Ap_4G , Ap_4I e Ap_4X), na enzima de pulmão de porco [81] e, muito recentemente, na de cérebro de rato [82]. O efeito activador dos dinucleosídeos polifosfatados também foi observado na actividade de fosfotransferência [82, 83]. O efeito activador do Ap_4A era partilhado pelo ATP; os efeitos não eram aditivos para concentrações saturantes dos dois compostos e presume-se a existência de um local de ligação comum na enzima [82, 84].

Efeitos inibidores do Gp_4G foram descritos em duas enzimas de *Artemia salina* envolvidas no metabolismo de nucleotídeos: a sintétase de adenilo-succinato [85] e a desidrogénase de IMP [86]. Os efeitos eram de tipo competitivo em relação ao GTP e ao IMP, respectivamente. Apesar dos valores dos K_i serem relativamente elevados (cerca de 100 μM) as altas concentrações de Gp_4G nos cistos deste crustáceo [13, 14] sugerem a possibilidade destes efeitos inibidores poderem ter significado fisiológico neste ser vivo.

O Ap_6A , mas não outros diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA ; $n=2-5$), estimulava sinergicamente a ciclase de guanilato de cerebello de rato ($K_a=1 \mu\text{M}$) quando esta actividade enzimica foi estudada na presença de nitroprussiato de sódio [87].

1.3.b.2- Os dinucleosídeos polifosfatados como iniciadores da síntese de polinucleotídeos.

Está descrito que dinucleosídeos polifosfatados podem, *in vitro*, funcionar como iniciadores ("primers") na actividade enzimica das polimerases de RNA, DNA e poli(ADP-ribose) e ainda da sintétase de (2'-5')oligoadenilato [8, 88, 89].

A sintétase de (2'-5')oligoadenilato é uma enzima induzida pelo interferão que catalisa a síntese de oligonucleotídeos de adenina em que os resíduos fosfato ligam em ponte os grupos hidroxilo 2' e 5' de distintas unidades adenilato. Observou-se, recentemente, que o Ap_3A pode funcionar como iniciador na síntese destes oligonucleotídeos [88]. Dado o baixo K_m do Ap_3A (14 μM [88]) e o facto de o interferão também provocar, adicionado ao meio de cultura de determinadas linhas celulares, aumento da concentração de Ap_3A [18], admitiu-se que este dinucleotídeo poderia ser o substrato natural da sintétase de oligoadenilato em análise [88].

1.3.b.3- Os dinucleosídeos polifosfatados como análogos de estados de transição de cínases.

Determinados dinucleosídeos polifosfatados podem inibir *in vitro* a actividade da cínase do adenilato [90-92], da cínase do timidilato [93, 94], da cínase da adenosina [77, 93, 95], da cínase da timidina [96, 97] e de outras cínases de desoxinucleosídeos [97, 98]. A estrutura dos dinucleosídeos polifosfatados levou à formulação da hipótese que estes compostos, quando ligados no centro activo destas cínases, seriam análogos de estados de transição; quando o mecanismo reactivo é de tipo sequencial os dois substratos, ligados de forma adequada no sítio activo da enzima, poderiam assemelhar-se à estrutura química de dinucleosídeos polifosfatados [8, 90, 91]. Estudos de cristalografia de raios X em complexos contendo cínases de adenilato de diversas origens e Ap_5A [99-102] ou a cínase de timidilato de *Saccharomyces cerevisiae* e Ap_5dT [103] vieram, recentemente, confirmar estas suspeitas.

Como seria de prever existe uma relação entre o tipo de substratos que interagem com essas enzimas e o tipo de bases constituintes dos dinucleosídeos polifosfatados que podem exercer acções inibidoras. Assim, está descrito que o Ap₅A é um potente inibidor da cínase do adenilato mas já o Ap₅G e o Ap₅U são muito menos potentes [92]. No caso das cínases do timidilato, da timidina, da desoxicitidina, da desoxiguanosina e da desoxiadenosina o efeito inibidor é preferentemente exercido por dinucleosídeos polifosfatados que contém simultaneamente adenosina e o nucleosídeo (ou o nucleotídeo) aceitador de fosfato correspondente [94, 96, 97].

Curiosamente, não existe coincidência entre o somatório do número de fosfatos dos substratos e o número de fosfatos dos dinucleosídeos polifosfatados mais eficazes na sua acção inibidora. No caso da cínase do adenilato o Ap₅A é muito mais potente que o Ap₄A [91, 92]; no caso da cínase de timidilato o Ap₅dT e o Ap₆dT são muito mais potentes que o Ap₄dT [94]; no caso da cínase de adenosina o Ap₄A e o Ap₅A são muito mais potentes que o Ap₃A [93, 77] e no caso da cínase de timidina o Ap₆dT, o Ap₅dT e o Ap₄dT são muito mais potentes que o Ap₃dT [96].

A capacidade inibidora do Ap₅A na cínase de adenilato ($K_i=2,5$ nM [91]) tem sido explorada no doseamento sérico da cínase da creatina; a adição de Ap₅A ao soro permite o doseamento desta enzima mesmo quando o soro está contaminado com a cínase de adenilato [92, 104, 105]. A elevada afinidade entre o Ap₅A e a cínase de adenilato, o Ap₄dG e a cínase de desoxiguanosina, o Ap₄dC e a cínase de desoxicitidina e o Ap₄dT e a cínase da timidina foi explorada na purificação destas enzimas tendo sido usados como ligandos específicos em cromatografia de afinidade [97, 106].

1.3.b.4- Efeitos sobre o metabolismo intracelular do Ca²⁺ e canais de K⁺.

O efeito dos dinucleosídeos polifosfatados sobre o metabolismo intracelular do Ca²⁺ pode resultar da interacção com receptores da superfície celular [107-118] mas também estão descritos efeitos resultantes da interacção directa com proteídeos intracelulares ou com locais de ligação situados na face citoplasmática de proteídeos da membrana celular.

O efeito modulador de compostos contendo adenina sobre o efeito do inositol-1,4,5-trifosfato nos reservatórios intracelulares de Ca²⁺ foi recentemente estudado em culturas de células musculares lisas permeabilizadas pela saponina [119]. Observou-se que os diadenosídeos polifosfatados estudados (Ap_nA; n=3-6) estimulavam a acção libertadora do inositol-1,4,5-trifosfato; o efeito era igual ao que podia ser observado com o ATP e de muitos outros compostos contendo adenina [119]. O Ap₄A, o Ap₅A e o Ap₆A, mas não o Ap₃A, também estimulavam, de forma muito marcada, a libertação de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático de coelho, interagindo com o canal de cálcio induzido pelo cálcio [120].

O efeito dos Ap_nA (n=3-6) na ATPase dependente de cálcio foi estudado em membranas de eritrócitos humanos tendo-se observado activação, presumivelmente de tipo alostérico [121]. O Ap₆A, o mais potente dos dinucleotídeos estudados, provocava em concentrações saturantes uma activação superior a 4 vezes sendo o valor de K_a de 17 μ M [121].

Estes dados apontam no sentido de os dinucleosídeos polifosfatados poderem ter um duplo papel modulador no metabolismo celular do Ca²⁺: por um lado facilitariam a libertação de Ca²⁺ das reservas intracelulares mas também podiam estimular a recuperação dos níveis basais após aumentos da sua concentração no citosol.

O papel de dinucleosídeos polifosfatados como mediadores intracelulares induzindo efeitos no estado de polarização do miocárdio [17, 122-124] ou das células β dos ilhéus de Langerhans [19] foi recentemente objecto de estudo. Os diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA; N=3-6) seriam potentes inibidores dos canais de potássio sensíveis ao ATP, actuariam na face citosólica da membrana celular e o valor do I_{50} seria de cerca de 15 μ M em qualquer dos casos

[17, 19, 36, 122-124]. O Ap_5A foi doseado em concentrações de cerca de $7\text{ }\mu\text{M}$ no tecido muscular cardíaco de cobaio baixando para valores submicromolares quando este era previamente submetido a isquemia [17]. Admitiu-se a possibilidade de o Ap_5A funcionar como um regulador fisiológico destes canais; a diminuição da sua concentração durante a isquemia induziria hiperpolarização do miocárdio aumentando desta forma as probabilidades de sobrevivência celular [17]. Foi também observado que a concentração intracelular de Ap_3A e de Ap_4A pode aumentar de valores submicromolares para valores de cerca de $12\text{ }\mu\text{M}$ quando células β dos ilhéus de Langerhans de ratinho em cultura eram estimuladas com substâncias (glicose, leucina e α -cetoisocaproato) que também induziam a secreção de insulina [19, 36]. O efeito inibidor do Ap_4A nos canais de K^+ não era influenciado pela presença simultânea de ATP (e vice-versa) tendo-se admitido que existiriam locais de ligação independentes para os dois compostos e que os dinucleotídeos Ap_3A e Ap_4A poderiam ser segundos mensageiros no processo de estimulação da secreção de insulina [19, 36].

Outros efeitos resultantes da interacção de dinucleosídeos polifosfatados com proteínas intracelulares serão discutidos em capítulos individualizados (capítulos 1.3.d, 1.3.e e 1.3.f) depois do capítulo que se segue e que, pela sua actualidade, queríamos destacar.

1.3.c- Secreção de dinucleosídeos polifosfatados por plaquetas sanguíneas, medula supra-renal e outras células neuronais. Efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares.

1.3.c.1- Secreção de dinucleosídeos polifosfatados para o meio extracelular.

Como já referido no capítulo 1.2 está descrita a ocorrência de dinucleosídeos polifosfatados, em concentrações relativamente elevadas, nos grânulos densos de plaquetas sanguíneas humanas [42-48, 51] e outros animais [42, 44, 49], nos grânulos cromafins da glândula supra-renal bovina [45, 52, 53], em terminais sinápticos cerebrais de rato [55] e em vesículas sinápticas do órgão eléctrico do *Torpedo* [54].

Constituem evidências a favor da localização dos dinucleosídeos polifosfatados nos grânulos densos das plaquetas a observação de que os dinucleosídeos polifosfatados são segregados por plaquetas normais estimuladas por trombina [42, 43, 46, 48, 51] e que a quantidade de Ap_4A está drasticamente diminuída nas plaquetas de mamíferos (homens, bois ou gatos) com um síndrome raro em que os grânulos densos estão ausentes (síndrome de Chédiak-Higashi) [44, 49]. Nas plaquetas humanas normais as concentrações do Ap_4A e do Ap_3A seriam entre 40 e 100 vezes inferiores às do ATP ou do ADP [42-44] e a do Ap_7A , o menos abundante dos diadenosídeos polifosfatados, entre 200 e 500 vezes [48].

A secreção dos dinucleotídeos ocorre em paralelo com a da serotonina e a dos mononucleotídeos (ATP, ADP, GTP e GDP) contidos nos grânulos densos [42, 43]. Supondo que todo o conteúdo em Ap_3A e Ap_4A das plaquetas de um indivíduo adulto era libertado no sangue a concentração destes dinucleotídeos poderia atingir no plasma valores na ordem de $0,2\text{-}1\text{ }\mu\text{M}$ [9, 47] mas, a concentração entre o trombo e a parede vascular será, presumivelmente, muito mais elevada. A síntese de dinucleosídeos polifosfatados parece não ocorrer nas plaquetas maduras presumindo-se que o processo de síntese e acumulação dentro dos grânulos tenha lugar nas células precursoras, os megacariócitos [42].

O nucleotídeo mais abundante nos grânulos cromafins da medula supra-renal bovina é o ATP [45, 52, 125]. A razão entre as concentrações de ATP e Ap_4A , tanto na medula supra-renal como nos grânulos cromafins é, de acordo com Sillero e colaboradores [45], cerca de 4000. Um valor próximo de 30 para esta mesma razão foi avaliado por outros investigadores [52]. Tendo em conta a rápida hidrólise do ATP e a relativa estabilidade do Ap_4A no líquido de perfusão recolhido após estimulação da glândula supra-renal bovina [126] o maior dos dois

valores acima referidos poderia corresponder ao da razão $[ATP]/[Ap_4A]$ na glândula *in vivo*. A secreção paralela de catecolaminas e Ap_4A e a dificuldade em avaliar a secreção de ATP levou a equipa de Sillero e Sillero a propor o uso da monitorização da secreção de Ap_4A como um indicador da secreção da medula supra-renal [126]. A síntese de dinucleosídeos polifosfatados não foi, até ao momento, objecto de estudo em células cromafins; o seu transporte através da membrana dos grânulos cromafins parece ocorrer através de sistemas de transporte comuns com os do ATP [127].

A libertação do Ap_4A e do Ap_5A , presente em terminais sinápticos isolados de cérebro de rato (ver capítulo 1.2), podia ser induzida por agentes que causam a despolarização da membrana [55]. Os mesmos estímulos induziam também a libertação de ATP e a concentração deste mononucleotídeo seria 20 a 30 vezes superior à dos dinucleotídeos quer nos terminais sinápticos quer na mistura segregada [55]. A libertação de Ap_4A e Ap_5A foi também estudada em ratos conscientes usando um sistema de perfusão intracerebral: a libertação destes diadenosídeos polifosfatados pelo corpo estriado era induzida pela administração sistémica de anfetamina [128, 129]. Nestes estudos, a presença de ATP ou ADP no líquido perfundido foi dificilmente observada, mas as concentrações de AMP e adenosina aumentavam como resposta ao estímulo o que sugere a presença de ecto-ATPases e ecto-ADPases muito activas neste local do cérebro; o somatório das concentrações de adenosina e AMP podia atingir valores quase 20 vezes superiores às dos dinucleotídeos [129].

Nas vesículas sinápticas do órgão eléctrico do *Torpedo*, o Ap_4A e o Ap_5A eram armazenados junto com a acetilcolina, o ATP e outros mononucleotídeos; a concentração total dos mononucleotídeos era 20 a 40 vezes superior à dos dinucleotídeos [55].

1.3.c.2- Metabolismo extracelular de mono e dinucleotídeos.

Após a libertação no meio extracelular, o ATP, os dinucleosídeos polifosfatados e os seus produtos de hidrólise poderão interagir com receptores da superfície celular e modular uma variedade de processos como segregação plaquetária ou da medula supra-renal, transmissão neuronal, tono do músculo liso vascular e de outros tecidos, proliferação celular, função cardíaca, metabolismo glicídico, pH celular e função dos neutrófilos.

Como já abordado, a propósito da secreção pela medula supra-renal bovina e pelos neurónios do corpo estriado de rato, a semi-vida dos dinucleotídeos pode ser muito superior à dos mononucleotídeos possibilitando um tempo de actuação mais prolongado e a interacção com células alvo relativamente afastadas do local de secreção [9, 126, 128, 129]. Uma experiência curiosa de Busshardt e colaboradores [130] em que dois fígados de rato foram perfundidos sendo o segundo perfundido com o efluente do primeiro ilustra esta afirmação; enquanto o Ap_4A podia provocar efeitos (vasoconstrição e libertação de glicose) quer no primeiro quer no segundo fígado, o ATP apenas produzia esses efeitos no primeiro.

No sangue, os mononucleotídeos e os dinucleotídeos sofrem um processo de hidrólise por etapas, com formação final de nucleosídeos, em que intervêm muitas enzimas, quer plasmáticas quer ectoenzimas da superfície das células como fosfodiesterases e fosfatases [5, 9, 131, 132]. Luthje e Ogilvie compararam *in vitro* as semi-vidas do ATP e do Ap_4A (concentração inicial de $0,7 \mu M$) tanto no plasma como no sangue total [132]. Embora no plasma as semi-vidas do ATP e do Ap_4A tivessem valor semelhante, no sangue total, em consequência da baixa actividade das fosfodiesterases dos eritrócitos, leucócitos e plaquetas relativamente aos dinucleotídeos, o valor da semi-vida do Ap_4A era quase o triplo da do ATP (5,9 e 2,2 minutos, respectivamente) [132].

Em culturas de células cromafins de medula supra-renal bovina o valor do V_{max} relativo à hidrólise do ATP e ADP, por acção de ecto-hidrolases, era mais de 10000 vezes superior ao do valor correspondente para o caso dos dinucleosídeos polifosfatados [133, 134].

Para além dos casos acima referidos a baixa velocidade de hidrólise dos dinucleotídeos relativamente ao ATP (e ADP) por acção de ecto-hidrólases também foi observada em experiências em que se usaram artérias mesentéricas [135] e coronárias de coelho [136], tecido cardíaco de cobaio [137], *muscularis mucosae* de cólon de rato [138], células endoteliais de aorta de boi [139, 140], hepatócitos isolados de rato [141] e preparações de membranas de hepatócitos de rato [142] ou de coração de ratinho [143]. Em qualquer destes sistemas a diferença entre a estabilidade dos dinucleosídeos polifosfatados e a do ATP era, aparentemente, mais acentuada que a observada por Luthje e Ogilvie no sangue total [132]. Além disso, a presença do ATP, que é libertado conjuntamente com os dinucleosídeos polifosfatados, diminui a velocidade de hidrólise destes compostos contribuindo para aumentar ainda mais a sua semi-vida [132, 139, 144]. Pelo contrário, reflectindo a existência de enzimas na face externa das membranas celulares com capacidade para catalisar a hidrólise dos mononucleotídeos mas não a dos dinucleotídeos, pelo menos nas células endoteliais de aorta de porco, a hidrólise do ATP não era inibida pelo Ap_3A [144].

1.3.c.3- Efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares.

A história da investigação dos efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados como indutores de efeitos biológicos interagindo com receptores da superfície celular começou ainda antes de se ter descoberto a sua existência em organelos secretores.

Em 1975, Harrison e Brossmer [145] estudaram o efeito deste tipo de compostos (Ap_nA ; $n=2-6$) na agregação (induzida por ADP) de plaquetas lavadas e também em plasma rico em plaquetas, tendo concluído que todos eram inibidores competitivos com o ADP. O mais potente era o Ap_5A ; o Ap_5A e o Ap_4A eram mais potentes que o ATP e a adenosina [145].

O efeito inibidor do Ap_4A foi, já nos anos oitenta, confirmado pelas equipas de Ogilvie [146] e Zamecnik [147] usando plasma rico em plaquetas. Os efeitos inibidores do Ap_5A e do Ap_6A foram também recentemente confirmados e a recente descoberta de que o Ap_7A existe e é segregado pelas plaquetas motivou o estudo do efeito deste composto que se revelou também inibidor [48]. Os trabalhos da equipa de Ogilvie mostraram que, no plasma rico em plaquetas, o Ap_3A podia induzir agregação plaquetária a uma velocidade ligeiramente inferior à do ADP e que este efeito activador resultava da presença de fosfodiesterases plasmáticas que catalisam a hidrólise do Ap_3A originando ADP [146, 148]. Em sistemas experimentais, como plaquetas lavadas, em que as fosfodiesterases estão praticamente ausentes o Ap_3A não tinha efeito activador [9].

Na sequência da descoberta de diadenosídeos polifosfatados na medula supra-renal estudaram-se os possíveis efeitos destes compostos em culturas de células cromafins [112, 149]. O Ap_3A , o Ap_4A e o Ap_5A (100 μM) podiam estimular a secreção basal de catecolaminas [149]. O efeito era inibitório em células cromafins estimuladas por agonistas nicotínicos [149], um efeito que havia já sido observado com o ATP [150].

No cérebro os efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados foram pela primeira vez estudados no início da década de oitenta. Em experiências realizadas em ratos anestesiados e em fatias de córtex cerebral de rato, observou-se que o Ap_3A e o Ap_5A inibiam o desenvolvimento de potenciais de acção e estimulavam a libertação de adenosina [151]. Já em meados da década de noventa, Pintor e Miras-Portugal mostraram que o Ap_5A e o Ap_4A , tal como o ATP, induziam a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular para terminais sinápticos de cérebro de rato [113]. No entanto, ao contrário do observado no caso do ATP, o efeito dos diadenosídeos polifosfatados não era inibido pela suramina, um inibidor dos receptores purinérgicos/pirimidinérgicos de tipo P2, nem ocorria dessensibilização cruzada entre os diadenosídeos polifosfatados e o ATP [113]. Resultados de teor semelhante foram também

observados em terminais sinápticos isolados de cérebro de ratinho [114], de cerebelo, diencefalo e tronco cerebral de cobaio [152] e de córtex humano [153]. Este efeito seria antagonizável de forma muito específica pelo Ip_5I [153, 154], um composto que pode ser obtido por desaminação enzimática do Ap_5A [154, 155]. Em terminais sinápticos isolados de cérebro de rato, o Ip_5I inibia o aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico induzido quer pelo Ap_5A quer pelo ATP, mas o valor do I_{50} era 6000 vezes menor quando o indutor era o Ap_5A [154].

Em nervos periféricos, os diadenosídeos polifosfatados também poderão ter efeitos moduladores importantes. Observou-se que este tipo de compostos inibiam as libertações de CGRP (polipeptídeo relacionado com o gene da calcitonina) [156], acetilcolina [157] ou ATP [158], induzidas por estimulação eléctrica, na aurícula de cobaio, em terminais colinérgicos de íleo de cobaio ou em nervos simpáticos do canal deferente também de cobaio, respectivamente.

Os dinucleosídeos polifosfatados podem interagir com receptores das células endoteliais e fibras musculares dos vasos sanguíneos exercendo controlo sobre o tono vascular.

O primeiro estudo sobre os efeitos dos diadenosídeos polifosfatados a nível vascular foi feito pela equipa de Ogilvie, nos finais dos anos oitenta, em artérias mesentéricas perfundidas de coelho previamente contraídas pela noradrenalina [135]. Observou-se que, em concentrações de 1-10 μM , o Ap_4A , tal como o ATP, induzia vasodilatação quando o endotélio estava intacto e vasoconstrição quando o endotélio tinha sido previamente removido [135]; no caso do Ap_3A o efeito era sempre vasodilatação independentemente de o endotélio estar ou não intacto [135]. A seguir a este estudo muitos outros foram realizados em vasos isolados como a artéria umbilical humana [159], a artéria mesentérica [160] ou renal de rato, retalhos de aorta ou anéis aórticos de rato [51, 109] mas também em órgãos isolados perfundidos como coração de coelho [136] ou de cobaio [59], rim [48, 51, 161, 162] ou fígado de rato [130] ou mesmo em animais vivos como o cão [163-165], o porco [166, 167], o rato [51, 168] e também o homem [169]. Dependendo do sistema em estudo e do número de fosfatos internos dos diadenosídeos polifosfatados testados, observaram-se em certos casos efeitos vasodilatadores [59, 136, 160-164, 166-169] e noutros efeitos vasoconstritores [48, 51, 109, 159-162, 168].

O Ap_3A e o Ap_4A podem, em determinadas condições experimentais, induzir relaxamento da musculatura lisa vascular, tendo este efeito sido observado quer *in vitro* [135, 136, 160-162] quer em animais conscientes [168] ou anestesiados [163-167] incluindo o homem [169]. O endotélio poderá ter um papel determinante nestes efeitos [135, 136, 160]. Foi recentemente demonstrado que o Ap_4A (mas não o Ap_3A , o Ap_5A e o Ap_6A) induz a síntese de óxido nítrico em células endoteliais bovinas em cultura [140]. Existem outras evidências de que este fenómeno pode estar na base dos efeitos vasodilatadores dependentes do endotélio induzidos pelo Ap_4A em artérias mesentéricas e coronárias de coelho [135, 136] como, por exemplo, a marcada diminuição do efeito do Ap_4A induzida por um inibidor da síntese de óxido nítrico, o L-NNA (N-nitro-L-arginina) [136].

Na artéria mesentérica de rato observou-se que, na ausência de tratamento vasoconstritor prévio, o efeito dos diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA ; $n=4-6$) seria sempre vasoconstrição e que o Ap_5A e o Ap_6A eram mais potentes que o Ap_4A [160]. Em rim perfundido e em anéis aórticos de rato tanto o Ap_5A como o Ap_6A , em concentrações tão baixas como 1-10 nM, provocavam vasoconstrição [51, 161]. A injeção intra-aórtica destes dois dinucleotídeos provocava hipertensão prolongada no rato mas este efeito não foi observado quando se injectou uma quantidade igual de ATP, Ap_3A ou Ap_4A [51]. A maior potência destes dinucleotídeos relativamente ao ATP na indução de vasoconstrição [160] poderia, pelo menos parcialmente, explicar os efeitos hipertensores do Ap_5A e Ap_6A não partilhados pelo ATP [51].

O efeito de um determinado diadenosídeo polifosfatado num determinado sistema vascular dependeria da sua capacidade relativa para se ligar e activar os receptores envolvidos nos processos de vasoconstrição ou vasodilatação e o número de fosfatos do diadenosídeo polifosfatado é um factor de discriminação essencial entre os dois efeitos antagónicos que podem ser obtidos [48, 160]. Na artéria mesentérica isolada [160] e no rim isolado de rato [161] o Ap_5A e o Ap_6A provocavam sempre vasoconstrição enquanto o Ap_3A , quando o tono vascular era previamente aumentado, provocava vasodilatação. O sistema vascular renal parece ser particularmente sensível aos efeitos vasoconstritores dos diadenosídeos polifosfatados com um número de resíduos fosfato igual ou superior a quatro [109], incluindo nestes, o Ap_7A [48]. No rato consciente, a infusão intravascular de Ap_5A ou Ap_6A provocava hipertensão e vasoconstrição mesentérica enquanto o Ap_4A ou o Ap_3A induziam efeitos opostos [168]. Curiosamente, neste modelo de estudo *in vivo*, os quatro dinucleotídeos provocavam vasoconstrição a nível renal [168].

Recentemente, a descoberta de que existem heterodinucleosídeos polifosfatados de adenina e guanina e homodinucleosídeos polifosfatados de guanina nas plaquetas sanguíneas motivou estudos de função destes compostos [46]. Em rim perfundido de rato o Ap_6G e o Ap_5G provocavam vasoconstrição em concentrações iguais ou superiores a $0,1 \mu M$; o Ap_4G e o Ap_3G eram muito menos potentes e os homodinucleosídeos polifosfatados de guanina (Gp_nG ; $n=3-6$) não tinham qualquer efeito relaxante ou contráctil [46].

O efeito de diferentes diadenosídeos polifosfatados na contractilidade do canal deferente de rato [170] ou de cobaio [158, 171-174], na bexiga humana [175] ou de cobaio [115, 170], na *taenia caeci* de cobaio e na *muscularis mucosae* de cólon de rato [138] também foi estudada.

No canal deferente e na bexiga os diadenosídeos polifosfatados com número de fosfatos igual ou superior a 4 (Ap_nA ; $n=4-6$) induziam, mesmo em concentrações submicromolares, contracções do músculo liso [170, 171, 173]. No canal deferente de cobaio o Ap_5A era cerca de 100 vezes mais potente que o ATP [171]. Demonstrou-se que o efeito contráctil do ATP e do Ap_5A no canal deferente do cobaio podia ser bloqueado pelo Ip_5I [174]. Também na *muscularis mucosae* de cólon de rato os diadenosídeos polifosfatados testados (Ap_nA ; $n=3-6$) tinham, tal como o ATP, um efeito contráctil; o Ap_3A e o Ap_4A eram mais potentes que o ATP [138]. Na *taenia caeci* de cobaio os mesmos dinucleotídeos (Ap_nA ; $n=3-6$) tinham, pelo contrário, efeitos relaxantes sendo que, também aqui, o Ap_3A e o Ap_4A eram, neste efeito relaxante, mais potentes que o ATP [138].

Dois estudos independentes publicados em 1995 pelos laboratórios de Zidek [176] e de Ogilvie [177] mostraram que os diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA ; $n=3-6$) estimulavam a incorporação de timidina marcada no DNA e a velocidade de multiplicação celular em culturas de células mesangiais de rato. O efeito era sinérgico com o de outros compostos libertados pelas plaquetas como o PDGF (factor de crescimento derivado das plaquetas) [176, 177], o EGF (factor de crescimento epidérmico) e a serotonina [177]. Os dinucleosídeos polifosfatados eram activos em concentrações em que os seus produtos de hidrólise (ATP, ADP, AMP e adenosina) não tinham qualquer efeito mas o Ap_4A não provocava estimulação adicional em culturas contendo concentrações relativamente elevadas de ATP [177].

Recentemente, estudou-se o efeito dos heterodinucleosídeos polifosfatados de adenina e guanosina (Ap_nG ; $n=3-6$) assim como o dos diguanosídeos polifosfatados (Gp_nG ; $n=3-6$) na velocidade de incorporação de timidina marcada no DNA de células musculares lisas vasculares de rato em cultura [46]. Quando adicionados isoladamente o efeito estimulador podia ser apreciado em concentrações de $0,1 \mu M$; como activadores do efeito do PDGF eram ainda mais potentes [46]. Embora não seja de excluir o possível envolvimento de produtos de hidrólise, tendo em conta a maior potência dos dinucleotídeos relativamente a estes produtos

assim como a observação de que a sua semi-vida era, no meio de cultura, de cerca de uma hora, admitiu-se que o efeito era da responsabilidade directa dos dinucleotídeos [46].

Com a intenção de estudar o efeito de diversos diadenosídeos polifosfatados na função cardíaca foram, recentemente, realizados trabalhos de investigação em preparações auriculares e ventriculares de cobaio [59, 137, 156, 178, 179], rato [178], ratinho [178] e cão [180] assim como de pacientes humanos que sofreram transplante cardíaco [178, 179].

O efeito na frequência cardíaca foi estudado em preparações auriculares de cobaio em contracção rítmica espontânea; neste sistema os diadenosídeos polifosfatados tinham efeito cronotrópico negativo [178, 179]. Embora o efeito mais frequentemente observado em preparações cardíacas tenha sido de tipo inotrópico negativo [59, 137, 156, 178-180], em alguns estudos observou-se que, na presença de antagonistas de receptores P₁, o efeito obtido era de tipo inotrópico positivo [137, 178]. Em tecido miocárdico humano insuficiente este efeito positivo foi mesmo observado na ausência dos referidos antagonistas [178].

No final da década de oitenta, Busshardt e colaboradores observaram que o Ap₃A e o Ap₄A eram capazes de induzir a libertação de glicose em fígado perfundido de rato sendo, neste sistema experimental, mais potentes que o ATP [130]. Estudos usando suspensões de hepatócitos mostraram que a enzima estimulada era a fosforílase do glicogénio [130, 141, 181]. Neste sistema de estudo as potências do ATP e de vários diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA; n=3-6) eram muito semelhantes [141].

Em suspensões de tubos próximos renais de rato, observou-se recentemente que os diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA; n=3-6) tinham um efeito estimulador discreto na gliconeogénese [182].

Em células isoladas do ducto colector cortical de rato o Ap₄A, o Ap₅A e o Ap₆A estimulavam a velocidade de excreção de prótons activando o trocador Na⁺/H⁺ [183].

O efeito dos dinucleosídeos polifosfatados nos neutrófilos foi recentemente estudado pela equipa de McLennan. O Ap₄A e o Ap₃A podiam sensibilizar estas células para o efeito estimulador da síntese de compostos oxidantes induzido pelo formil-metionil-leucil-fenilalanina sendo, no entanto, menos potentes que o ATP [184]. Os diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA; n=3-6) também diminuía a percentagem de neutrófilos com sinais de “apoptose” após incubação de 24 horas a 37°C; neste efeito a sua potência era semelhante à do ATP [185, 186].

1.3.c.4- Os dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares: possível significado fisiológico ou patológico.

Uma das possíveis objecções ao possível significado fisiológico dos efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados como mediadores extracelulares é a sua baixa concentração relativamente à dos mononucleotídeos, nomeadamente o ATP, que são conjuntamente segregados; a provar-se a ausência de receptores específicos e admitindo potências semelhantes os seus efeitos poderiam ser considerados pouco significativos.

Estudos recentes, em que genes codificantes de diferentes subclasses de receptores P2X e P2Y de várias origens foram expressados em ovócitos de *Xenopus laevis* [187, 188, 189], em linhas celulares humanas derivadas de astrocitoma [190, 191] ou embrionárias de rim [192], mostraram que alguns diadenosídeos polifosfatados podiam interagir com esses receptores e provocar os mesmos efeitos que o ATP com potências semelhantes ao deste composto. Num dos trabalhos em que se estudou o efeito do ATP e de dinucleotídeos (entrada de catiões) em ovócitos de *Xenopus laevis* contendo receptores P2X₂ de rato observou-se que o Ap₅A (ao contrário do Ap₄A) não era agonista mas sensibilizava o receptor para o efeito agonista do ATP [187].

A interacção com receptores P2X ou P2Y também foi comprovada em modelos experimentais mais complexos, estudando o efeito de antagonistas destes receptores como a suramina, o PPADS (ácido piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico) ou o "reactive blue 2", o tipo de mecanismos envolvidos nos processos biológicos observados, a potência relativa de diferentes análogos do ATP na indução dos mesmos efeitos, na indução de dessensibilização cruzada ou na capacidade para promover a dissociação de dinucleosídeos polifosfatados radioactivos dos receptores com que interagem [48, 107, 109, 111, 112, 115, 135, 137, 138, 142, 151, 160-162, 171, 173, 174, 178, 182, 184, 193-195].

A hipótese da existência de receptores específicos para os dinucleosídeos polifosfatados foi sendo avançada ou insinuada por vários autores [61, 69, 113, 114, 151, 161, 177, 196] como uma possível explicação para resultados experimentais de difícil enquadramento no já de si complexo e constantemente questionado conhecimento sobre os receptores purinérgicos/pirimidinérgicos [71, 197-202]. Nesta década, a maioria dos trabalhos publicados sobre os efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados no sistema nervoso central foram da responsabilidade exclusiva [113, 118, 154, 196] ou parcial [152, 153, 194, 203, 204] da equipa de Miras-Portugal que, com base nos seus estudos, propuseram a existência de dois tipos de receptores específicos para os dinucleosídeos polifosfatados: os receptores P_{2d} [196] e P₄ [68, 113]. Apesar das evidências apresentadas a existência de receptores específicos para os dinucleosídeos polifosfatados defendida por esta equipa é polémica [64, 71]. Como indutores da contracção do músculo liso de vísceras e vasos sanguíneos o Ap₅A e o Ap₆A parecem ser mais potentes que o ATP [51, 158, 160, 170, 171, 173]. A recente descoberta do Ip₅I, como um antagonista dos efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados independentemente do nome com que se queira designar os receptores com que interage [154, 174], poderá no futuro ajudar a clarificar o papel biológico destes compostos e, por extensão, o de outros nucleotídeos.

O tema da possível existência de receptores específicos para os dinucleosídeos polifosfatados não pode ser abandonado sem uma referência, ainda que breve, aos estudos da equipa de Hilderman em células cardíacas e em preparações de membranas de diversos tecidos de ratinho. Membranas de cérebro de ratinho ligavam com grande especificidade e uma baixa constante de dissociação (0,7 µM) o Ap₄A; podiam competir com o Ap₄A outros dinucleosídeos polifosfatados como o Ap₅A, o Ap₆A, o Ap₃A e o Ap₃G mas não o Ap₂A, o ATP, o ADP, o AMP, a adenosina, o GTP e o Gp₄G [205]. Em preparações de membranas de coração de ratinho a ligação do Ap₄A era particularmente intensa [205, 206] e por este motivo o coração de ratinho foi escolhido para prosseguir com o trabalho de investigação. O receptor estaria localizado na superfície celular [206] e a ligação do Ap₄A era marcadamente estimulada pela acção de uma protease presente nas membranas [207-209]; a forma não activada do receptor teria 50 kDa de massa molecular enquanto a forma activada teria, dependendo das condições de activação, uma massa molecular de 42 kDa ou 30 kDa [143, 206]. Foi possível produzir anticorpos monoclonais com afinidade para o receptor e que eram também inibidores da sua ligação ao Ap₄A [207], ao Ap₅A e ao Ap₆A [209]. Usando estes anticorpos como ligandos em cromatografia de afinidade o receptor em análise foi recentemente purificado [143]. O 8-N₃Ap₄A, na presença de luz ultravioleta, ligava-se de forma covalente ao receptor; esta reacção era eficazmente inibida pelo Ap₄A e pelo ATPγS mas com o ATP só se obtinham resultados semelhantes com concentrações de uma a duas ordens de grandeza mais elevadas [143]. Não se sabe que tipo de efeitos podem estar relacionados com estes receptores. Na aurícula isolada de ratinho o Ap₄A tinha efeitos inotrópicos negativos, mas os receptores envolvidos podiam ser bloqueados pelo DPCPX (1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina) e presumem-se de tipo A₁ [178].

A inibição de efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados por derivados da xantina foi observada no sistema nervoso central [151, 194] e periférico [156-158], no sistema vascular

renal [161, 162], no coração [137, 156, 178-180] e na *muscularis mucosae* de cólon [138] de variadas espécies de mamíferos. A possibilidade de estes efeitos serem, pelo menos parcialmente, uma consequência da hidrólise dos dinucleosídeos não será de excluir; o efeito da adenosina poderia ser mesmo reforçado pela presença dos dinucleotídeos já que estes compostos inibem, pelo menos nas células cromafins da medula supra-renal bovina, a captação da adenosina [210]. É também possível, que os dinucleotídeos interajam directamente com receptores em que os derivados das xantinas são antagonistas. Estão descritos receptores (tendo a designação P_3 sido proposta) em que quer a adenosina quer o ATP se comportam como agonistas e em que a PSPT (8-*p*-sulfofenilteofilina) se comporta como antagonista [211].

Até ao momento não se identificou qualquer gene codificante de receptores cujo produto mostrasse especificidade, relativa ou absoluta, em relação aos dinucleosídeos polifosfatados. A possibilidade de não existirem receptores específicos para os dinucleosídeos polifosfatados não invalida, no entanto, que a maior estabilidade destes compostos no líquido extracelular, os possa colocar em vantagem relativamente ao ATP, ADP ou outros mononucleotídeos, na ligação a receptores relativamente afastados do local de secreção [9].

Os efeitos vasoconstritores dos dinucleosídeos polifosfatados (nomeadamente o Ap_5A e o Ap_6A) assim como os efeitos estimuladores da proliferação celular levaram à formulação da sugestão de que estes compostos poderiam estar implicados na patogénese da hipertensão e da aterosclerose [46, 70, 212].

1.3.c.5- Perspectivas de uso terapêutico de dinucleosídeos polifosfatados.

A maior estabilidade dos dinucleotídeos em relação aos mononucleotídeos, nomeadamente o ATP, para além de ser um factor a ponderar quando se discute se um determinado efeito pode ou não ter significado fisiológico ou patológico, coloca-os em vantagem como possíveis candidatos a serem usados como agentes terapêuticos.

Ainda no anos oitenta, o efeito anti-trombótico do Ap_4A foi avaliado *in vivo* infundindo este dinucleotídeo em coelhos e estudando o seu efeito num modelo de trombose experimental induzida pela inserção de uma cânula de polietileno dentro da carótida [213]. Usado em doses adequadas (50 mg/Kg) a incidência de trombose era de 56% contra 83% nos controlos, uma eficácia semelhante ao de outros anti-agregantes plaquetários como o ácido acetilsalicílico ou o dipiridamol (2 mg/Kg) [213].

Havia sido observado, nos finais da década de oitenta, que os derivados fosfonatos (com uma ponte metileno ou metileno halogenado substituindo as pontes oxigénio entre os resíduos fosfato) ou tiofosfatos (com um enxofre substituindo oxigénio nos resíduos fosfato) do Ap_4A são particularmente resistentes quer às hidrólases específicas quer às fosfodiesterases [5, 214-217]. A resistência às fosfodiesterases foi inicialmente observada em preparações purificadas de fosfodiesterase de veneno de serpente [217] ou de *Lupinus luteus* [214] e foi mais tarde confirmada no sangue humano e de coelho [218, 219].

De entre uma longa série de derivados fosfonato e tiofosfato do Ap_4A e do Ap_5A , testados no início dos anos noventa como anti-agregantes plaquetários em plasma rico em plaquetas destacou-se, pela sua potência, o AppCHClppA [220]. Como anti-agregante na presença de ADP 5 μM o seu I_{50} era de 3 μM , um valor 10 vezes inferior ao do Ap_4A ; o AppCHClppA também era eficaz como inibidor da secreção plaquetária e da activação do factor plaquetário 3 induzidos pelo ADP [220]. Testado como anti-trombótico, em coelhos em que se inseriu uma cânula de polietileno na carótida, o AppCHClppA mostrou ser mais eficaz que o Ap_4A estudado nas mesmas condições [213, 218]. Num trabalho recentemente publicado comparou-se a eficácia do AppCHClppA, como inibidor da actividade plaquetária induzida pelo ADP, com um derivado deste composto: o $Ap_5pCHClpp_5A$ [219]. Este último agente podia, em concentrações adequadas, bloquear uma série de aspectos da actividade plaquetária

induzida pelo ADP. Além disso, a agregação induzida por outros agonistas como o ácido araquidónico, o colagénio e a epinefrina podia ser parcialmente inibida, admitindo-se que esta inibição resultasse do bloqueio da activação dependente do ADP segregado [219]. Em todos os aspectos da actividade plaquetária em que foi testado o $\text{Ap}_3\text{pCHClpp}_3\text{A}$ era um inibidor mais eficaz que o AppCHClppA [219]. Era também ainda mais estável: após incubação na presença de sangue total durante 4h a 37°C os sinais de hidrólise eram mínimos [219]. Estes resultados sugerem o possível interesse clínico deste tipo de compostos como agentes anti-trombóticos [219]. Embora aspectos essenciais, como a sua toxicidade, não tenham ainda sido estudados [219] é de prever que efeitos secundários, resultantes da sua interacção com receptores doutras células, venham a ser observados: uma série de derivados tiofosfatos e fosfonatos do Ap_4A foram testados em culturas de hepatócitos tendo-se observado que eram, tal como o Ap_4A , activadores da fosforílase do glicogénio [141].

O Ap_4A foi recentemente usado, em infusão intravenosa, para induzir hipotensão controlada durante cirurgia do ouvido em dez pacientes tendo sido observado que induzia o efeito pretendido rapidamente e que não havia taquicardia reflexa durante a infusão nem hipertensão reactiva após a sua interrupção [169]. Também foi testado com êxito no cão como protector do miocárdio diminuindo a área de infarto em situações de isquemia [165].

1.3.d- Dinucleosídeos polifosfatados, divisão celular e síntese de DNA.

A ideia de que o Ap_4A poderia desempenhar um papel no processo de divisão celular surgiu, em 1976, na sequência de estudos de Rapaport e Zamecnik [20]. Estes investigadores estudaram as concentrações intracelulares de Ap_4A de culturas de variadas estirpes celulares com distintos tempos de duplicação tendo observado que as células com maior velocidade de multiplicação tinham uma concentração de Ap_4A 50 vezes superior às de multiplicação mais lenta. No mesmo trabalho demonstrou-se que a detenção do crescimento celular, por eliminação do soro ou de aminoácidos do meio de cultura, causava uma diminuição de 30 a 50 vezes na concentração de Ap_4A enquanto a concentração de ATP apenas diminuía para metade [20]. Rapaport e Zamecnik sugeriram que o Ap_4A poderia ser um mediador intracelular estabelecendo uma relação entre as velocidades de síntese proteica e de divisão celular [20].

Ainda na década de setenta, Grummt estudou o efeito do Ap_4A sobre a síntese de DNA em fibroblastos permeabilizados de rim de hámster (BHK) [221]. Quando as células eram previamente cultivadas num meio pobre em soro durante 48 h, induzindo desta maneira a detenção das células no período G1, e estas eram permeabilizadas com um meio hipotónico, o Ap_4A estimulava a incorporação de timidina marcada no DNA. Tentando explicar o fenómeno observado Grummt e colaboradores [222] descobriram que uma das subunidades do complexo polimérase α de DNA se ligava especificamente ao Ap_4A . Os estudos anteriores foram ampliados pelo grupo de Zamecnik usando células HeLa e de timo de vitela, tendo confirmado a capacidade da polimérase α para se ligar ao Ap_4A e descoberto que este composto podia funcionar como iniciador (“primer”) da síntese de DNA [89, 223-225].

Em contradição com as observações de Grummt [221], Edwards e Kaufmann [226], utilizando fibroblastos humanos detidos no período G1 por privação de soro e permeabilizados em meio hipotónico, não encontraram nenhum efeito do Ap_4A na incorporação de timidina marcada no DNA. Ono e colaboradores [227] não encontraram qualquer efeito do Ap_4A sobre a actividade de síntese das polimérase α , β e γ de DNA de mieloma de ratinho. A capacidade de ligar Ap_4A atribuída a uma subunidade da polimérase α também foi contestada; Remy sugeriu que a capacidade ligante observada podia corresponder à síntese de triptofanil-tRNA que copurificava com a polimérase [7].

Reforçando a ideia que o Ap_4A podia ser um indutor da proliferação celular Weinmann-Dorsch e colaboradores [21] observaram que, no fígado de rato em regeneração

(pós hepatectomia parcial), a concentração de Ap₄A nas células em multiplicação era 65 vezes superior à das que não se multiplicavam. No entanto, estas observações foram, ainda na década de oitenta, objecto de contestação. Em experiências semelhantes Andersson e Lewan [228] observaram que a concentração de Ap₄A apenas duplicava, tendo posteriormente admitido que essa pequena diferença poderia ser uma consequência da acumulação de plaquetas no tecido hepático em resposta à cirurgia [229]. Observações recentes da equipa de Plateau e Blanquet também mostraram que aumentos na concentração intracelular de Ap₄A (e Ap₃A) em *Saccharomyces cerevisiae* induzidos por alteração de genes implicados no catabolismo destes dinucleotídeos não provocavam aumento na velocidade de multiplicação celular [230].

Estudos da equipa de Grummt e de outros autores, em fibroblastos de rim de hámster (BHK) [21], em embriões de *Strongylocentrolus nudus* [231], em ovos de *Psammechinus miliaris* e *Xenopus laevis* [23], em *Artemia salina* [232] e em *Physarum polycephalum* [22] também mostraram a existência de coincidência entre aumento (de uma a três ordens de grandeza) da concentração intracelular de Ap₄A e o início da replicação do DNA durante o ciclo de multiplicação celular.

Em contradição com estas observações estão estudos dos laboratórios de Garrison e Barnes em *Physarum polycephalum* [233], de Baker e Jacobson numa linha celular de ratinho (C3H10T1) [26] e de Remy em células de hepatoma e de carcinoma pulmonar [234] e em embriões de *Xenopus laevis* [7]. No caso dos estudos da equipa de Remy observou-se que, em culturas de células de hepatoma e carcinoma pulmonar sincronizadas por tratamentos adequados, a quantidade de Ap₄A (e outros Ap_nN) por número de células diminuía para cerca de metade após a mitose e aumentava durante a fase G₂ [234] e que as variações nos níveis de Ap₄A, durante os três primeiros ciclos de desenvolvimento de embriões de *Xenopus laevis*, eram pequenas e não tinham nenhuma relação clara com a fase do ciclo celular [7].

A explicação para os diferentes resultados obtidos por diferentes investigadores estará relacionada com a dificuldade em dosear os dinucleotídeos em amostras biológicas onde os mononucleotídeos, nomeadamente o ATP e o ADP, são muito mais abundantes [3, 47].

A hipótese formulada por Rapaport e Zamecnik em 1976 [20] de que o Ap₄A poderia ser uma substância intracelular reguladora da velocidade de multiplicação celular não foi claramente demonstrada; a ausência de trabalhos sobre o tema durante a década de noventa parece mostrar que também não é encarada como uma hipótese promissora pela comunidade científica. Como já foi referido (ver capítulo 1.3.c.3), existem trabalhos recentes apontando a possibilidade de os dinucleosídeos polifosfatados poderem estimular a multiplicação celular actuando, não a nível intracelular, mas em receptores da superfície celular [46, 176, 177].

1.3.e- Relação entre os dinucleosídeos polifosfatados e um possível gene supressor de tumores (FHIT).

A origem da investigação sobre o gene *FHIT* ("fragile histidine triad") começou em 1979 quando se observou que numa família, cujos membros tinham, com frequência elevada e em idades jovens, carcinomas renais bilaterais, existia uma translocação entre os cromossomas 3 e 8 [235]. O local de rotura no cromossoma 3 ocorria numa região (*FRA3B*) onde, recentemente, foi identificado um gene que foi denominado *FHIT* [236]. Também se observou que esse gene está alterado de forma heterogénea, originando ausência de transcrição do gene ou o aparecimento de RNAs mensageiros aberrantes, em algumas linhas celulares de células tumorais em cultura e em alguns cancros. A associação entre *FHIT* alterado e cancro levou à formulação da hipótese que o *FHIT* seria um gene supressor de tumores [236-243].

Recentemente, o gene *FHIT* foi expressado em *Escherichia coli* e em células COS1 tendo-se observado que o proteído produzido (FHIT) era uma dinucleosídeo-trifosfatase [244].

Esta enzima, descrita pela primeira em fígado de rato pela equipa de Sillero e Sillero [12, 245], tem como substratos preferenciais o Ap₃A e outros dinucleosídeos trifosfatados mas, pode também catalisar, embora mais lentamente, a hidrólise de dinucleotídeos que, como o Ap₄A, têm mais de três fosfatos internos [244]. O proteído expressado tinha quatro histidinas, três das quais formavam uma tríade (H94, H96 e H98) integrando um motivo sequencial denominado HIT [244]. A substituição de qualquer destas três histidinas por asparagina provocava diminuição da actividade hidrolítica que era particularmente marcada quando a histidina substituída era a central da tríade (H96) [244]. A actividade hidrolítica sobre o Ap₃A e outros dinucleosídeos polifosfatados do produto de um hipotético gene supressor de tumores sugeriu a existência de uma relação entre o metabolismo dos nucleosídeos polifosfatados e a tumorigénese [244].

O efeito anti-tumoral do FHIT foi confirmado usando plasmídeos de expressão contendo o gene *FHIT*. A expressão do gene normal em células cancerígenas, que tinham o gene *FHIT* alterado, provocava perda de capacidade para formarem tumores quando injectadas em ratinhos atímicos [246]. No entanto, o mesmo efeito era observado quer quando o gene contido nos plasmídeos de expressão codificava o FHIT nativo quer o FHIT com asparagina substituindo a histidina da posição 96 e portanto praticamente destituído de actividade hidrolítica em relação aos dinucleosídeos polifosfatados [246]. Ambos os proteídos FHIT (nativo e com histidina H96 substituída) podiam ligar o Ap₃A tendo-se admitido que a forma activa do proteído com acção anti-tumoral podia ser o complexo FHIT•dinucleotídeo [247]. Tendo em conta os K_m para o Ap₃A e o Ap₄A (1,2 e 4,6 μ M, respectivamente [244]) não é de excluir a possibilidade de, *in vivo*, a maior parte das moléculas de FHIT não estarem ligadas a nenhum dos dinucleotídeos e que a actividade anti-tumoral seja independente da capacidade de ligar os dinucleotídeos.

1.3.f- Dinucleosídeos polifosfatados como “alarmonas”. Papel na adaptação a condições ambientais desfavoráveis.

Como referido no capítulo 1.2 a concentração intracelular dos dinucleosídeos polifosfatados pode aumentar em resposta a condições ambientais desfavoráveis.

As primeiras observações mostrando acumulação intracelular de dinucleosídeos polifosfatados (Ap₄A, Ap₃A, Ap₄G, Ap₃G e Ap₃Gp₂) em resposta à exposição a agentes oxidantes, etanol ou hipertermia foram feitas pelo grupo de Ames, no início da década de oitenta, em dois procariontes: *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* [24, 27, 34]. Com base nestas observações foi formulada a hipótese que estes compostos poderiam ser “alarmonas”, segundos mensageiros capazes de provocarem respostas de adaptação e de auto-protecção da célula induzindo a síntese dos chamados proteídos de choque térmico ou de “stress” (*hsp* – de “heat shock protein”).

As observações de Baker e Jacobson [26] numa linha celular de ratinho (SVT2) apoiaram a hipótese de Ames estendendo-a aos eucariontes. Uma série de estímulos agressivos (calor e exposição ao etanol, Cd²⁺ e arsenito) conhecidos como estimuladores da síntese de *hsp* induziam também a acumulação de Ap₄A enquanto que outros (exposição a cicloheximida, arabinosídeo da citosina, hidroxíureia e irradiação ultravioleta) eram incapazes de provocar qualquer daqueles efeitos.

No entanto, vários estudos em ovócitos de *Xenopus laevis* [30, 248], em culturas de células de hepatoma [30], em *Saccharomyces cerevisiae* [25], em *Artemia salina* [249] e em *Escherichia coli* [28, 250], realizados ainda nos anos oitenta, não se coadunam com a hipótese formulada.

A título de exemplo refira-se que os valores de temperatura capazes de provocar acumulação de dinucleosídeos polifosfatados em ovócitos de *Xenopus laevis* e em células de

hepatoma em cultura (HTC) eram maiores que os necessários para induzir a síntese de *hsps* provocando também morte celular [30] e que o Ap_4A , quando injectado em ovócitos de *Xenopus laevis* era, por si só, incapaz de provocar a síntese de *hsps* [248].

Também se observou que uma estirpe de *Escherichia coli* superprodutora de uma hidrólase de Ap_4A (dinucleosídeo-tetrafosfatase simétrica) tinha uma concentração de Ap_4N 10 vezes inferior à estirpe selvagem e uma acumulação diminuída de Ap_4N em resposta à hipertermia ou H_2O_2 mas que a síntese de proteídeos relacionadas com o choque térmico ou com o tratamento com H_2O_2 era idêntica nas duas estirpes [28]. A própria equipa de Ames mostrou, em 1989, que a eliminação do gene *apaH* (codificador da dinucleosídeo-tetrafosfatase simétrica) em *Escherichia coli* provocava aumento marcado na concentração de Ap_4A sem contudo induzir síntese de *hsps* [250].

1.3.g- Papel biológico do p_4A e outros mononucleosídeos tetrafosfatados.

Apesar de a presença do p_4A ter sido observada em diferentes sistemas biológicos incluindo as plaquetas sanguíneas e a medula supra-renal (ver capítulo 1.2), a investigação do papel biológico deste e de outros mononucleosídeos polifosfatados tem sido escassa.

A primeira observação sobre o papel de nucleosídeos tetrafosfatados como efectores enzimáticos foi feita no laboratório de Sillero e Sillero ainda na década de setenta [251]. O p_4G e o p_4A eram potentes inibidores competitivos da nucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica de *Artemia salina* e os valores das constantes de inibição (K_i) a eles associados eram de ordem de grandeza submicromolar [251]. Este efeito inibidor foi posteriormente confirmado usando nucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica extraída de diferentes fontes [16, 252-260] também se tendo observado que o p_4U era, igualmente, um potente inibidor [254]. A potente capacidade inibidora do p_4A nesta enzima hidrolítica de dinucleosídeos tetrafosfatados faz admitir a possibilidade deste composto ser um importante factor fisiológico na regulação da concentração intracelular de Ap_4A . Variações na concentração de p_4A poderiam provocar variações da concentração de Ap_4A no mesmo sentido; assim, o p_4A poderia, de forma indirecta, induzir os efeitos que são atribuídos ao Ap_4A e que já foram apontados nesta memória.

A grande afinidade do p_4A para a nucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica possibilitou o seu uso, como eluente específico, no processo de purificação da enzima de fígado de rato [256, 261].

O p_4G ($K_i=2\ \mu\text{M}$) também é inibidor de uma outra enzima implicada no catabolismo de dinucleosídeos polifosfatados, concretamente, a fosfodiesterase I de fígado de rato [262].

Quer o p_4A ($K_i=1\ \mu\text{M}$) quer o p_4G ($K_i=2,5\ \mu\text{M}$) eram potentes inibidores competitivos da ciclase do guanilato de mamífero e, concretamente, eram inibidores mais potentes que o ATP, o ADP e o GDP [263]. Em relação à ciclase do adenilato o p_4G , tal como outros nucleotídeos de guanina, seria activador; o p_4A também seria activador no caso da enzima de pulmão de rato e inibidor doutras ciclases de adenilato de mamíferos [264].

Tal como os diadenosídeos polifosfatados e o ATP, também o p_4A era estimulador da acção libertadora de Ca^{2+} induzida pelo inositol-1,4,5-trifosfato em células musculares lisas permeabilizadas com saponina [119].

O p_4A também pode induzir efeitos em consequência da sua interacção com receptores da superfície celular e, tal como no caso dos dinucleosídeos polifosfatados, a sua estabilidade no meio extracelular parece também ser maior que a do ATP [58, 138].

Observou-se que o p_4A induzia a contracção de anéis aórticos de rato interagindo com receptores P2X do músculo liso sendo este efeito muito mais marcado que o que podia ser provocado pelo ATP testado em concentrações equimolares. O efeito vasoconstritor do p_4A era observado quer em anéis aórticos em que o endotélio tinha sido removido quer quando o

endotélio estava intacto; em anéis aórticos deste último tipo o efeito do ATP era de tipo relaxante. O p_4A também podia ter um efeito relaxante e este tipo de efeito era observado quando os anéis aórticos tinham sido previamente tratados com norepinefrina e dependia da presença do endotélio; nesta acção relaxante o p_4A era menos potente que o ATP e estariam envolvidos receptores P2Y [265].

No músculo longitudinal da veia porta do cobaio o p_4A tinha (tal como o ATP) um efeito vasoconstritor directo e, nas contracções induzidas por estimulação eléctrica, tinha um efeito inibidor. Ambos os efeitos eram insensíveis à suramina desconhecendo-se o tipo de receptores envolvidos [266].

No canal deferente isolado de cobaio o p_4A podia, interagindo presumivelmente com receptores P2X, induzir contracções; a potência do p_4A era superior à do ATP e semelhante à do Ap_5A [172].

Na *taenia caeci* de cobaio e na *muscularis mucosae* de rato os efeitos observados com o p_4A eram idênticos aos dos diadenosídeos polifosfatados (relaxamento no primeiro caso e contracção no segundo) [138]. A sua potência era semelhante à do ATP, ou seja, menor que a do Ap_3A e Ap_4A mas maior que a do Ap_5A e Ap_6A [138]. A sensibilidade aos antagonistas testados era também idêntica à dos diadenosídeos polifosfatados presumindo-se interacção com receptores P2Y no caso da *taenia caeci* e com receptores A_1 no caso da *muscularis mucosae* [138].

Dada a presença de p_4N e p_5N como contaminantes em preparações comerciais de NTP [37, 38, 267, 268] não é de excluir a possibilidade de que alguns dos efeitos atribuídos a estes compostos possam, de facto, ser da responsabilidade dos mononucleosídeos polifosfatados [251].

1.4 - Metabolismo de mono e dinucleosídeos polifosfatados.

1.4.a- Hidrólise e fosforólise enzimáticas de dinucleosídeos polifosfatados.

Dado que se publicou, em 1992, uma extensa revisão sobre as enzimas envolvidas no catabolismo de dinucleosídeos polifosfatados [5] e que os avanços no conhecimento sobre este tema posteriores a essa data têm, no contexto desta dissertação, pouca relevância apenas se apontarão, de forma sumária, algumas das características destas enzimas.

1.4.a.1- Dinucleosídeo-tetrafosfátase assimétrica (EC 3.6.1.17).

A presença da dinucleosídeo-tetrafosfátase assimétrica foi descrita em múltiplos sistemas biológicos de eucariontes tais como: *Artemia salina*, fígado e outros tecidos de rato e ratinho, células sanguíneas e placenta humanas, fígado e medula supra-renal de boi, mucosa intestinal de porco e coelho, sementes de plantas do género *Lupinus*, algas verdes dos géneros *Scenedesmus* e *Chorella*, lanternas de *Photinus pyralis* e embriões de *Drosophila* e de ouriço do mar [5, 16, 258, 260, 261, 269-272]. Existe predominantemente no citosol embora a presença na mitocôndria também tenha sido observada [5, 273]. Esta enzima não está descrita em procariontes.

A enzima tem maior actividade hidrolítica em relação a dinucleosídeos tetrafosfatados catalisando com eficácia semelhante a hidrólise de Ap_4A , Gp_4G e Xp_4X [252, 254, 274, 275]. A sua eficácia é, em geral, algo inferior em relação aos heterodinucleosídeos tetrafosfatados (como o Ap_4G , o Ap_4C e o Ap_4U) [276] ou aos dinucleotídeos com 5 ou 6 resíduos fosfato internos (Np_5N e Np_6N) [16, 258, 275, 276]. Os dinucleosídeos tri e difosfatados (como o Ap_3A , o Ap_2A , o NAD^+ , o $NADP^+$ e o FAD) e os mononucleotídeos (como o p_4A , o ATP, o

GTP, o UTP, o ADP, o GDP e o AMP) não são substratos desta enzima [16, 252, 254, 258, 275, 277, 278].

Como resultado da sua acção um dos produtos é sempre um mononucleosídeo trifosfatado: no caso do Ap₄A forma-se ATP+AMP, do Ap₅A, ATP+ADP e do Ap₆A só ATP [16, 258, 272, 275, 276, 279]. O valor de K_m para o Ap₄A ou para o Gp₄G foi, em geral, avaliado em 1-5 μ M [251-254, 256, 257, 259, 260, 262, 272, 276, 278, 280].

Uma característica distintiva desta enzima é a sua inibição por concentrações de ordem de grandeza submicromolar de mononucleosídeos tetrafosfatados como o p₄A (ver capítulo 1.3.g) [16, 251-260].

Foram, recentemente, identificados genes codificantes de dinucleosídeo-tetrafosfátases assimétricas em quatro fontes distintas: placenta humana [281], intestino de porco [260], *Schizosaccharomyces pombe* [282] e sementes de *Lupinus angustifolius* [271].

1.4.a.2- Dinucleosídeo-trifosfátase (EC 3.6.1.29).

A dinucleosídeo-trifosfátase foi menos estudada que a dinucleosídeo-tetrafosfátase assimétrica. A sua presença foi descrita no fígado e outros tecidos de rato, medula supra-renal bovina, sementes de *Lupinus luteus* e extractos de *Escherichia coli*, *Artemia salina* e *Saccharomyces cerevisiae* [5, 259, 270]. No que se refere à distribuição intracelular em eucariontes, está presente no citosol e na matriz mitocondrial [273, 283].

A enzima tem como substratos preferenciais homo e heterodinucleosídeos trifosfatados (como o Ap₃A, o Gp₃G, o Up₃U, o Ap₃G e o Ap₃C) [12, 284, 285] embora, dependendo da fonte, também possa catalisar a hidrólise de dinucleosídeos tetra e penta-fosfatados [276, 284, 285]. Os dinucleotídeos com dois fosfatos internos (como o Ap₂A, o Gp₂G, o NAD⁺, o NADP⁺ e o FAD) e os mononucleotídeos (como o p₄A, o ATP, o ADP e o AMP) não são substratos da enzima [12, 276, 286, 287].

Um dos produtos é sempre um mononucleosídeo monofosfatado; no caso do Ap₃A forma-se AMP+ADP, no do Ap₄A, AMP+ATP [5, 279, 284, 285].

Dependendo da fonte foram observados valores de K_m para o Ap₃A variando entre 1 e 15 μ M [12, 245, 259, 276, 284-286, 288, 289]; no entanto, no cérebro de rato foi encontrada uma isoenzima não citosólica com um valor de K_m anormalmente elevado [288].

Como já referido no capítulo 1.3.e, um gene humano que se presume ser supressor de tumores (*FHIT*) codifica uma dinucleosídeo-trifosfátase típica [244]. Um gene (*orf186*) de *Escherichia coli* foi também recentemente identificado como codificando uma hidrólase em que o substrato preferencial era o Ap₃A [290]. No entanto, ao contrário da dinucleosídeo-trifosfátase anteriormente descrita em *Escherichia coli* [289], também era activa em relação a dinucleosídeos difosfatados como o Ap₂A e o NAD⁺ e podia aceitar, como efectores, os catiões Mn²⁺ e Zn²⁺ em alternativa ao Mg²⁺ [290].

1.4.a.3- Dinucleosídeo-tetrafosfátase simétrica (EC 3.6.1.41).

Esta enzima, que está descrita em extratos de *Physarum polycephalum* e *Escherichia coli*, catalisa a hidrólise de Ap₄A formando-se, como produtos, duas moléculas de ADP [5, 279, 291-294].

Catalisa também a hidrólise de moléculas do tipo Np_nN desde que o número de fosfatos internos seja igual ou superior a 3. Demonstrou-se serem substratos desta enzima homodinucleotídeos de adenina e guanina (Ap_nA e Gp_nG; n=3-6), vários heterodinucleotídeos como o Ap₄G, o Ap₃G e o Gp₃C e ainda o p₄A. Um dos produtos formados é sempre um mononucleosídeo difosfatado. O Ap₂A, o NAD⁺ e o NADP⁺ assim como os mononucleotídeos ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP não são substratos [292-294].

O valor do K_m do Ap_4A no caso da enzima de *Escherichia coli* é cerca de 25 μM [216, 293, 294].

O gene que, em *Escherichia coli*, codifica a dinucleosídeo-tetrafosfatase simétrica foi identificado e denominado *apaH* [295]. Observou-se que em estirpes de *Escherichia coli* superprodutoras desta enzima havia, como previsto, marcada diminuição na concentração de Ap_4A [28, 295]; o inverso ocorria em estirpes incapazes de expressar o gene *apaH* [250, 296].

1.4.a.4- Fosforilase dos dinucleosídeos tetrafosfatados (EC 2.7.7.53).

Esta enzima foi descrita pela primeira vez em *Saccharomyces cerevisiae* por Guranowski e Blanquet [297] e, posteriormente, em duas espécies de protozoários (*Euglena gracilis* e *Acanthamoeba castellanii*), em algas verdes dos géneros *Scenedesmus* e *Chorella* e em cianobactérias dos géneros *Anabaena* e *Synechococcus* [5, 272, 298]. No que se refere à sua localização intracelular demonstrou-se a sua presença no citosol da *Euglena gracilis* [299].

Catalisa a fosforólise do Ap_4A com formação de ADP e ATP como produtos (ver equação 1) [297, 300-302].



Para além do Ap_4A são também substratos da enzima o Ap_5A , o Gp_4G , o Ap_4C , o Ap_4G , o Ap_4U e o Gp_4U [272, 297, 298, 300, 302]. No caso das enzimas de *Euglena gracilis* ou de *Anabaena flos-aquae* o Ap_3A também é substrato [298, 300]. Em todos os casos se produz um nucleosídeo difosfatado como um dos produtos [272, 297, 298, 300, 302, 303].

No processo catalítico forma-se um intermediário em que o adenilato está ligado de forma covalente à enzima [304] e a enzima pode catalisar a reacção de troca ADP-Pi [301, 305] (ver equação 2). A reacção catalisada pela fosforilase dos dinucleosídeos polifosfatados é reversível: a partir de ATP (ou GTP) e variados mononucleosídeos difosfatados forma-se Ap_4N (ou Gp_4N) e Pi (ver equações 2 e 3) [272, 297, 302, 303].



Dependendo da fonte de enzima os valores dos K_m para o Ap_4A e para o Pi foram, na reacção fosforolítica, calculados entre 5 e 60 μM e entre 0,16 e 1 mM, respectivamente [272, 297, 300]. Na reacção de síntese de Ap_4A , os K_m aparentes do ATP e ADP eram, respectivamente, 5,7 e 0,3 mM [303].

Usando como substrato dador de adenilato o 5'-fosfosulfato de adenosina (spA) e como aceitadores ATP, p_4A , GTP ou p_4G a fosforilase de dinucleosídeos tetrafosfatados pode catalisar a síntese de Ap_4A , Ap_5A , Ap_4G ou Ap_5G com formação concomitante de sulfato inorgânico [306]. Estudos do laboratório de Plateau e Blanquet em *Saccharomyces cerevisiae* parecem indicar que as actividades catalíticas descritas para a fosforilase dos dinucleosídeos tetrafosfatados e para a sulfurilase do ADP (EC 2.7.7.5) corresponderiam a uma mesma enzima [301].

Estudos de biologia molecular mostraram a existência de duas isoenzimas da fosforilase de dinucleosídeos tetrafosfatados em *Saccharomyces cerevisiae* [301, 302, 307]. Na tentativa de esclarecer o papel metabólico desta enzima foram produzidos mutantes incapazes de produzir qualquer das isoenzimas [230, 302] e também células superprodutoras de uma das isoenzimas [308]. Estas experiências levaram a resultados aparentemente contraditórios: em ambos os casos, relativamente ao controlo, havia aumento na concentração intracelular de

dinucleosídeos tetrafosfatados. O papel metabólico desta enzima, anabólico ou catabólico, não está ainda claramente elucidado e é possível que participe num ou noutro dos processos em função de variações na concentração dos compostos envolvidos nas reacções por si catalisadas [303].

1.4.a.5- Fosfodiésterases I (EC 3.1.4.1).

Todas as enzimas hidrolíticas descritas nos capítulos anteriores (1.4.a.1-1.4.a.3) são específicas e estão localizadas no interior das células.

Em consequência da descoberta de que os dinucleosídeos polifosfatados podem ser segregados para o meio extracelular e podem exercer efeitos por interacção com receptores da membrana citoplasmática o estudo do catabolismo extracelular destes compostos conheceu nos últimos quinze anos um interesse particular. Para além dos estudos a que já fizemos referência no capítulo 1.3.c.2 a hidrólise de dinucleosídeos polifosfatados por enzimas extracelulares ou da superfície celular foi estudada em membranas de fígado [262], cérebro [288] e plasma sanguíneo [309] de rato, em células endoteliais de boi [310], em células cromafins da medula supra-renal bovina ou extratos de membranas deste tipo de células [134, 311, 312], em terminais sinápticos do órgão eléctrico do *Torpedo* [313, 314], em plasma de cão [315] e no soro ou plasma sanguíneo humanos de indivíduos normais [316-318] ou doentes [319].

Em geral, nestes estudos, foi ignorada a identidade das enzimas responsáveis pelas actividades catalíticas observadas e, em alguns casos, foram classificadas como ecto-dinucleosídeo polifosfátases [313, 314].

A identidade entre estas actividades catalíticas e as actividades de uma família de isoenzimas classificadas no grupo da fosfodiésterase I (EC 3.1.4.1)/pirofosfátase de nucleotídeos (EC 3.6.1.9) foi demonstrada pela equipa de Sillero e Sillero em membranas de fígado de rato [262], pela equipa de Ogilvie em soro sanguíneo humano [131, 318] e, recentemente, pela equipa de McLennan em membranas de células cromafins de medula supra-renal bovina [312].

A fosfodiésterase I de membranas de fígado de rato, tal como as fosfodiésterases I de outras origens, catalisava a hidrólise de uma ampla variedade de substratos (Ap_nA ($n=1-6$), Gp_4G , NAD^+ , FAD , ADP-ribose , ADP-glicose e $3'$ -defosfocoenzima A) com uma velocidade muito semelhante [262, 316, 320]. A fosfodiésterase I também catalisa eficazmente a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato-5'-timidina (originando timidilato e *p*-nitrofenol) mas não a do *p*-nitrofenilfosfato-3'-timidina [262, 316, 320, 321]. Os substratos da fosfodiésterase I contêm um resíduo nucleosídeo-5'-fosfato em que o hidroxilo $3'$ da pentose está livre e intacto; o nucleosídeo-5'-fosfato é um dos produtos da reacção sendo o outro produto o resíduo (R') previamente ligado ao fosfato (ver equação 4) [261, 262, 322, 323].



A natureza de R' , assim como o tipo de ligação entre R' e o resíduo fosfato não é crítica na actividade da enzima [322]. Da acção hidrolítica da fosfodiésterase sobre o Ap_3A , o Ap_4A , o Ap_5A ou o Ap_6A resulta a formação de AMP, como produto comum, sendo o outro produto o ADP, o ATP, o p_4A ou o p_5A , respectivamente [134, 262, 320]. Estes quatro mononucleotídeos também são substratos da enzima originando-se como produto final o AMP [262, 316].

No soro sanguíneo humano Luthje e Ogilvie separaram por electroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida três isoenzimas com actividade hidrolítica relativamente ao Ap_4A ; contudo, essas mesmas fracções também catalisavam a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato-5'-timidina [131, 318].

No estudo do grupo de McLennan a que já fizemos referência [312] a actividade sobre o Ap₄A foi parcialmente purificada mas a fracção obtida catalisava a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato-5'-timidina e anticorpos monoclonais contra um dos membros da família das fosfodiesterases I (PC1) reagiam com um dos proteídeos presentes na preparação purificada.

1.4.b- Hidrólise enzimica de mononucleosídeos polifosfatados.

A adenosina-tetrafosfatase (EC 3.6.1.14) é uma fosfatase capaz de catalisar a hidrólise de p₄A originando a formação de ATP e Pi [324, 325]. Foi pela primeira vez identificada e purificada a partir de músculo e outros tecidos de coelho nos anos sessenta [324]. Recentemente, foi também purificada a partir de extratos de sementes de *Lupinus luteus* e extensamente caracterizada [325]. A capacidade catalítica da preparação enzimica obtida de músculo de coelho sobre variados mononucleosídeos trifosfatados testados (ATP, GTP, UTP, CTP e ITP) era nula e, para além do p₄A, eram substratos o p₄I e o P₃ [324]. No caso da enzima de *Lupinus luteus* eram substratos o p₄A, o p₄G, o P₃ e, em muito menor grau, o p₅A; não eram substratos o ATP, o ADP, o Ap₄A, o Ap₅A, o PPi e o P₄ [325]. Os valores do K_m do p₄A, determinados com as enzimas de coelho e de *Lupinus luteus*, foram 27 μM [324] e 3 μM [325], respectivamente.

Também, muito recentemente, se observou que a exopolifosfatase (EC 3.6.1.11) de *Saccharomyces cerevisiae*, caracterizada como activa no P₃ e no P₄ mas não no ATP e no PPi pode, a baixo pH (pH óptimo de 4,8), catalisar a hidrólise de mononucleosídeos polifosfatados como o p₄A, o p₄G e o p₄I [326].

Hidrólases muito inespecíficas como as fosfatases alcalina e ácida (EC 3.1.3.1 e EC 3.1.3.2) [327, 328] e a fosfodiesterase I (EC 3.1.4.1) [320] também podem, obviamente, catalisar a rotura hidrolítica de p₄A e de compostos do tipo p_nN.

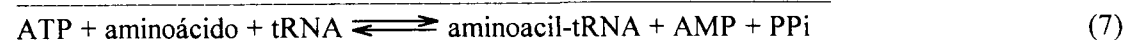
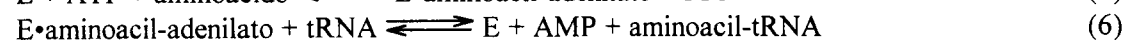
1.4.c- Síntese enzimica de dinucleosídeos polifosfatados.

A maior parte do trabalho de investigação sobre as actividades de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados das sintétases de aminoacil-tRNA foi feito na década de oitenta e foi revisto por Plateau e Blanquet em 1992 [4]. Nesta data já se sabia que, para além de diversas sintétases de aminoacil-tRNA, também a fosforilase de dinucleosídeos tetrafosfatados, a transférase de guanilato, a transférase de guanilato de RNA mensageiro e a luciférase de *Photinus pyralis* podiam catalisar a síntese de dinucleotídeos [4, 10]. Dado o interesse particular das sintétases de aminoacil-tRNA no contexto desta memória, apresentamos aqui, com a profundidade que entendemos suficiente, o que se conhece hoje sobre o tema.

1.4.c.1- Sintétases de aminoacil-tRNA (EC 6.1.1.x).

As sintétases de aminoacil-tRNA são uma família de enzimas envolvidas na esterificação de aminoácidos específicos na posição 2' ou 3' do resíduo ribose 3'-terminal da haste aceitadora dos RNA de transferência correspondentes. No mecanismo enzimico está envolvida a formação de um complexo intermediário E•aminoacil-adenilato [329-333].

O mecanismo reactivo pode ser esquematizado como se segue:

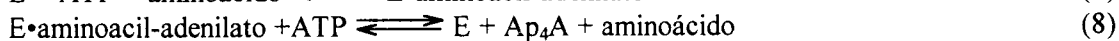
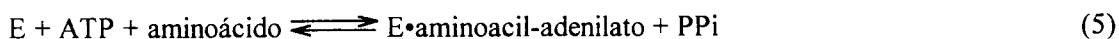


A primeira observação de síntese enzimática de Ap₄A foi feita na década de sessenta por Zamecnik e colaboradores [334] num meio de ensaio que continha ATP, Mg²⁺, lisina e, como agente catalítico, sintetase de lisil-tRNA de *Escherichia coli*.

A síntese de Ap₄A foi posteriormente observada usando sintetases de aminoacil-tRNA de diversas origens e especificidades de substrato aminoácido [4, 335-337]. A título de exemplo, refira-se que no caso de sintetases de aminoacil-tRNA de mamíferos foi observada síntese de Ap₄A usando preparações enzimáticas purificadas de fígado de carneiro (sintetases de lisil-, fenilalanil- e metionil-tRNA [338]), de fígado de rato (sintetase de lisil-tRNA [339] e um complexo de sintetases de arginil- e lisil-tRNA [340]) e de reticulócitos de coelho (sintetases de lisil-, seril- e treonil-tRNA [341]).

1.4.c.1.1- Mecanismo de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados.

A maioria das sintetases de aminoacil-tRNA de diversas fontes e especificidades de substrato são também capazes de catalisar a reacção de troca ATP-PPi e esta reacção depende da presença do aminoácido correspondente; a incubação conjunta de ATP não radioactivo, PPi radioactivo e uma determinada sintetase de aminoacil-tRNA só dá origem à formação de ATP radioactivo se também estiver presente o aminoácido correspondente (ver equação 5) [329, 332, 333]. No seu estudo pioneiro com a sintetase de lisil-tRNA de *Escherichia coli*, Zamecnik e colaboradores [334] observaram que a síntese de Ap₄A era activada pela presença de PPase e que era indispensável a presença de lisina, tendo sido proposto que o complexo intermediário E•aminoacil-adenilato poderia transferir o resíduo adenilato para o ATP com consequente formação de Ap₄A. Na síntese de Ap₄A a segunda molécula de ATP a interagir no sistema enzimático substituiria o PPi (ver equações 5, 8 e 9) [334, 342-344].



O mecanismo proposto pela equipa de Zamecnik [334] foi directamente confirmado por Goerlich e colaboradores [336] usando a sintetase de fenilalanil-tRNA de *Escherichia coli*. Estes autores observaram que a adição de ATP a um meio de ensaio contendo a enzima complexada com o anidrido fenilalanil-adenilato levava à formação de Ap₄A com concomitante destruição do anidrido.

O mecanismo admitido para a síntese de Ap₄A está de acordo com os dados experimentais observados com diversas sintetases de aminoacil-tRNA, nomeadamente a dependência desta síntese em relação à presença do aminoácido correspondente no meio de ensaio e à activação pela PPase [334-336, 342, 345]. A estrita dependência da adição de aminoácido correspondente ao meio de ensaio na síntese de Ap₄A catalisada pelas sintetases de aminoacil-tRNA não foi, contudo, sistematicamente observada [336, 340]. Goerlich e colaboradores [336] interpretaram a ausência de dependência da adição de aminoácido, nos estudos realizados com certas preparações enzimáticas, como consequência da possível contaminação dessas preparações com o aminoácido correspondente.

A síntese de Ap₄A por acção catalítica das sintetases de aminoacil-tRNA depende da presença de catiões Mg²⁺ em concentrações da mesma ordem de grandeza da concentração do substrato ATP [335, 336]. Pelo menos no caso da sintetase de seril-tRNA de *Thermus thermophilus* o Mn²⁺ pode substituir o Mg²⁺ [346]. Recentemente, Belrhali e colaboradores [346] estudaram, por cristalografia de raios X, complexos desta última enzima com (i) ATP e Mn²⁺, (ii) seril-adenilato e Mn²⁺ e (iii) Ap₄A e Mn²⁺. Estes estudos mostraram que o ATP se encontrava ligado à enzima numa conformação especial, dobrado em “V” sendo um dos seus

braços formado pelos resíduos fosfato β e γ . Se, no complexo E•ATP, o ATP se encontrasse numa conformação estendida a posição do seu fosfato β coincidiria com a do resíduo serina no complexo E•seril-adenilato. No complexo E•Ap₄A a posição de um dos resíduos adenosina e dos dois resíduos fosfato mais próximos desta adenosina coincidiam com a posição dos resíduos adenosina e fosfatos α e β do ATP no complexo E•ATP [346]. O sítio activo da síntese de seril-tRNA de *Thermus thermophilus* estaria desenhado de tal forma que o fosfato α da primeira molécula de ATP a interagir com a enzima estaria próximo do grupo carboxílico da serina favorecendo a transferência do resíduo adenilato do ATP para a serina. Após a libertação do PPi, o local para a ligação da segunda molécula de ATP ficaria livre, situando-se o fosfato γ deste ATP na proximidade do resíduo fosfato do seril-adenilato tornando possível a transferência de adenilato para o segundo ATP com consequente formação de Ap₄A [346]. Um dos iões Mn²⁺ presente nos diferentes complexos estudados ocupava sistematicamente a mesma posição junto do fosfato α do primeiro ATP a interagir com a enzima; no complexo E•Ap₄A, esse catião Mn²⁺ também interagiu com os resíduos fosfato que eram originalmente os fosfatos α e γ do segundo ATP [346].

As sínteses de arginil-tRNA [15] e de glutamil-tRNA [347] de *Escherichia coli* são incapazes de catalisar a síntese de Ap₄A e, curiosamente, também são incapazes de catalisar a reacção de troca ATP-PPi na ausência de RNA de transferência; presume-se que o mecanismo de síntese de aminoacil-tRNA destas enzimas possa ser distinto daquele que se aceita ser o das outras sínteses de aminoacil-tRNA.

1.4.c.1.2- Especificidade de substrato.

No caso da síntese de lisil-tRNA de *Escherichia coli* observou-se que a substituição no meio de ensaio do ATP por dATP resultava na síntese de dAp₄dA pelo que é de presumir a formação do complexo E•lisil-desoxiadenilato e que o dATP pode funcionar como aceitador do desoxiadenilato [343-345, 348].

A especificidade do local de ligação da segunda molécula de ATP (na síntese de Ap₄A) ou do PPi (reacção de troca ATP-PPi) é muito menor que a do local de ligação da primeira molécula de ATP: a incubação conjunta de ATP e de outros mononucleosídeos di e trifosfatados levava à síntese conjunta de Ap₄A e de outros dinucleosídeos tri ou tetrafosfatados. Assim, foi possível observar síntese de Ap₃A, Ap₄G, Ap₃G, Ap₄dG, Ap₃dG, Ap₄U, Ap₃U, Ap₄dT, Ap₃dT, Ap₄C e Ap₃C usando síntese de lisil-tRNA de *Escherichia coli* [343-345, 348, 349]; a síntese de Ap₄G, Ap₄C, Ap₄U e Ap₃U também foi observada usando as sínteses de histidil-tRNA e de triptofanil-tRNA de *Bacillus stearothermophilus* e a síntese de alanil-tRNA de *Escherichia coli* [347]. Pelo menos nos casos das sínteses de glicil-tRNA de *Escherichia coli* e de fenilalanil-tRNA de *Saccharomyces cerevisiae* o Pi também pode funcionar como aceitador de adenilato sintetizando-se, nesse caso, ADP [350, 351]. Este fenómeno, que se presume existir no caso de outras sínteses de aminoacil-tRNA, permitiria explicar o porquê da formação de ADP e Ap₃A (para além de Ap₄A) em meios de ensaio em que a PPase estava presente e em que o único substrato adicionado era o ATP [334-336].

A síntese de p₄A catalisada pela síntese de lisil-tRNA de *Escherichia coli* foi também descrita como ocorrendo num meio de ensaio contendo ATP, P₃, Mg²⁺ e lisina presumindo-se resultar da transferência do resíduo adenilato do complexo E•lisil-adenilato para o P₃ [344].

Apesar desta larga inespecificidade no que respeita ao substrato aceitador de adenilato o AMP não era aceitador [344, 348, 351], não estando descrita a síntese de dinucleosídeos difosfatados.

A síntese de triptofanil-tRNA de pâncreas de boi não era capaz de catalisar a síntese de Ap₄A a partir de ATP [336, 352] mas, quando o ADP e o ATP foram simultaneamente adicionados a meios de ensaio contendo esta enzima, ocorria a síntese de Ap₃A [352].

1.4.c.1.3- Efeitos moduladores na actividade de síntese de dinucleosídeos polifosfatados.

Vários factores podem afectar a actividade de síntese de Ap₄A e outros dinucleosídeos polifosfatados catalisada por sintétases de aminoacil-tRNA.

A presença de PPI no meio de ensaio diminui marcadamente quer a velocidade inicial quer a extensão em que a reacção pode ocorrer [334, 336]. A marcada diminuição na velocidade inicial de síntese de Ap₄A induzida pela presença de PPI pode facilmente ser compreendida tendo em conta a diferença entre os valores de K_m para o ATP na síntese de Ap₄A (de ordem de grandeza mM [335, 336]) e para o PPI na reacção de troca ATP-PPI (de ordem de grandeza μ M [336]).

A adição de RNA de transferência a meios de ensaio adequados ao estudo da síntese de Ap₄A leva à formação do aminoacil-tRNA já que estes contêm ATP e o aminoácido correspondente à sintétase utilizada. Seria de esperar que o RNA de transferência correspondente inibisse de forma sistemática a síntese de Ap₄A ao competir com a segunda molécula de ATP pelo complexo E•aminoacil-adenilato. De facto, no caso da sintétase de fenilalanil-tRNA de *Escherichia coli* observou-se inibição [335]. No caso da sintétase de lisil-tRNA de *Escherichia coli* está descrita a observação de ligeira activação [334], ausência de efeito [348] ou ligeira inibição [336]. Estranhamente, está descrita uma activação de 10 vezes no caso da sintétase de valil-tRNA de *Saccharomyces cerevisiae* [336].

Também se observou estimulação específica da actividade de síntese de Ap₄A das sintétases de treonil-tRNA e de seril-tRNA de reticulócitos de coelho em consequência da fosforilação destas enzimas por acção da cínase de proteídos dependente do cAMP [341].

As actividades de síntese de Ap₄A e outros dinucleosídeos polifosfatados de algumas sintétases de aminoacil-tRNA são marcadamente estimuladas (10 a 200 vezes) pela adição de sais de Zn²⁺ ao meio de ensaio (contendo também sais de Mg²⁺) para concentrações de 50-100 μ M. Este efeito foi observado no caso de sintétases de fenilalanil-tRNA de diversas origens [335, 336, 338, 345, 351, 353, 354], de sintétases de lisil-tRNA também de diversas origens [335, 336, 338, 339, 354], de sintétases de alanil-tRNA e de prolil-tRNA de *Escherichia coli* [345] e de sintétases de seril-tRNA e de treonil-tRNA de reticulócitos de coelho [341]. Num estudo comparado das actividades de síntese de aminoacil-tRNA e Ap₄A de sintétases de metionil-, valil-, fenilalanil- e lisil-tRNA de *Escherichia coli* observou-se que, na ausência total de Zn²⁺ (EDTA presente), a razão entre as actividades de síntese de aminoacil-tRNA e de Ap₄A era, respectivamente, 2500, 1000, 362 e 68 [354]. Quando o ensaio de síntese de Ap₄A foi feito na presença de Zn²⁺ e na ausência de EDTA só se observou estimulação no caso das duas últimas enzimas de tal modo que o valor da razão acima referida baixou para 13 e 0,8, respectivamente. No que se refere ao efeito do Zn²⁺ a enzima mais estudada foi a sintétase de fenilalanil-tRNA de *Escherichia coli*; o Zn²⁺ provocava diminuição na velocidade de formação do complexo E•fenilalanil-adenilato mas estimulava a de transferência de adenilato para o ATP [353].

1.4.c.1.4- Síntese de dinucleosídeos polifosfatados *in vivo* por acção de sintétases de aminoacil-tRNA.

A equipa de Plateau e Blanquet [354] obteve estirpes de *Escherichia coli* superprodutoras de sintétases de aminoacil-tRNA específicas para os aminoácidos metionina, valina, fenilalanina e lisina, observando que, relativamente, ao controlo as actividades catalíticas aumentavam 20 a 74 vezes e a concentração de dinucleosídeos tetrafosfatados contendo pelo menos um resíduo adenina (Ap₄N) entre 3 e 14 vezes. Como era de prever, em nenhum dos casos se observou variação na concentração de dinucleotídeos que não continham, pelo menos, um resíduo adenina.

Um estudo recente da equipa de Kisselev, em que se usaram células derivadas de monócitos e linfócitos humanos (J96 e HL60), mostrou que o interferão, adicionado ao meio de cultura, provocava aumento quer na actividade enzimática da síntese de triptofanil-tRNA quer na concentração intracelular de Ap₃A sem provocar alteração na de Ap₄A [18]. Coerentemente com estes resultados, e como já referido (ver capítulo 1.4.c.1.2), a síntese de triptofanil-tRNA bovina não é capaz de catalisar a síntese de Ap₄A [336, 352] mas catalisa a de Ap₃A [352].

1.4.c.2- Transférase de guanilato do GTP (EC 2.7.7.45) e transférase de guanilato do RNA mensageiro (EC 2.7.7.50).

A ocorrência de altas concentrações de Gp₄G e Gp₃G em embriões de *Artemia* e outros crustáceos da classe *Brachiopoda* motivou o estudo da síntese dos diguanosídeos polifosfatados [10]. Ainda na década de setenta, Warner e colaboradores, purificaram parcialmente, a partir de embriões de *Artemia salina*, uma enzima, a transférase de guanilato do GTP, capaz de catalisar a síntese daqueles dinucleotídeos com concomitante libertação de PPi [355, 356]. Exigindo sais de Mg²⁺ no meio de ensaio, estas actividades catalíticas não dependiam, como no caso das sínteses de aminoacil-tRNA, da presença de nenhum cofactor orgânico [355].

Já nesta década a equipa de McLennan aprofundou os estudos anteriores tendo mostrado que durante o processo catalítico se forma um complexo intermediário contendo guanilato ligado a um resíduo histidina da enzima e que este complexo podia transferir o resíduo guanilato para uma segunda molécula de GTP (ver equações 10–12) [357, 358].



Para além do GTP eram também aceitadores de guanilato o dGTP, o GDP, o ADP, o XTP, o ITP, o p₄G e o P₃ mas não o ATP, o CTP, o UTP e nucleosídeos monofosfatados (NMP); na reacção de formação do intermediário mostrou-se que eram substratos o GTP (reacção 10), o Gp₄G (reacção 11) e o dGTP [357]. Os outros nucleosídeos trifosfatados testados eram incapazes de formar, com a enzima, um complexo intermediário pelo que todos os mono (p₄G) e dinucleosídeos polifosfatados sintetizados (Gp₄dG, Gp₃G, Gp₃A, Gp₄X, Gp₄I e Gp₅G) continham, pelo menos, um resíduo guanina. Na síntese de Gp₄G o K_m para o GTP foi avaliado em 6,7 mM e o V_{max} em 1,6 s⁻¹ [357].

Uma outra enzima que também se demonstrou ser capaz de catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados contendo, pelo menos, um resíduo guanina foi a transférase de guanilato de RNA mensageiro de *Saccharomyces cerevisiae*, do vírus da polihedrose citoplasmática do bicho da seda e do vírus da vacina [359, 360]. No processo catalítico formase um complexo enzimático contendo guanilato ligado a um resíduo lisina da enzima (ver equação 10) e, subsequentemente, ocorre a transferência do guanilato para o fosfato β de resíduos NDP da extremidade 5' de RNA mensageiros [360-362]. Verificou-se que em alternativa ao RNA mensageiro podiam funcionar como aceitadores o ppApG (K_m=2 μM) e variados mononucleosídeos tri e difosfatados (ATP, GTP, CTP, UTP, ADP, GDP, CDP e UDP) [359, 360]. A eficácia como aceitadores de guanilato destes últimos nucleotídeos era muito baixa (na concentração de 1 mM eram, todos eles, piores aceitadores que o ppApG [360]) e os nucleosídeos monofosfatados (NMP) não eram substratos. Incapaz de catalisar a síntese de dinucleosídeos difosfatados a transférase de guanilato de RNA mensageiro catalisava a síntese de Gp₄A, Gp₄G, Gp₄C, Gp₄U, Gp₃A, Gp₃G, Gp₃C e Gp₃U [359, 360].

1.4.d- A síntese de dinucleosídeos polifosfatados poderá ser catalisada pelas enzimas capazes de formar como intermediários complexos contendo adenilato.

Inspirada nos trabalhos sobre as sínteses de aminoacil-tRNA a equipa de Sillero e Sillero formulou, em 1990, a hipótese que, para além das sínteses de aminoacil-tRNA, outras enzimas capazes de formar um complexo E•X-NMP (X=ácido orgânico) com libertação concomitante de PPi poderiam também catalisar a transferência de adenilato para mononucleotídeos e, portanto, catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados [363]. Com base na semelhança entre os mecanismos enzimáticos descritos para as sínteses de aminoacil-tRNA, a luciférase de *Photinus pyralis* e as sínteses de acetil- e acil-CoA iniciou-se um projecto de investigação onde se integra o trabalho apresentado nesta memória.

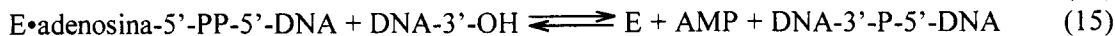
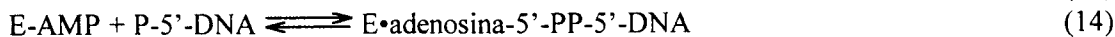
Antes do trabalho de investigação aqui apresentado se ter iniciado, a equipa de Sillero e Sillero demonstrou que a luciférase de *Photinus pyralis* podia catalisar a síntese de Ap₄A e outros dinucleotídeos com um número de fosfatos internos igual ou superior a quatro [363-367]. No caso da síntese de acetil-CoA o esforço de investigação incidiu de forma particular na síntese de p₄A e p₅A usando como substratos aceitadores de adenilato o P₃ e o P₄; embora o estudo não tenha sido aprofundado, durante esse trabalho de investigação também se observou que esta enzima podia catalisar a síntese de diadenosídeos polifosfatados [368].

Ao mesmo tempo que o trabalho experimental agora apresentado estava a terminar (1998) uma equipa dirigida por Sillero e Sillero, em que não participámos, demonstrou que outras enzimas capazes de formar a partir do ATP, já não um complexo E•X-AMP, mas um complexo E-AMP, podiam também catalisar a síntese de Ap₄A, Ap₃A, heterodinucleotídeos contendo adenina assim como p₄A; referimo-nos, concretamente, às ligases de DNA e RNA do bacteriófago T4 [369, 370]. No mesmo ano publicou-se um estudo independente em que se mostrava que a síntese de dinucleosídeos polifosfatados podia ser catalisada pela transcriptase reversa do HIV-1 e outros retrovírus [371].

Adiante, nos capítulos 1.4.d.1 e 1.4.d.2, apresentar-se-ão sumariamente os trabalhos sobre as ligases de DNA e RNA do bacteriófago T4 e a transcriptase reversa de retrovírus. Reservaremos capítulos próprios (1.5 e 1.6) para rever mais profundamente as enzimas (sínteses de acil-CoA e luciférase de *Photinus pyralis*) sobre as quais incidiu o nosso trabalho experimental (ver capítulo 2 [Artigos I a IV]).

1.4.d.1- Ligases de DNA (EC 6.5.1.1) e RNA (EC 6.5.1.3) do bacteriófago T4.

As ligases de DNA catalisam a formação de uma ligação éster entre um resíduo fosfato (5') e um grupo hidroxilo (3') de distintos nucleotídeos do DNA [372]. No caso das enzimas de mamíferos e do bacteriófago T4 a reacção depende da presença de ATP e o mecanismo reactivo pode ser esquematizado como se segue [372, 373]:



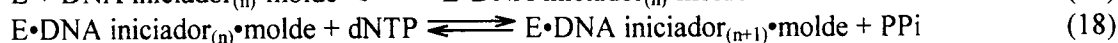
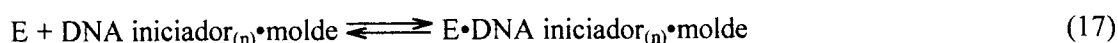
No primeiro passo do processo catalítico ocorre a transferência do resíduo adenilato do ATP para a enzima, formando-se, de forma análoga ao caso da transférase de guanilato de RNA mensageiro (ver capítulo 1.4.c.2), uma ligação entre o fosfato do adenilato e um resíduo lisina da enzima [372] com concomitante libertação de PPi (ver equação 13). Sabia-se que o complexo E-AMP formado podia transferir o resíduo adenilato para o resíduo fosfato da

extremidade 5' de uma cadeia de DNA (ver equação 14). Demonstrou-se, recentemente, que também podiam funcionar como aceitadores de adenilato o P_3 , o ATP, o ADP, o GTP ou o dATP formando-se p_4A , Ap_4A , Ap_3A , Ap_4G ou Ap_4dA , respectivamente [369]. O DNA contendo roturas na ligação fosfoéster em que está envolvido o grupo hidroxilo 3' (P-5'-DNA) era, como previsto, inibidor nas reacções de formação dos mono e dinucleosídeos polifosfatados e o P_3 e o mononucleotídeo testado (GTP) eram, reciprocamente, inibidores do processo de reparação dessas roturas no DNA [369].

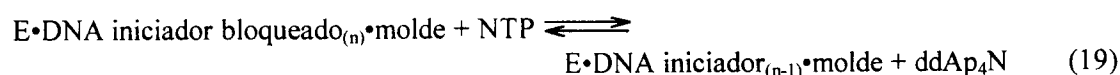
O mecanismo catalítico da ligase de RNA do bacteriófago T4 era também conhecido e semelhante ao da ligase de DNA; se substituirmos DNA por RNA o esquema apresentado acima (ver equações 13-16) descreve esse mecanismo [374, 375]. Num trabalho mais completo que o que havia sido feito para o caso da ligase de DNA, estudou-se também a possibilidade de a síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados poder ser catalisada por aquela enzima viral [370]. Para além dos mesmos compostos que se havia demonstrado serem aceitadores de adenilato no caso da ligase de DNA foram, neste caso, também testados o P_4 , o p_4A , o XTP, o dGTP, o CTP, o dCTP e o ddATP tendo-se observado que, de forma desigual, todos eles eram substratos [370]. Foi assim possível observar a síntese de p_4A , Ap_4A , Ap_3A , Ap_4G , Ap_4dA , p_5A , Ap_5A , Ap_4X , Ap_4dG , Ap_4C , Ap_4dC e Ap_4ddA . Como substratos dadores de adenilato foram testados cinco nucleotídeos: o ATP era muito melhor substrato que o dATP e o ATP γ S enquanto que o CTP e o GTP não eram substratos [370]. O K_m do ATP no processo de formação do complexo E-AMP era conhecido e de cerca de 10 μ M [374]. Nas actividades de síntese de Ap_4G ou Ap_4A foram estimados os K_m do GTP e do ATP que eram cerca de 1,2 mM em ambos os casos; os V_{max} eram 0,017 s^{-1} e 0,055 s^{-1} , respectivamente [370]. Conhecidos nucleosídeos bisfosfato (5' e 3' ou 5' e 2') aceitadores de adenilato alternativos ao RNA [374] foram testados como inibidores da síntese de Ap_4A : como previsto o pCp, o pAp e o pA(2')p eram inibidores da síntese de Ap_4A [370]. O pH óptimo da actividade de síntese de Ap_4G era 7,4 [370].

1.4.d.2- Transcriptase reversa (EC 2.7.7.49).

As transcriptases reversas de retrovírus como o HIV-1 catalisam a formação de DNA de cadeia dupla (usando como molde uma cadeia de RNA ou DNA) pela sucessiva adição de unidades 2'-desoxinucleotidato na extremidade 3'-hidroxilo da cadeia em crescimento (RNA ou DNA iniciador ou "primer") [376, 377]. O mecanismo catalítico pode ser esquematizado como se segue:



Quando o resíduo nucleotídico adicionado não contém um grupo hidroxilo no carbono 3' (da pentose) o complexo DNA iniciador•molde formado diz-se bloqueado uma vez que não é possível a continuação do crescimento da cadeia de DNA. Observou-se que a transcriptase reversa do HIV-1 podia catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados quando a enzima era incubada na presença de um complexo bloqueado pela presença do resíduo terminal 2',3'-didesoxiadenilato na extremidade 3' e de variados nucleosídeos trifosfatados (ATP, dATP, GTP, dGTP, ddGTP, CTP, dCTP, UTP, α,β -metileno-ATP e β,γ -metileno-ATP) ou de ADP [371]. O complexo E•DNA iniciador bloqueado•molde podia transferir o resíduo didesoxiadenilato para estes mononucleotídeos originando a síntese de dinucleosídeos polifosfatados contendo didesoxiadenosina (ver equação 19) [371].



Esta reacção de transferência do resíduo didesoxiadenilato para aceitadores adequados, apesar de lenta (entre $0,00004 \text{ s}^{-1}$ no caso do α,β -metileno-ATP e $0,0015 \text{ s}^{-1}$ no caso do GTP), permitia desbloquear o processo de crescimento da cadeia do DNA. Os K_m variavam entre $0,74 \text{ mM}$ (dGTP) e 10 mM (β,γ -metileno-ATP) e o AMP não era substrato. No trabalho experimental em análise, a base complementar à cadeia do DNA molde na posição seguinte ao do complexo bloqueado era a timina e o TTP adicionado ao meio de ensaio inibia ($K_i=5 \text{ }\mu\text{M}$) o processo de síntese dos dinucleosídeos polifosfatados [371]. Para além da transcriptase reversa do HIV-1 também se comprovou que outras transcriptases de dois outros retrovírus podiam catalisar as mesmas reacções [371].

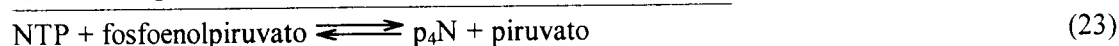
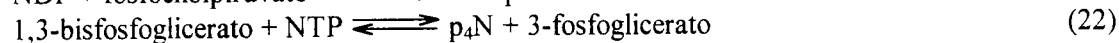
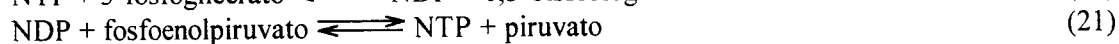
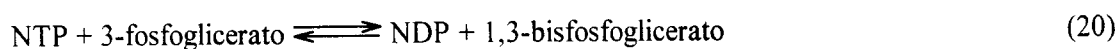
1.4.e- Síntese enzimica de mononucleosídeos polifosfatados.

Todas as enzimas que foram descritas como podendo catalisar a síntese de mononucleosídeos polifosfatados fazem-no de modo pouco específico.

Em algumas destas enzimas (luciférase de *Photinus pyralis*, sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*, sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae*, sintétase de lisil-tRNA de *Escherichia coli*, lígases de DNA ou RNA do bacteriófago T4 e transférase de guanilato de GTP de *Artemia*) ocorre, com concomitante libertação de PPi, a formação de um intermediário contendo o resíduo adenilato [344, 365, 368-370, Artigos I, II e IV] ou guanilato [357] que pode ser transferido para polifosfatos. Este tipo de enzimas já foram ou serão objecto de análise noutros capítulos desta memória (ver capítulos 1.4.c, 1.4.d, 1.5.a.2, 1.6.b e 2).

Para além destes casos também está descrita a síntese de mononucleosídeos polifosfatados por enzimas capazes de catalisar a transferência de resíduos fosfato como a cinase do 3-fosfoglicerato (EC 2.7.1.31) [40, 378] e a cinase do adenilato (EC 2.7.4.3) [379].

Nos laboratórios de Small e Cooper [40] e de Sillero e Sillero [378] estudou-se, respectivamente, a síntese de p_4A e de p_4G pela cinase do 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Em ambos os estudos o meio de ensaio continha para além da cinase do 3-fosfoglicerato (equações 20 e 22), fosfoenolpiruvato, 3-fosfoglicerato, um nucleosídeo trifosfatado (ATP [40] ou GTP [378]) e cinase do piruvato (equação 21). Admite-se que a síntese de p_4A (ou p_4G) observada poderia ocorrer através do conjunto de reacções que se esquematiza a seguir:



A cinase do 3-fosfoglicerato catalisaria a transferência de fosfato do 1,3-bisfosfoglicerato para o NTP com formação de p_4N (equação 22). A razão entre a actividade de síntese de ATP e 3-fosfoglicerato a partir de ADP e 1,3-bisfosfoglicerato (ver equação 20) e a de síntese de p_4A foi estimada em 10000 por Small e Cooper [40]; um valor da mesma ordem de grandeza (48000) foi estimado quando a actividade em comparação era a síntese de p_4G [378].

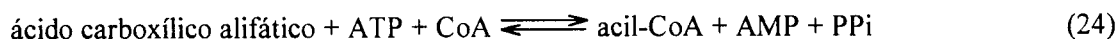
Também foi observada síntese de p_4A pela cinase de adenilato de músculo de coelho e de porco [379]. Esta actividade enzimica era, tal como a da cinase do 3-fosfoglicerato, extremamente baixa; demonstrou-se estar dependente da presença simultânea de ATP e ADP e admitiu-se que pudesse ocorrer através de um mecanismo de fosfotransferência do ADP para o ATP [379].

Durante a hidrólise do Ap_5A e do Ap_6A , por acção de fosfodiésterases extracelulares forma-se, para além de AMP, p_4A e p_5A , respectivamente (ver capítulo 1.4.a.5).

A síntese de eteno-p₄A a partir de eteno-ATP, por enzimas de natureza desconhecida, foi recentemente observada em grânulos cromafins de medula supra-renal bovina [57].

1.5 - Sintétases de acetil- e acil-CoA (EC 6.2.1.x).

Ao longo das últimas cinco décadas tem sido identificado um crescente número de enzimas capazes de catalisar a reacção expressa pela seguinte equação:



O ácido carboxílico alifático tioesterificado com a coenzima A diz-se activado porque à ligação tioéster corresponde uma elevada energia de hidrólise [380, 381] e é esta a forma com que os ácidos gordos e o acetato interagem com outras enzimas quer como substratos quer como reguladores [382, 383].

A história da identificação e caracterização destas enzimas começa no final dos anos quarenta e início dos cinquenta. Nessa época foi descoberta a existência, por Lipmann e colaboradores [384-386], da actividade enzimática de síntese de acetil-CoA em diversas preparações biológicas assim como a de duas actividades catalíticas do mesmo tipo, mas com especificidades distintas relativamente ao substrato carboxílico, por Kornberg e Pricer (sintétase de acil-CoA de cadeia longa) [387] e Mahler e colaboradores (sintétase de acil-CoA de cadeia média) [380].

À diversidade de ácidos gordos correspondem, na mesma e em distintas espécies de seres vivos, diversas enzimas com especificidades que se sobrepõem parcialmente. A Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica várias actividades catalíticas deste tipo: a sintétase de acetil-CoA (EC 6.2.1.1), a sintétase de butiril-CoA (EC 6.2.1.2)², a sintétase de acil-CoA de cadeia longa (6.2.1.3), a sintétase de araquidonil-CoA (EC 6.2.1.15), a sintétase de propionil-CoA (EC 6.2.1.17), a sintétase de dicarboxilil-CoA (EC 6.2.1.23) e a sintétase de fitanoil-CoA (EC 6.2.1.24).

Artigos de revisão que incluem aspectos desta temática foram publicados nas décadas de sessenta [390, 391], setenta [392-395], oitenta [382, 396] e noventa [397].

No capítulo 1.5.a fazemos uma revisão sobre a sintétase de acetil-CoA (EC 6.2.1.1). Admitindo que a enzima de *Pseudomonas fragi*, que usámos para estudar as actividades de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados [Artigos I e II], se poderia classificar como uma sintétase de acil-CoA de cadeia longa (EC 6.2.1.3) revemos, com alguma profundidade, os trabalhos de investigação de outros autores com esta enzima (capítulo 1.5.b). Sumariamente referimos características de outras sintétases de acil-CoA no capítulo 1.5.c. O interesse dos trabalhos sobre o mecanismo enzimico das sintétases de acil-CoA em geral e da sintétase de acil-CoA de cadeia longa em particular nos estudos que desenvolvemos [Artigos I e II] levaram-nos a reservar um capítulo próprio (capítulo 1.5.d) para a revisão desta última temática.

² Tal como referido por Groot [388] o nome oficial ("Butyryl-CoA ligase") é uma possível fonte de confusão porque existe uma enzima identificada por Webster e colaboradores [389] cuja actividade é máxima relativamente ao butirato. Um nome alternativo proposto pela IUBMB "fatty acid thiokinase (medium chain)" ou o de sintétase de acil-CoA de cadeias médias poderiam ser mais adequados.

1.5.a- Sintetase de acetil-CoA (EC 6.2.1.1).

1.5.a.1- A actividade de síntese de acetil-CoA. Aspectos funcionais e estruturais das sintetases de acetil-CoA.

A actividade catalítica da sintetase de acetil-CoA foi identificada em preparações biológicas obtidas de diferentes tecidos de mamíferos [381, 398-404] e aves [384, 386, 398], outros eucariontes [385, 405-410] e procariontes [411, 412]. Esta enzima foi purificada a partir de *Saccharomyces cerevisiae* [405, 406, 413], mitocôndrias de coração de boi [403, 414-417], tubérculos de *Solanum tuberosum* [409], sementes de *Pinus radiata* [407] assim como a partir de *Methanothrix soehngenii* [412], *Bradyrhizobium japonicum* [411] e *Penicillium chrysogenum* [410].

Genes codificantes de sintetases de acetil-CoA foram recentemente identificados em diversos eucariontes [418-424] e procariontes [425-427]. No *Saccharomyces cerevisiae* existem duas isoenzimas da sintetase de acetil-CoA codificadas por genes distintos (*ACS1* e *ACS2*) [423, 424]. Nas condições habituais de cultura, Acs1p (a enzima codificada por *ACS1*) predomina largamente o que faz com que as características cinéticas atribuídas à sintetase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* sejam, na prática, as características cinéticas de Acs1p [428]. Frenkel e Kitchens [406] determinaram que os valores de K_m para o ATP, acetato e coenzima A na reacção de activação do acetato catalisada pela sintetase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae*, seriam respectivamente cerca de 1,2 mM, 300 μ M e 35 μ M. O propionato também é substrato de Acs1p [428]. A massa molecular dos proteídeos correspondentes aos genes *ACS1* e *ACS2* são, respectivamente, 79,2 e 75,4 kDa [423, 424] estando de acordo com valores previamente obtidos para as subunidades destas enzimas [405, 429]. Estudos de ultracentrifugação analítica e de filtração em gel mostraram que a massa molecular da enzima correspondente a *ACS1* poderia ter 151 kDa [406] ou 250 kDa [405] o que deixa em aberto a possibilidade de se tratar de um dímero ou um trímero.

No mais recente estudo publicado sobre a enzima purificada de mitocôndrias de coração de boi foram estimadas constantes cinéticas da mesma ordem de grandeza das indicadas acima para Acs1p e, usando SDS-PAGE, uma massa molecular de 72 kDa [417]. A partir de estudos de centrifugação em gradientes de sacarose haviam, anteriormente, sido calculados valores da mesma ordem de grandeza para a massa molecular desta enzima [403, 416] pelo que é de presumir que seja um monómero. Esta enzima, tal como Acs1p, também catalisa a tioesterificação do propionato [381, 414].

Estudos de fraccionamento em tecidos de rato, cobaio e coelho revelaram que nos músculos cardíaco e esquelético, no cérebro e no rim a sintetase de acetil-CoA seria uma enzima da matriz mitocondrial enquanto no tecido adiposo e na glândula mamária existiria quer no citosol quer na matriz das mitocôndrias; no fígado parece ser fundamentalmente uma enzima citosólica [399, 400, 402, 404].

Para além do ATP e, possivelmente, do dATP [411], a sintetase de acetil-CoA não parece aceitar, na reacção de síntese de acetil-CoA, outros nucleotídeos como substratos [409, 411, 414].

A formação de acetil-CoA a partir de ATP, acetato e coenzima A e a reacção de troca ATP-PPi depende da presença do catião Mg^{2+} [384, 386, 398, 406, 408, 411, 413, 430] ou outros catiões bivalentes como o Mn^{2+} ou o Co^{2+} [411] admitindo-se que quer o ATP quer o PPi interagem com a enzima complexados com um destes catiões bivalentes [408, 430]. O pH ótimo é de cerca de 7,5-9 [386, 406, 410, 411, 431].

1.5.a.2- Síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados pela sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae*.

No laboratório de Sillero e Sillero demonstrou-se, em 1993, que a sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* era capaz de catalisar a síntese de p_4A ou p_5A a partir de ATP e P_3 ou P_4 , respectivamente [368]. Estas actividades, assim como a actividade de troca ATP-PPi, embora ligeiramente estimuladas pelo acetato, não dependiam da adição de acetato ao meio de ensaio. Entre os nucleotídeos testados como possíveis dadores de adenilato ao P_3 eram substratos o ATP, o ATP γ S e o acetil-adenilato mas não outros nucleotídeos como o CTP, o UTP, o GTP, o dATP, o ATP α S, o α,β -metileno-ATP e o β,γ -metileno-ATP. Os valores de K_m para o ATP, o acetil-adenilato e o P_3 foram avaliados em 160 μ M, 1,8 mM e 4,7 mM, respectivamente. A pH 6,3 (ótimo para a actividade de síntese de p_4A mas não para a actividade de síntese de acetil-CoA) a actividade de síntese de p_4A (7,5 mU/mg de proteído) era 245 vezes menor que a actividade de síntese de acetil-CoA [368]. Admitindo homogeneidade na preparação enzimica utilizada e um sítio activo por subunidade (79,2 kDa) [423] é possível calcular um número de renovação (“turn-over number”) na velocidade de síntese de p_4A de 0,01 s⁻¹. Observou-se dependência de um catião bivalente e um máximo de actividade quando as concentrações molares de Mg²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ ou Zn²⁺ eram algo inferiores à soma das concentrações dos substratos ATP e P_3 ; o Mg²⁺ e o Mn²⁺ tinham uma eficácia equivalente, enquanto que a eficácia do Co²⁺ e do Zn²⁺ era menor [368]. A coenzima A era um potente inibidor da síntese de p_4A sendo que o acetato, adicionado simultaneamente ao meio de ensaio, podia antagonizar este efeito inibidor [368]. No trabalho em análise deu-se especial atenção ao estudo da síntese de p_4A e p_5A mas, no decurso desse trabalho, também se obtiveram dados que indicam que a sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* também pode catalisar a síntese de diadenosídeos polifosfatados (Ap_nA; n=4-6) [368].

1.5.b- Sintétase de acil-CoA de cadeia longa (EC 6.2.1.3).

1.5.b.1- Localização da enzima.

A sintétase de acil-CoA com maior especificidade em relação a ácidos gordos de cadeia longa (geralmente considerando estes como tendo entre 10 e 18 átomos de carbono) foi originalmente descoberta por Kornberg e Pricer [387] em microssomas de fígado de cobaio. É frequentemente designada de acordo com a actividade catalítica efectivamente estudada: assim, a designação sintétase de palmitil-CoA é frequentemente utilizada [432-445].

Actividades catalíticas compatíveis com a presença de sintétases de acil-CoA de cadeia longa estão descritas em vários órgãos, tecidos e células de mamíferos como fígado [387, 436, 438-440, 446-468], cérebro [443, 469-472], músculo esquelético [473, 474], músculo cardíaco [439, 474-476], rim [475, 477], tecido adiposo [437, 445, 474, 475, 478-480], glândula supra-renal [481], mucosa intestinal [439, 482-485], testículos [486], artérias [487], plaquetas sanguíneas [488] e fibroblastos [442, 489, 490]. Actividades do mesmo tipo também foram observadas noutros eucariontes [491-494] e em procariontes [495-501]. Laposata e colaboradores [502] num estudo comparativo entre as actividades de síntese de araquidonil-CoA e oleil-CoA dão conta da existência destas actividades em múltiplas células e tecidos humanos tais como granulócitos, linfócitos, plaquetas, eritrócitos, células musculares lisas e endoteliais, fibroblastos, rim, cérebro, fígado, tecido adiposo, pulmão e baço.

Muitos estudos visaram a localização intracelular desta actividade catalítica em tecidos de mamífero. Após a sua descoberta em microssomas hepáticos de cobaio [387], a sua presença nesta fracção foi, mais tarde, confirmada noutras espécies e noutros tecidos [437, 445-447, 451, 456, 469, 470, 481, 484, 485, 488, 492]. Também se observou a sua existência

na membrana externa de mitocôndrias de vários tecidos [450, 462, 475, 476, 479] assim como na membrana de peroxissomas de fígado de rato [457-461] e de fígado [456] ou de fibroblastos humanos [442, 489, 490]. A identidade da enzima presente nas membranas de microssomas, mitocôndrias e peroxissomas hepáticos de rato foi comprovada por estudos imunológicos; anticorpos desenvolvidos no coelho contra a síntese de acil-CoA de cadeia longa purificada a partir de microssomas de rato reagem com a enzima (e inactivavam a síntese de palmitil-CoA) dos três organelos [452]. A sensibilidade da actividade de síntese de acis-CoA ao tratamento de fracções celulares com enzimas proteolíticas e anticorpos específicos assim como a escassa ou nula activação por agentes permeabilizadores sugerem que o centro activo está voltado para a face citosólica nas três membranas referidas [439-442, 459, 460, 462, 463, 489, 490]. Muito recentemente a enzima em análise foi identificada em vesículas isoladas de adipócitos de rato contendo GLUT4 (um transportador de glicose) [503].

1.5.b.2- Estudos de purificação e caracterização.

Preparações mais ou menos purificadas de sínteses de acil-CoA de cadeia longa foram obtidas a partir de microssomas ou mitocôndrias hepáticos de cobaio ou de rato [387, 436, 438, 453, 454] assim como de *Candida lipolytica* [494], *Saccharomyces cerevisiae* [493], *Bacillus megaterium* [496], *Pseudomonas aeruginosa* [497] e *Escherichia coli* [499, 500]. Entre estes estudos é de destacar o trabalho de Tanaka e colaboradores [396, 453] que, no final da década de setenta, conseguiram purificar, a partir de microssomas e mitocôndrias hepáticos de rato, uma enzima com este tipo de actividade obtendo preparações de onde estavam aparentemente ausentes outros proteídeos.

A massa molecular da enzima de rato, determinada por SDS-PAGE, era de 76 kDa [453]; determinada por filtração em gel foi avaliada em 250 kDa [438, 455].

A enzima de mamífero catalisa com eficácia semelhante a activação de ácidos gordos com 10 a 18 carbonos, no caso dos saturados, e com 16 a 20 no caso dos insaturados; é bastante menos eficaz para ácidos gordos com comprimentos de cadeia maiores ou menores [387, 438, 448, 449, 451, 453, 455, 458, 475, 476, 481]. Tal como no caso das sínteses de acil-CoA de cadeia média (ver capítulo 1.5.c.2) também esta enzima parece poder activar xenobióticos como análogos de ácidos gordos de cadeia longa contendo enxofre, derivados do ácido fíbriico e outros ácidos carboxílicos aromáticos [464-468].

Os valores de K_m aparentes para os ácidos gordos e a coenzima A foram, em geral, estimados como sendo de ordem de grandeza μM [438, 447, 448, 451, 453, 455, 471, 480, 481, 487]. O palmitil-CoA é inibidor competitivo em relação à coenzima A sendo o valor do K_i de cerca de 4 μM [504, 505]. Para além da coenzima A análogos deste composto como a 3'-defosfocoenzima A e a 4'-fosfopanteteína poderão também ser aceitadores de acilo embora com valores de K_m de uma ordem de grandeza superior [453]. Em relação aos nucleotídeos testados na reacção de tioesterificação apenas o ATP e o dATP eram substratos [438, 453, 455]. As estimativas do valor do K_m para o ATP foram, de um modo geral, de ordem de grandeza mM [387, 438, 451, 453, 455, 487] mas, baixando a concentração da coenzima A, podem ser obtidos valores de K_m aparente muito mais baixos: num estudo de Bar-Tana e colaboradores [433] quando a concentração de coenzima A utilizada era 0,42 μM o K_m aparente do ATP foi avaliado em 11 μM . Uma síntese de acil-CoA que poderá ter um K_m para o ATP excepcionalmente baixo é a enzima de *Pseudomonas aeruginosa* onde, mesmo usando uma concentração de coenzima A de 200 μM , foi observado um K_m de 35 μM [501]. Esta enzima (tal como a de *Escherichia coli* [499]) tem também um leque mais abrangente no que se refere à especificidade de substrato sendo activa em ácidos gordos com comprimentos de cadeia entre 6 e 18 carbonos [498]. O pH óptimo situa-se entre 7 e 9 e a actividade catalítica depende da presença de catiões bivalentes como o Mg^{2+} [438, 453, 455, 487].

1.5.b.3- Estudos de biologia molecular.

Em 1990, identificou-se um gene de rato codificante de uma sintétase de acil-CoA de cadeia longa (*ACS1*) [506] e, posteriormente, outros quatro genes codificantes de isoenzimas na mesma espécie (*ACS2-ACS5*) [507-510]. Recentemente, foram também identificados genes de sintétases de acil-CoA em humanos [444, 511-514], em ratinhos [515], noutros eucariontes como *Saccharomyces cerevisiae* [493, 516] e *Brassica napus* [517] e em procariontes como *Escherichia coli* [518, 519], *Pseudomonas oleovorans* [520] e *Mycobacterium bovis* [521].

O proteído codificado pelo gene *ACS1* (*ACS1*) tem 699 aminoácidos, uma massa molecular de 78177 Da e o RNA mensageiro correspondente encontrava-se principalmente no fígado, coração e tecido adiposo [506]. *ACS2* e *ACS5* têm, respectivamente, menos 2 e menos 16 aminoácidos que *ACS1* e as sequências primárias dos três proteídos são 60 a 65% idênticas entre si [507, 510]. Os RNA mensageiros correspondentes aos genes *ACS2* e *ACS5* foram identificados em vários tecidos e eram, respectivamente, mais abundantes no cérebro [507] e no intestino delgado [510]. *ACS1*, *ACS2* e *ACS5* foram expressados em *Escherichia coli*, os proteídos produzidos purificados e a sua actividade estudada [510, 522]. O leque de ácidos gordos activados pelas três isoenzimas era muito semelhante [510, 522] e estava basicamente de acordo com os estudos anteriormente realizados com preparações purificadas da sintétase de acil-CoA de cadeia longa ou em fracções de vários tecidos [387, 438, 448, 449, 451, 453, 455, 458, 475, 476, 481]. Entre os ácidos gordos saturados qualquer das três isoenzimas tinha como substrato preferencial o palmitato [510, 522]; *ACS2* e *ACS5* eram, relativamente a *ACS1*, particularmente activos em relação a ácidos gordos poli-insaturados [510, 522].

O grau de identidade entre a estrutura primária de *ACS3* e as estruturas primárias de *ACS1*, *ACS2* e *ACS5* é de cerca de 30% [508, 510]. O gene correspondente (*ACS3*) foi expressado em células COS e a enzima produzida foi purificada tendo-se verificado que o espectro de especificidade em relação a ácidos gordos era típica de uma sintétase de acil-CoA de cadeia longa mas, ao contrário de *ACS1*, *ACS2* e *ACS5*, o laurato e o miristato eram, entre os ácidos gordos saturados, os substratos preferenciais [508]. O RNA mensageiro correspondente ao gene *ACS3* era, tal como o do *ACS2*, mais abundante no cérebro [508].

A estrutura primária de *ACS4* é cerca de 68% idêntica à de *ACS3* [509]. *ACS4* foi expressado em *Escherichia coli* e *ACS4*, a enzima produzida, foi purificada [509]. O estudo da sua actividade revelou um espectro de especificidade relativamente ao substrato ácido gordo algo peculiar; embora capaz de catalisar a tioesterificação dos mesmos ácidos gordos que as restantes isoenzimas atrás referidas tinha como substratos preferenciais o ácido araquidónico e o timnodónico [509]. Os valores de $V_{\max}$ relativamente ao palmitato e aos dois ácidos poli-insaturados atrás referidos eram semelhantes mas os valores do K_m relativamente ao araquidonato e ao timnodonato (15 e 12 μM , respectivamente) eram muito mais baixos que o do palmitato (100 μM) [509]. *ACS4* tinha os mais altos níveis de expressão no córtex supra-renal mas também era expressado no epidídimo, cérebro, vesícula seminal, pulmão, ovário e fígado [509]. É possível que este gene corresponda a uma actividade classificada como sintétase de araquidonil-CoA (EC 6.2.1.15) e que havia, na década de oitenta, sido individualizada a partir de estudos em plaquetas sanguíneas humanas e em cérebro de boi e de rato [472, 502, 523-525].

As equipas de Yamamoto [511] e de Singh [444] identificaram dois genes humanos codificadores de sintétases de acil-CoA com 698 e 699 aminoácidos, respectivamente; as estruturas primárias dos proteídos eram muito semelhantes entre si (mas não idênticas) e muito semelhantes (graus de identidade superiores a 84%) à da enzima *ACS1* de rato. Ambos os genes foram localizados no cromossoma 4 [511, 526]. Genes humanos codificadores de enzimas com estruturas primárias com graus de identidade muito elevados relativamente a *ACS3* (92%) [512] e *ACS4* (97%) [513, 514] de rato foram também recentemente

identificados. O gene humano correspondente a *ACS3* foi localizado no cromossoma 2 [512] e o correspondente a *ACS4* no cromossoma X [513, 514]. O gene identificado no ratinho era 95% idêntico ao gene *ACS1* de rato [515].

Existem grandes semelhanças entre as estruturas primárias das sintétases de acil-CoA e as de outras enzimas, nomeadamente as luciférase de insectos coleópteros; as estruturas primárias de *ACS1* de rato e a da luciférase de *Photinus pyralis* são 35,8% idênticas e, considerando substituições conservadoras, 55,2% semelhantes [506]. As estruturas primárias de todas as sintétases de acil-CoA referidas neste subcapítulo podem ser descritas como contendo cinco regiões: duas regiões (LS1 e LS2) que são muito semelhantes à estrutura primária de luciférase de insectos coleópteros, uma sequência de aminoácidos separando estas duas regiões e que não tem equivalente nas luciférase e ainda uma extremidade amina terminal e uma outra carboxílica terminal [507-512, 514, 522]. A temática da semelhança estrutural entre as sintétases de acil- e acetil-CoA, as luciférase de insectos coleópteros e outras enzimas será abordada com mais pormenor no capítulo 1.7.

1.5.b.4- Regulação da actividade enzimica.

Embora se admita que a actividade de síntese de acil-CoA de cadeia longa possa, *in vivo*, ser parcialmente regulada pela concentração de ácidos gordos, coenzima A, acil-CoA ou pela concentração de AMP [504, 505] outros factores, como modificação da quantidade de enzima [474, 506, 515, 527, 528] e, eventualmente, mecanismos de modificação covalente [480], poderão ter também um papel importante na sua regulação.

Em meados dos anos setenta, observou-se que a adição de insulina a adipócitos isolados de rato estimulava a actividade de síntese de palmitil-CoA dos microsomas tendo-se formulado a hipótese de que poderiam estar envolvidos mecanismos de fosforilação e desfosforilação reversíveis [480]. Apoiando esta possibilidade observou-se, posteriormente, que a adrenalina e o dibutiril-cAMP provocavam no mesmo sistema experimental diminuição da actividade enzimica; contudo, não foi possível observar qualquer efeito na actividade quando microsomas isolados foram incubados na presença de cAMP, cínase de proteídeos dependente do cAMP e ATP [478].

Na sequência da identificação de *ACS1* observou-se que a quantidade do RNA mensageiro correspondente diminuía no fígado com o jejum e aumentava 7-8 vezes em relação ao controlo quando o jejum era interrompido e se fornecia ao animal de experiência uma dieta rica em glicídeos ou em lípidos [506]. Aumentos marcados na quantidade de RNA mensageiro específico de *ACS1* (40 vezes) e na actividade catalítica (4 vezes) foram observados no fígado de ratos tratados com fenofibrato [529]. O gene *ACS1* dá origem a três tipos de RNA mensageiros que se distinguem por conterem três primeiros exões diferentes entre si; *ACS1*, o proteído codificado pelos três RNA mensageiros, é sempre o mesmo porque o códon de iniciação da tradução está no segundo exão [530]. A cada um dos primeiros exões corresponderia um promotor distinto [530, 531]. O efeito do fenofibrato (curiosamente um substrato da enzima [465]) e, em menor grau, o dos próprios ácidos gordos, como indutores da síntese de *ACS1*, envolveria a activação de um proteído que interagia com o promotor de um dos três exões acima referidos [531]. É possível que o efeito estimulador da expressão de *ACS1* induzido pela ingestão de dietas ricas em glicídeos ou lípidos observado no fígado de rato [506] seja uma consequência do aumento da concentração intracelular de ácidos gordos [527, 531]. A insulina não parece ter um papel estimulador da transcrição a nível hepático [527] mas é possível que possa induzir este efeito no tecido adiposo: adicionada ao meio de cultura, a insulina aumentava a concentração do RNA mensageiro codificante de *ACS* de ratinho (semelhante a *ACS1* de rato) numa linha celular de adipócitos desta espécie (3T3-L1) [515, 528].

O efeito do exercício físico na actividade de síntese de palmitil-CoA e na quantidade de RNA mensageiro correspondente ao gene *ACSI* também foi estudado tendo-se observado que, relativamente aos controlos sedentários, ambos os parâmetros estavam diminuídos no tecido adiposo visceral de ratos submetidos a exercício físico [474]. No músculo esquelético, pelo contrário, a actividade da enzima aumentava não se tendo, no entanto, observado diferenças na quantidade do RNA mensageiro correspondente a *ACSI* [474].

1.5.c- Outras síntetases de acil-CoA.

1.5.c.1- Síntetase de propionil-CoA (EC 6.2.1.17).

Uma enzima mais activa em relação ao propionato comparativamente a outros ácidos carboxílicos, nomeadamente o acetato e o butirato, foi identificada na matriz de mitocôndrias hepáticas de carneiro [401], cobaio [532] e boi [533], tendo as enzimas de cobaio e boi sido parcialmente purificadas [532, 533]. O ATP parece ser o único nucleotídeo que pode interagir com a enzima na reacção de síntese de propionil-CoA [401]. O valor do K_m do propionato determinado por Groot para a síntetase de propionil-CoA de cobaio era 0,43 mM, cerca de 10 e 100 vezes menor que o do butirato e acetato, respectivamente [532]. O valor de 73 kDa para a massa molecular da enzima bovina foi determinado por centrifugação em gradientes de sacarose [533].

1.5.c.2- Síntetase de butiril-CoA e/ou síntetase de acil-CoA de cadeia média (EC 6.2.1.2).

Actividade catalítica de síntese de acis-CoA de cadeia média foi observada em vários tecidos de mamíferos como por exemplo fígado [380, 475, 532, 534-540], rim [475], coração [389, 475] e mucosa intestinal [482]. Esta actividade parece ser característica da matriz das mitocôndrias [475, 536]. No caso das mitocôndrias hepáticas de boi [537] e de cobaio [532] existiriam pelo menos duas enzimas com este tipo de actividade. Uma delas, que se admite poder corresponder à enzima estudada por Mahler e colaboradores na década de cinquenta [380], teria como substratos preferenciais os ácidos heptanoico e hexanoico sendo também capaz de activar ácidos gordos com número de carbonos entre 4 e 12, ácidos gordos ramificados e outros ácidos carboxílicos como o ácido benzoico [380, 532, 537]. Na década de setenta, foi possível separar esta actividade de uma outra com especificidade semelhante em relação a ácidos gordos mas com maior actividade em relação ao ácido benzoico e que, contrariamente à primeira, também catalisava a activação do ácido salicílico [532, 537].

Já na década de noventa, duas equipas, de Kasuya e colaboradores [535] e de Vessey e Kelley [534] purificaram, independentemente, síntetases de acil-CoA de mitocôndrias hepáticas de boi em que o substrato preferencial era, em ambos os casos, o ácido hexanoico. As preparações enzimáticas purificadas obtidas nos dois estudos eram também capazes de catalisar a activação de outros ácidos alifáticos de cadeia média e uma enorme variedade de ácidos carboxílicos aromáticos (xenobióticos) [534, 535]. A sequência de aminoácidos da enzima purificada por Vessey e Kelley foi parcialmente determinada [534].

Uma outra enzima com uma especificidade de substrato distinta foi identificada e purificada, nos anos sessenta, por Webster e colaboradores em mitocôndrias de coração de boi [389]. Tinha como substrato preferencial o butirato e, sendo activa em relação a ácidos alifáticos saturados com 3 a 7 carbonos não era activa em relação ao ácido benzoico [389]. Os valores de K_m aparentes para o butirato, ATP e coenzima A, determinados por Webster e colaboradores [389] foram, respectivamente, 1,5 mM, 3 mM e 800 μ M. Uma enzima com uma especificidade de substrato idêntica parece estar também presente em *Pseudomonas aeruginosa* cultivada em meio contendo butirato como principal fonte de carbono [541].

1.5.c.3- Sintétase de araquidonil-CoA (EC 6.2.1.15).

A possibilidade da existência de uma enzima específica para ácidos gordos poli-insaturados como o araquidónico, o dihomog- γ -linolénico, o timnodónico e o cervónico é apoiada por estudos realizados nos anos oitenta em membranas isoladas de plaquetas humanas [502, 523, 524], de cérebro de boi [502, 524] e de cérebro de rato [472, 525]. As primeiras evidências a favor da existência de uma sintétase de araquidonil-CoA distinta da sintétase de acil-CoA de cadeia longa foram obtidas no início da década de oitenta: a actividade enzimática de formação de araquidonil-CoA, presente em membranas de plaquetas humanas, não era inibida por ácidos gordos que eram excelentes substratos da sintétase de acil-CoA de cadeia longa como o linoleico, o oleico e o esteárico [523]. Posteriormente, observou-se que a actividade de síntese de araquidonil-CoA exibida por membranas de plaquetas humanas e por preparações obtidas a partir de cérebro de boi ou de rato podia ser separada da de activação do oleato ou do palmitato por cromatografia em gel de hidroxapatita [472, 502] e que era insensível à acção de anticorpos desenvolvidos contra a sintétase de palmitil-CoA purificada [472]. É possível que, pelo menos em parte, esta actividade catalítica tenha correspondência com um gene (*ACS4*) que foi recentemente identificado no rato [509] e no homem [513, 514] e a que já fizemos referência no capítulo 1.5.b.3.

1.5.c.4- Sintétase de acil-CoA de cadeia muito longa (EC 6.2.1.?).

Desde meados da década de oitenta que estudos sobre a activação do ácido linhocérico, cerótico e nervónico em peroxissomas e microssomas de fígado [441, 461, 542-545] ou de cérebro de rato [440, 443] assim como em homogeneizados [542] ou peroxissomas de fibroblastos humanos [442, 489, 545, 546] apoiam a ideia da existência, em mamíferos, de uma enzima mais específica para ácidos gordos de cadeia muito longa. Esta enzima, frequentemente designada como sintétase de linhoceril-CoA, ao contrário da sintétase de palmitil-CoA, não seria inactivada por anticorpos desenvolvidos contra esta última enzima [440, 460, 546] e estaria ausente nas mitocôndrias [440, 442, 542].

Recentemente, esta enzima foi purificada a partir de peroxissomas de fígado de rato tendo sido obtida uma preparação onde estavam aparentemente ausentes outros proteídeos [547]. Na preparação purificada a razão entre as velocidades de activação do palmitato e do linhocerato era apenas 1,5 o que contrasta com o valor de mais de 300 para a referida razão no caso da sintétase de acil-CoA de cadeia longa [547]. Os K_m aparentes para o linhocerato, coenzima A e ATP eram, respectivamente, 10 μ M, 0,8 μ M e 1,2 mM e o pH óptimo cerca de 8,5 [547]. Esta purificação permitiu a identificação e o isolamento de um gene de rato (*VLACS*) correspondente a um proteídeo com 620 aminoácidos e 70692 Da [548]. Genes humano e de ratinho, respectivamente 82% e 93% idênticos ao gene de rato foram, posteriormente, também identificados [549].

1.5.c.5- Sintétase de fitanoil-CoA (6.2.1.24).

A actividade de síntese de fitanoil-CoA foi originalmente estudada por Muralidharan e Muralidharan em fracções de microssomas e mitocôndrias de fígado e outros tecidos de rato [550]. De acordo com estes estudos esta actividade de síntese não seria inibida nem pelo palmitato nem pelo estearato (10 μ M) e seria muito menos estável que a actividade de síntese de palmitil-CoA quando os microssomas eram pré-incubados a 45°C [550]. Em peroxissomas de fibroblastos humanos a existência de uma sintétase de fitanoil-CoA é apoiada por estudos comparativos com as actividades de síntese de palmitil-CoA e linhoceril-CoA em resposta ao tratamento daqueles organelos por agentes permeabilizadores, tripsina, “mercury-dextran” ou com anticorpos contra a sintétase de palmitil-CoA [460, 490].

1.5.c.6- Sintétase de dicarboxilil-CoA (EC 6.2.1.23).

Nos anos oitenta, foi identificada em microsossomas hepáticos de rato uma actividade catalítica do tipo da das sintétases de acil-CoA formadoras de AMP em relação aos ácidos dicarboxílicos com comprimentos de cadeia entre 5 e 16 átomos de carbono e que tinha como substrato preferencial o ácido dodecanedioico [551]. O único nucleotídeo que era substrato na síntese de acil-CoA era o ATP e o pH óptimo era 6,5 [551]. As evidências apresentadas a favor de que esta actividade catalítica não era simplesmente uma das actividades doutra sintétase de acil-CoA são muito escassas e baseiam-se, fundamentalmente, na ausência de referências a este tipo de actividade por acção de outras enzimas.

1.5.d- Mecanismos enzimicos das sintétases de acetil- e acil-CoA.

1.5.d.1- Mecanismo enzimico das sintétases de acetil-CoA e de acil-CoA de cadeia média.

Na década de cinquenta, Berg propôs para a sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* o mecanismo descrito pelo seguinte esquema [413, 430, 552]:



Neste mecanismo que poderia ser descrito, de acordo com a nomenclatura de Cleland [553], como Bi Uni Uni Bi Ping Pong afirma-se a existência de um complexo intermediário que consistiria na enzima ligada a um anidrido (o acetil-adenilato) capaz de reagir com o PPi (transferência do resíduo adenilato com consequente formação de ATP; reacção 25) ou com a coenzima A (transferência do resíduo acetil com consequente formação de acetil-CoA; reacção 26). As evidências experimentais que conferem credibilidade ao mecanismo proposto por Berg baseiam-se em estudos enzimicos de uso de acetil-adenilato como substrato para a síntese de acetil-CoA ou ATP [413, 552], de reacção de troca ATP-PPi [413, 552], de síntese de acetil-adenilato [431, 554], de inibição por análogos do acetil-adenilato [501], de cinética do estado estacionário [409] e de uso de acetato marcado no grupo carboxílico com ^{18}O [555].

Demonstrou-se que as sintétases de acetil-CoA [413, 552, 554] e de acil-CoA de cadeia média [538-540] podiam usar, como substratos, acil-adenilatos sintéticos de comprimento de cadeia adequado e catalisar a formação de ATP ou acil-CoA consoante o outro substrato adicionado ao meio de ensaio era o PPi (ver equação 25) ou a coenzima A (ver equação 26).

A reacção de troca ATP-PPi, de acordo com as observações de Berg [413, 552] e Young e Anderson [408], dependeria da presença de acetato (ver equação 25). Esta dependência mostraria a necessidade da ligação do acetato à enzima para que a rotura da ligação anidrido entre os fosfatos α e β do ATP possa ocorrer mas não foi sistematicamente observada [368, 556]. Como já referido (ver capítulo 1.5.a.2) no laboratório de Sillero e Sillero observou-se que quer a reacção de troca ATP-PPi quer a de síntese de p_4A e p_5A catalisadas pela sintétase de acetil-CoA não dependiam da adição de acetato ao meio de ensaio [368]. Foi, no entanto, também observado que esta adição podia aumentar aquelas actividades para o dobro e, com base nestas observações, propôs-se que na presença de acetato poderiam ocorrer paralelamente dois mecanismos enzimicos distintos correspondendo a cada um deles subunidades distintas da enzima; um dos mecanismos dependeria do acetato e o dador de adenilato ao P_3 ou ao P_4 seria o acetil-adenilato enquanto o outro seria independente do acetato

e o dador do adenilato seria um complexo E-AMP [368]. A possibilidade de a sintétase de acetil-CoA poder formar um complexo activado com o adenilato (E-AMP) a partir do ATP na ausência de acetato já tinha sido apontada no início dos anos cinquenta para explicar a ausência de dependência do acetato na reacção de troca ATP-PPi observada por Jones e Lipmann [556]. A mesma reacção de troca ATP-PPi catalisada por sintétase de acil-CoA de cadeia média de fígado de porco, embora estimulada pelo octanoato, também foi observada na ausência de adição de ácidos gordos ao meio de ensaio [538].

Na década de sessenta, Webster e Campagnari [431, 554, 557], usando altas concentrações de sintétases de acetil-CoA e acil-CoA de cadeia média purificadas a partir de mitocôndrias de coração e fígado de boi, puderam demonstrar a formação dos anidridos acetil-adenilato e butiril-adenilato. Para além das enzimas e dos ácidos carboxílicos adequados os meios de ensaio continham ATP, mas não coenzima A, que se demonstrou ser um potente inibidor [431, 554, 557]. Mais recentemente, foi observada a formação do anidrido valproil-adenilato a partir de ATP e valproato, usando como agente catalítico uma preparação enzimica extraída de mitocôndrias hepáticas de rato [558]. Na presença de coenzima A formava-se valproil-CoA e a síntese do referido anidrido diminuía marcadamente. O octanoato era substrato na síntese de octanoil-CoA e inibidor da síntese de valproil-CoA, tendo estes factos sido interpretados como evidências a favor de que a enzima envolvida nestas actividades era uma sintétase de acil-CoA de cadeia média.

Grayson e Westkaemper [501] estudaram o efeito de análogos do acetil-adenilato (alquil-adenilatos) na actividade da sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* concluindo que estes compostos eram potentes inibidores da sintétase de acetil-CoA, competitivos em relação ao ATP e não competitivos em relação ao acetato. No caso do etil-adenilato, o mais potente dos análogos testados, a constante de inibição seria 4 ordens de grandeza inferior ao K_m do ATP [501]. O baixo valor do K_i do etil-adenilato relativamente aos outros alquil-adenilatos testados e ao K_m do ATP apoia a ideia que estes compostos são análogos de um intermediário na reacção de síntese de acetil-CoA ou do estado de transição que precede a sua formação [501]. A dissimilaridade e os tipos de inibição em relação ao ATP e ao acetato constituem evidências a favor da ligação ordenada dos dois reagentes com o ATP precedendo obrigatoriamente o acetato [501].

Os resultados dos estudos de cinética do estado estacionário com a sintétase de acetil-CoA [406, 409] são compatíveis com o mecanismo proposto por Berg [413, 552], nomeadamente com a proposição de que PPi e a coenzima A competem entre si na ligação a um mesmo complexo intermediário. Também constituem uma forte evidência a favor deste mecanismo os estudos de Boyer e colaboradores [555] na mesma enzima: usando acetato marcado com ^{18}O no grupo carboxílico, ATP e coenzima A como substratos foi observada a formação de AMP contendo oxigénio marcado no grupo fosfato [555].

Do conjunto de dados apresentados poder-se-ia concluir que, pelo menos, no caso da sintétase de acetil-CoA e das sintétases de acil-CoA que aceitam como substratos ácidos gordos de cadeia média, o mecanismo incluiria (como passo necessário ou não necessário) a existência de um complexo enzimico em que o anidrido acil-adenilato está presente e ligado à enzima. As evidências experimentais, no caso destas enzimas, apoiam a ideia de que a presença de um ácido carboxílico adequado seria, pelo menos, favorecedora do processo de rotura do ATP e da consequente formação de PPi.

1.5.d.2- Mecanismo enzimico das sintétases de acil-CoA de cadeia longa.

É convicção generalizada que um mecanismo idêntico existe no caso das outras sintétases de acil-CoA [392, 511, 559-562]. No entanto, no caso da sintétase de acil-CoA de cadeia longa as evidências a favor do mecanismo proposto por Berg [413, 552] são, no

mínimo, menos claras e não temos conhecimento de estudos visando esclarecer o mecanismo enzimático no caso das outras sínteses de acil-CoA abordadas no capítulo 1.5.c.

Os únicos testemunhos da observação de síntese de acil-adenilatos por acção de sínteses de acil-CoA que pudemos encontrar na literatura científica foram os que já fizemos referência acima (ver capítulo 1.5.d.1) [431, 554, 557, 558]. Bar-Tana e colaboradores [434], a partir de estudos sobre a síntese de palmitil-CoA purificada a partir de microsomas de rato, concluíram pela existência de um complexo enzimático em que está presente adenilato e palmitato mas não o anidrido palmitil-adenilato. Parsons e colaboradores [455, 563], em estudos de cromatografia de filtração em gel com a síntese de palmitil-CoA purificada a partir de mitocôndrias de rato, concluíram que o complexo enzimático formado na presença de palmitato e ATP seria simplesmente o adenilato ligado à enzima (E-AMP). Na síntese do complexo E-AMP o efeito do palmitato era nulo para concentrações inferiores a 1 mM e, para concentrações superiores, ocorria inibição [455]. A formação do complexo E-AMP era também inibida pelo PPi, pelo AMP e por concentrações de ordem de grandeza μM de coenzima A [455].

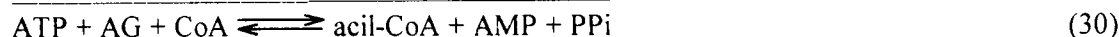
De forma análoga ao observado com preparações purificadas de síntese de acetil-CoA e de síntese acil-CoA de cadeia média [413, 538-540, 552, 554], microsomas hepáticos isolados de cobaio [564] ou de rato [432, 435] podiam usar palmitil-adenilato sintetizado quimicamente como substrato e catalisar a transferência do resíduo palmitato para a coenzima A ou do resíduo adenilato para o PPi. A situação era mais complexa quando se utilizou como agente catalítico síntese de palmitil-CoA purificada a partir de microsomas de rato [432, 435, 438]. A preparação purificada, embora capaz de catalisar a transferência dos resíduos butiril (do butiril-adenilato) ou octanoil (do octanoil-adenilato) para a coenzima A era, relativamente ao palmitil-adenilato, praticamente destituída das actividades acima referidas [432, 435, 438].

Baseados em estudos da variação da actividade enzimática de síntese de palmitil-CoA em função das concentrações dos substratos ATP, coenzima A e palmitato, Bar-Tana e colaboradores [433], embora duvidando sempre da existência do anidrido palmitil-adenilato ligado à enzima como passo obrigatório do mecanismo reactivo [435], aceitaram como possível o mecanismo proposto por Berg [413], nomeadamente a ideia de que a libertação do PPi ocorre depois da ligação sequencial do ATP e do palmitato à enzima e antes da ligação da coenzima A. Esta aceitação não é, aparentemente, facilmente conciliável com a observação dos mesmos investigadores de que, na reacção de troca ATP-PPi, o palmitato não era activador e que, para concentrações relativamente elevadas, algum grau de inibição podia mesmo ser observado [432].

Os estudos de Grayson e Westkaemper [501] sobre a acção inibidora de distintos alquil-adenilatos na actividade da síntese de acil-CoA de *Pseudomonas aeruginosa* são menos concludentes que os realizados com a síntese de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae*. A síntese de acil-CoA de *Pseudomonas aeruginosa*, como já referido no capítulo 1.5.b.2, catalisa a activação de ácidos gordos com 6 a 18 carbonos [498]. Em concordância com esta especificidade e com a possibilidade de acil-adenilatos de comprimento de cadeia adequada serem intermediários na reacção, observou-se que ao contrário do hexil-adenilato (inibidor competitivo quer em relação ao ATP quer ao oleato) os alquil-adenilatos com 2, 3 ou 4 átomos de carbono no resíduo alquilo não eram inibidores da enzima [501]. Contudo, ao contrário do observado com o etil-adenilato, no caso da síntese de acetil-CoA (ver capítulo 1.5.d.1), os valores de K_i do hexil-adenilato, determinados relativamente ao ATP e ao oleato, eram apenas ligeiramente inferiores aos dos K_m destes substratos [501].

Com base nas suas observações, Parsons e colaboradores [455, 563], recuperando uma hipótese formulada por Jones e Lipmann para a síntese de acetil-CoA no início dos anos

cinquenta [556], propuseram para a síntese de palmitil-CoA um mecanismo que pode ser esquematizado como se segue:



Neste mecanismo, que de acordo com a nomenclatura de Cleland [553] poderia ser denominado Hexa-Uni Ping Pong, propõe-se a existência de dois complexos intermediários em que a enzima estaria ligada de forma covalente ao fosfato do adenilato (E-AMP) ou ao grupo tiol da coenzima A (E-SCoA). Embora explique a ausência de dependência do palmitato na reacção de troca ATP-Pi [432] e a observação de adenilato mas não acil-adenilato ligado à enzima [434, 455], está em desacordo com as observações de Bar-Tana e colaboradores [433] e de Grayson e Westkaemper [501] que indicam ligação do ATP e do ácido gordo à enzima antes da libertação do Pi.

Em semelhança com as observações de Boyer e colaboradores [555] para o caso da síntese de acetil-CoA (ver capítulo 1.5.d.1) também o uso de palmitato marcado com ^{18}O no grupo carboxílico dava origem à formação de AMP contendo oxigénio marcado no grupo fosfato [433]. Este dado experimental e a observação recente de que as sínteses de acil-CoA de cadeia longa partilham com outras enzimas da mesma superfamília os motivos estruturais que se crê estarem envolvidos na síntese e na ligação de acil-adenilatos (ver capítulo 1.7) constituem argumentos a favor do mecanismo proposto por Berg [413, 552].

1.6 - A luciférase de *Photinus pyralis* e de outros insectos coleópteros (EC 1.13.12.7).

1.6.a- A reacção bioluminescente catalisada por luciférases de insectos coleópteros. A luciférase de *Photinus pyralis*.

1.6.a.1- Aspectos gerais.

Denominam-se luciférases as enzimas que catalisam reacções em que se sintetiza um produto que é gerado no estado excitado e que, no processo de relaxamento, emite fotões de comprimento de onda da luz visível [565-569]. Todas as luciférases conhecidas são oxiredúctases e um dos reagentes, o oxidante, é sempre o oxigénio molecular [565, 567-569]. Independentemente da sua estrutura os substratos que são oxidados no processo reactivo denominam-se luciferinas e os produtos responsáveis pela emissão de fotões, oxiluciferinas [567-569].

No caso das luciférases de insectos coleópteros (*Coleoptera*) capazes de emitir luz, como pirilampos (família *Lampyridae*) de vários géneros e espécies e insectos das famílias *Elateridae* ("click beetles") ou *Phengodidae*, a luciferina parece ser sempre a mesma: o ácido D-2-(6'-hidroxi-2'-benzotiazolil)-4-carboxitiazol (ver Figura II) [567, 570-577]. Uma grande percentagem dos estudos de bioquímica básica sobre estas luciférases foram realizados por McElroy e DeLuca usando a luciférase de *Photinus pyralis* (pirilampo norte americano) e aspectos deste tema foram objecto de revisões por estes autores e por outros que, em muitos casos, com eles colaboraram em algum momento [565-568, 578-593].

Admite-se que o mecanismo de reacção e a oxiluciferina sejam idênticos para todas as luciférases de insectos coleópteros estudadas já que a luciferina é comum e as estruturas

conhecidas das diferentes luciféras são semelhantes [567, 574-577, 587]. Contudo, a cor da luz emitida, embora sempre num leque entre o verde e o laranja, varia de espécie para espécie [574, 577, 594], admitindo-se que a causa dessa variabilidade seja a existência de distintas luciféras [587, 595]. A diferentes luciféras corresponderão diferentes micro-ambientes em que o produto emissor é gerado determinando diferentes níveis energéticos do estado excitado desse emissor [587, 595, 596].

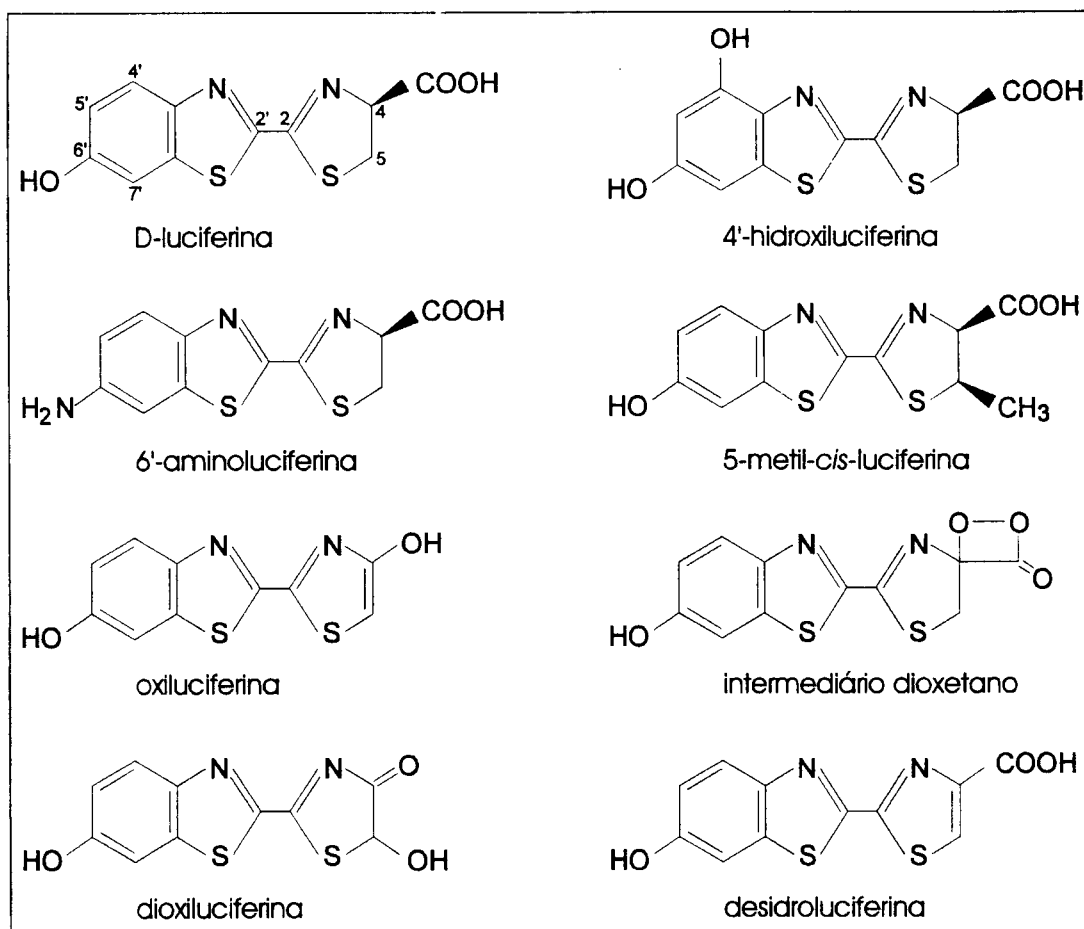
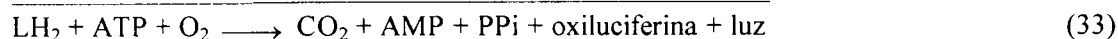
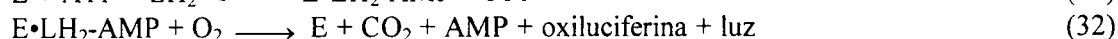


Figura II - Fórmulas desenvolvidas da D-luciferina, 4'-hidroxiluciferina, 6'-aminoluciferina, 5-metil-cis-luciferina, oxiluciferina, intermediário contendo anel dioxetano, dioxiluciferina e desidroluciferina.

As fórmulas apresentadas foram copiadas das referências 573, 612, 613, 624 e 627.

1.6.a.2- A reacção bioluminescente. Reagentes, produtos, mecanismo e a natureza do emissor.

Na reacção bioluminescente catalisada pelas luciféras de insectos coleópteros ocorre a produção de luz com consumo de ATP, luciferina e oxigénio e concomitante libertação de CO₂, AMP, PPi e oxiluciferina em proporções equimolares [565, 581, 597-603]. A reacção pode ser descrita como ocorrendo em duas fases, a primeira independente e a segunda dependente do oxigénio [599]:



O primeiro passo do processo catalítico seria semelhante ao que se admite existir nos casos das sínteses de aminoacil-tRNA, acetil-CoA e acil-CoA (ver capítulos 1.4.c.1 e 1.5.d.1); no caso da luciferase ocorreria a transferência do adenilato do ATP para a luciferina com a formação dum anidrido, o luciferil-adenilato, e concomitante libertação de PPi (ver equação 31) [600, 604, 605]. No segundo passo ocorreria a oxidação do resíduo luciferina pelo oxigénio, rotura da ligação anidrido, descarboxilação e produção de luz (ver equação 32) [601]. O rendimento quântico, definido como o número de fótons emitidos por molécula de luciferina (ou ATP) consumida, foi estimado em cerca de 0,9 diminuindo marcadamente quando a reacção decorria a pH inferior a 7 [606].

Na reacção de produção de luz a enzima é muito específica para o ATP embora, com uma eficácia muito mais baixa, o dATP, o ATP γ S, o Ap₅A e o p₄A possam substituir aquele nucleotídeo [600, 607-610]. No caso da luciferina a enzima pode aceitar como substratos alternativos a 4'-hidroxiluciferina [611], a 6'-aminoluciferina [611, 612] e os derivados 5-metil *cis* e *trans* da luciferina (ver Figura II) [613].

A formação do anidrido luciferil-adenilato, mas não a sua oxidação, depende da presença de catiões bivalentes como o Mg²⁺, o Mn²⁺ ou o Co²⁺ [598, 604, 614]. O luciferil-adenilato quimicamente sintetizado adicionado directamente ao meio de ensaio leva à produção de luz e o processo não depende da presença de catiões [604]. A reacção de troca ATP-PPi dependente da presença de luciferina e ocorre quer na ausência quer na presença de oxigénio [600]. O isómero L da luciferina também pode reagir com o ATP formando-se, PPi e, presumivelmente, L-luciferil-adenilato [571]. Embora com uma velocidade de produção de luz mais baixa que o isómero D, quer a L-luciferina quer o respectivo adenilato podem ser substratos da enzima tendo-se admitido que o L-luciferil-adenilato, quer em solução quer ligado à enzima, sofre racemização [615, 616]. O luciferil-adenilato cuja formação durante a reacção catalisada pela luciferase de *Photinus pyralis* se presumiu, com base em evidências indirectas, durante as últimas quatro décadas foi, recentemente, isolado do meio de ensaio enzimico no laboratório de Sillero e Sillero [605].

Estudos do efeito da variação da concentração de ATP, luciferina e luciferil-adenilato na produção de luz levaram à determinação de valores de K_m aparentes para estes substratos de 20 a 600 μ M, 1 a 125 μ M e 2 μ M, respectivamente [598, 604, 605, 614, 616-623]; a influência de múltiplos factores na actividade bioluminescente da luciferase e as características peculiares desta actividade catalítica explicam a variabilidade nos resultados. Por exemplo, a impossibilidade em definir um estado estacionário para a velocidade de produção de luz (ver capítulo 1.6.a.3) levou à determinação, num mesmo estudo, de dois valores para o K_m do ATP conforme se considerou como variável dependente a velocidade de produção de luz mais elevada que podia ser medida ou a que podia ser apreciada ao fim de um minuto de reacção; esses valores foram respectivamente 110 e 20 μ M [618].

Admite-se hoje que o produto emissor (a oxiluciferina), no caso de todas as luciferases de insectos coleópteros, seja o 2-(6'-hidroxi-2'-benzotiazolil)-4-hidroxitiazol, uma substância que, ao contrário da luciferina [572, 573], não contém nenhum grupo carboxílico (ver Figura II) [601, 624-627].

As primeiras referências à estrutura do composto que hoje conhecemos como a oxiluciferina dos insectos coleópteros aparecem em artigos publicados na segunda metade da década de sessenta na sequência de estudos de quimioluminescência, ou seja, de reacções não enzimicas produtoras de luz [624, 625]. Nesses estudos foram usados como reagentes derivados da luciferina que não são substratos da luciferase, concretamente um anidrido (adenilato) e um éster (fenol) contendo o resíduo 5,5-dimetilluciferina, dissolvidos em dimetilsulfóxido e a reacção quimioluminescente era iniciada pela adição de uma base [624, 625]. O produto fluorescente formado era o derivado dimetilado (no carbono 5) da

oxiluciferina e o seu espectro de emissão era, em condições de análise semelhantes, idêntico ao da luz emitida na reacção quimioluminescente [624, 625]. Nos artigos onde se descrevem estes fenómenos também se sugeriu que, quer na reacção quimioluminescente quer na catalisada pela luciférase, se formaria um intermediário contendo um anel dioxetano que, por descarboxilação, daria origem ao emissor (ver Figura II) [624, 625].

Ainda nos anos sessenta, a produção de CO₂ radioactivo durante a reacção bioluminescente catalisada pela luciférase quando se adicionava luciferina marcada no carbono do grupo carboxílico ao meio de ensaio foi verificada experimentalmente o que, considerando o conhecimento prévio da estrutura dos reagentes e dos outros produtos, confirmava a estrutura proposta para o emissor [601]. No entanto, quer no meio de ensaio onde havia ocorrido a reacção bioluminescente quer num outro onde a síntese química de oxiluciferina foi tentada era possível observar, por estudos de cromatografia clássica, produtos fracamente fluorescentes que, presumivelmente, eram compostos formados a partir do emissor: a oxiluciferina era, aparentemente, demasiado instável para poder ser isolada nestas condições experimentais [601]. A incorporação de O₂ radioactivo, adicionado ao ensaio, no CO₂ formado foi, mais tarde, também observado e este fenómeno foi interpretado como evidência a favor da existência do intermediário dioxetano (ver Figura II) no processo de formação da oxiluciferina [628, 629].

Nos finais dos anos sessenta e início dos anos setenta, a equipa de Goto [602, 603, 626, 627] obteve as primeiras evidências directas acerca da estrutura da oxiluciferina. Estes investigadores puderam obter a sua síntese química a partir da condensação de 2-ciano-6-hidroxibenzotiazol com tioglicolato de etilo a baixa temperatura e na ausência de oxigénio: a oxiluciferina foi obtida num grau de pureza suficiente para que os estudos de espectrometria de massa, de espectrofotometria de infravermelhos e de ressonância magnética nuclear fossem empreendidos e confirmassem a estrutura postulada [626, 627]. Na presença de oxigénio e à temperatura ambiente o composto formado era um derivado da oxiluciferina oxidado no carbono 5: a dioxiluciferina (ver Figura II) [626, 627]. Quando a oxiluciferina sintetizada quimicamente foi, na ausência de oxigénio, dissolvida em dimetilsulfóxido alcalinizado foi possível obter um espectro de fluorescência (emissão) que era idêntico ao da luz emitida na reacção de quimioluminescência do luciferil-adenilato em condições semelhantes [626, 627].

Um complexo “luciférase de *Photinus pyralis*-produto” foi isolado por Gates e DeLuca [630] por cromatografia de filtração em gel em meios de ensaio onde havia ocorrido a reacção bioluminescente. O complexo tinha um máximo de absorvância para a luz de 385 nm e o aumento da absorvância do meio de ensaio para este comprimento de onda durante a reacção bioluminescente foi interpretado como evidência a favor de que o complexo purificado continha oxiluciferina [630].

Num trabalho publicado já nesta década, White e Roswell [613], face à impossibilidade de obter oxiluciferina em estado suficientemente puro, escolheram estudar um seu análogo algo mais estável, a 5-metiloxiluciferina, assim como a reacção bioluminescente que lhe dá origem usando como substratos ATP e os isómeros *cis* e *trans* da 5-metilluciferina (ver Figura II). O espectro de emissão (fluorescência) da 5-metiloxiluciferina tinha, quer na ausência quer na presença de ATP e luciférase, um máximo a 540 nm de comprimento de onda enquanto que a luz emitida na reacção bioluminescente tinha um máximo a 565 nm [613]. Na opinião dos autores do estudo a explicação para esta discrepância poderia estar na possível existência de diferentes modos de ligação entre a 5-metiloxiluciferina e a luciférase no momento da sua formação e quando captada do meio [613].

1.6.a.3- A cinética da reacção bioluminescente. Inibição da produção de luz, síntese de desidroluciferina e efeito da coenzima A e de outros compostos.

No caso da luciférase de *Photinus pyralis*, a mais estudada destas enzimas, a luz emitida tem, a pH 7-8, um máximo a 562 nm de comprimento de onda estendendo-se num espectro entre os 500 e os 630 nm [565, 606]. O valor da energia libertada no processo permite, por si só, deduzir que a reacção tem tendência a ocorrer até ao esgotamento do substrato limitante [565, 606]. Apesar desta tendência, definida em termos termodinâmicos, a reacção catalisada pela luciférase de *Photinus pyralis* tem, em geral, uma evolução no tempo caracterizada pela rápida produção de luz quando se misturam os reagentes com a enzima seguida de diminuição da velocidade da reacção mesmo quando existem substratos em excesso no meio reactivo [581, 599, 600, 604, 618].

A forma da curva velocidade de produção de luz *versus* tempo de reacção pode variar. Em certas condições o perfil daquele gráfico é de tipo clarão: a velocidade de produção de luz, elevada nos primeiros segundos de reacção, desce em menos de um minuto para valores que podem ser de 10% da intensidade máxima. Noutras condições a queda da velocidade de produção de luz ao longo do ensaio é mais lenta e apenas apreciável quando a observação se prolonga por vários minutos [618, 631-635]. Vários factores incluindo a concentração de substratos e enzima, a força iónica, o pH, o tipo de amortecedor, a presença ou ausência de detergentes ou determinados iões inorgânicos assim como de diversos compostos orgânicos podem influenciar de forma isolada ou combinada o comportamento do sistema de forma que, entre os dois perfis tipo acima referidos, todos os tipos intermédios podem ser observados [617-621, 631-642].

Entre os factores que tendem a produzir um perfil em que a descida da velocidade de produção de luz é menos abrupta incluem-se, por exemplo, baixas concentrações de ATP (de ordem de grandeza μM ou inferior) [618, 619, 631, 632, 634, 635], substituição do ATP por dATP [618], baixas concentrações de luciférase [619] ou presença de inibidores como por exemplo o arsenato, o sulfato, o P_i ou o AMP [618, 631, 642]. A formação, durante o processo catalítico, de um produto inibidor (ou de um intermediário inactivo [599]) que permanece ligado às moléculas de enzima após o primeiro ciclo catalítico e que só lentamente se vai desligando permitindo a reutilização de uma mesma molécula de enzima é genericamente aceite desde os anos cinquenta [599, 600, 643] e tem sido repetidamente reafirmada como a causa da diminuição da velocidade da produção de luz [566, 587, 618-620, 631-634, 636, 640, 641]. Contudo, a natureza do produto (ou intermediário) inibidor e a própria natureza do processo de inibição da produção de luz é, ainda hoje, controverso [617, 618, Artigo III]. Num estudo de Lambert e Idahl [617], recentemente publicado, admite-se a possibilidade de, no processo de inibição, estar envolvida a formação de um complexo inactivo contendo duas moléculas de luciferina ligadas à enzima.

O uso de altas concentrações de ATP ($10 \mu\text{M}$ ou superior) gera um perfil tipo clarão [618, 619, 631, 632, 634, 635]. No entanto, nestas condições experimentais, quando a coenzima A está presente no meio de ensaio desde o início da reacção a queda na velocidade de produção de luz é muito menos abrupta; quando adicionada após esta queda provoca um aumento da velocidade que pode manter-se a níveis elevados durante vários minutos [632-634, 637, 643, 644]. A descrição de efeitos estimuladores por concentrações relativamente elevadas de coenzima A na presença de baixas concentrações de ATP [640] devem ser encaradas com alguma prudência já que, frequentemente, as preparações comerciais daquela substância estão contaminadas com ATP [634, 645, Artigo III]. Efeitos estimuladores ou estabilizadores (dependendo da fase em que eram adicionados ao meio de ensaio), qualitativamente semelhantes aos da coenzima A, foram também observados por vários autores em relação ao P_3 [632, 646], ao P_4 [632], ao PPi [604, 615, 632, 641, 646], assim como em relação a

variados mononucleosídeos tri e difosfatados, quer púricos quer pirimídicos, quimicamente modificados ou não modificados na base ou no resíduo ribose [610, 632, 634-636, 638].

Em estudos da equipa de McElroy [600, 604, 643] da segunda metade da década de cinquenta foi possível separar na mistura reactiva um produto fluorescente, com espectros de absorção e emissão característicos, que se formava na presença de O_2 , ATP, luciferina, luciférase e Mg^{2+} . Esse produto foi na época designado como oxiluciferina por se admitir que poderia ser, ligado ou não com o adenilato, o responsável pela emissão luminosa [600]. A sua estrutura, que se revelou muito semelhante à da luciferina, foi esclarecida no início dos anos sessenta; ao contrário desta tem uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 do anel tiazole onde se liga o grupo carboxílico tendo passado a denominar-se desidroluciferina (ver Figura II) [572, 573]. Os estudos da equipa de McElroy [604, 647] mostraram que, na presença de desidroluciferina sintetizada quimicamente, ATP e Mg^{2+} a luciférase catalisava a transferência de adenilato do ATP para a desidroluciferina com formação de desidroluciferil-adenilato e PPi. A desidroluciferina, ou o respectivo adenilato, não eram oxidados nem originavam produção de luz e ambos os compostos eram, com potências desiguais, inibidores da reacção bioluminescente [604, 643]. O desidroluciferil-adenilato podia ligar-se fortemente à enzima para formar com esta um complexo com uma constante de dissociação muito baixa (de ordem de grandeza nM) e, em concreto, muito mais baixa que a constante de dissociação do complexo E•luciferil-adenilato (de ordem de grandeza μM) [604, 647].

Talvez inspirados na semelhança entre os mecanismos de reacção da luciférase e da síntese de acetil-CoA (ver capítulos 1.5.d.1 e 1.6.a.2) [413, 552], nomeadamente a formação de um intermediário acil-adenilato, McElroy e a sua equipa estudaram na mesma época o efeito da coenzima A na produção de luz e na reacção de transferência de adenilato para a desidroluciferina [643]. De modo semelhante à síntese de acetil-CoA e outras sínteses de acil-CoA a luciférase podia catalisar, na presença de ATP, desidroluciferina e coenzima A, a formação de desidroluciferil-CoA [643]. A existência de um nexo de causalidade entre este fenómeno e o efeito estimulante da coenzima A na reacção bioluminescente pareceu evidente aos autores do estudo: a coenzima A reagia com o inibidor da produção de luz formado no processo reactivo eliminando-o do meio de ensaio por transformação num outro que não era inibidor [643]. O efeito activador do PPi e o efeito inibidor da PPase na produção de luz também foi explicado de modo semelhante; o PPi reagindo com o anidrido desidroluciferil-adenilato e formando desidroluciferina (e ATP) diminuía no meio de ensaio a concentração de um composto com grande afinidade para a enzima (o anidrido) substituindo-o por outro com mais baixa afinidade (a desidroluciferina) [600, 604]. Embora o PPi pudesse reagir com o luciferil-adenilato inibindo desta forma a reacção de produção de luz, observava-se activação quando aquele composto era adicionado na fase em que a velocidade da reacção bioluminescente diminuía ou quando atingia valores basais [604]. A descida na velocidade de produção de luz era particularmente abrupta quando o único substrato adicionado ao meio de ensaio era o luciferil-adenilato ou quando, contendo luciferina e ATP, era suplementado com PPase [604]. Estes factos foram interpretados como sendo uma consequência da ausência de formação de PPi no primeiro caso e da sua rápida destruição no segundo [604].

A possibilidade de a desidroluciferina (ou o desidroluciferil-adenilato) ser o produto emissor foi rejeitada com base em estudos de espectrofluorimetria e espectrofotometria realizados pela equipa de McElroy no início dos anos sessenta [565, 571]. Enquanto a luz emitida na reacção bioluminescente tem um máximo a 562 nm de comprimento de onda os máximos para os espectros de emissão da desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato eram, em meio aquoso, de 544 nm e 460 nm, respectivamente [565]. Também se observou que, durante o processo de produção de luz, ocorria no meio de ensaio uma diminuição da absorvância para a luz de 327 nm (o máximo para a luciferina) que era substituída por um

espectro com um máximo de absorvância a 383 nm e que os máximos de absorvância para a desidroluciferina e o desidroluciferil-adenilato eram ambos próximos de 350 nm [571]. Rejeitada a hipótese de um destes compostos ser o emissor, o interesse dos investigadores passou a dirigir-se noutras direcções nomeadamente a pesquisa de outros produtos da reacção que pudessem explicar a emissão de luz [601, 602, 624-627]. A desidroluciferina foi sendo objecto de múltiplas referências na literatura científica produzida nas últimas quatro décadas sendo sistematicamente apontada como um análogo da luciferina que podia reagir com o ATP para formar desidroluciferil-adenilato [566, 578, 582, 587, 607, 618, 622, 623, 639, 648-650], mas a reacção enzimática de síntese de desidroluciferina a partir de luciferina e ATP, possivelmente encarada como um aspecto secundário no contexto do mecanismo de produção de luz, foi progressivamente ignorada. Na extensa pesquisa bibliográfica que realizámos, para além dos artigos onde essa síntese é descrita [600, 643] encontrámos referências explícitas ao fenómeno em artigos publicados nos finais dos anos cinquenta e no início dos anos sessenta [565, 571, 580, 581, 604, 648]. Com data posterior a 1964 existem artigos onde se fazem alusões discretas à síntese enzimática de desidroluciferina [578, 583, 587, 601, 627, 651] mas apenas encontrámos um em que, citando McElroy, essa síntese é explícita e claramente referida [620]. A reacção de síntese de desidroluciferina catalisada pela luciférase foi ignorada em artigos de revisão [566-568, 582, 584-586, 588, 591, 593], em artigos em que a desidroluciferina era um dos objectos do estudo [366, 573, 612, 615, 650, 652] ou mesmo quando o objecto, ou um dos objectos, era o fenómeno de inibição da produção de luz [617-619, 622, 631, 633, 635, 636, 640, 641, 644, 649].

Numa recente e extensa revisão sobre as luciférases de insectos coleópteros publicada por Wood [587] o autor faz referência a um dos trabalhos da equipa de McElroy onde se descreve a síntese de desidroluciferina [643] nos seguintes termos: "...dehydroluciferin was then mistakenly thought to be the enzyme product".

A partir do momento em que a síntese de desidroluciferina passou a ser encarada como um aspecto de menor importância na reacção catalisada pela luciférase, a aceitação de que o verdadeiro emissor era o composto responsável pela queda na velocidade de produção de luz passou a ser aceite como um dado adquirido [581]; o uso ambíguo da expressão "o produto", frequentemente utilizada para designar, neste contexto, a oxiluciferina [566, 618-620, 630, 631, 634, 636, 639, 649, 653] é, provavelmente, uma consequência da quase ausência de evidências experimentais relativamente à acção inibidora do emissor. Goto e colaboradores [654], numa breve nota num artigo publicado em 1973, descreveram e quantificaram ($K_i = 0,23 \mu\text{M}$) a acção inibidora da oxiluciferina sintetizada quimicamente na produção de luz mas, dada a instabilidade deste composto em meio aeróbio [596, 601, 603, 613, 627], não sabemos em que medida se pode valorizar este resultado. Em estudos a que já fizemos referência (ver capítulo 1.6.a.2), observou-se que o complexo "luciférase de *Photinus pyralis*-produto" tinha uma capacidade para produzir luz que era semelhante à da enzima não complexada [630]. Um dos factores que, possivelmente, contribuiu para a aceitação generalizada de que a oxiluciferina era o responsável pela inibição da produção de luz foi a confusão provocada pelo uso da palavra oxiluciferina para designar a desidroluciferina nos primeiros estudos em que se comprovou a sua síntese enzimática e o seu efeito inibidor [600, 604, 643]; em algumas publicações são citados esses estudos quando se faz alusão à acção inibidora da oxiluciferina [633, 634, 645]. A possível existência na luciférase de dois sítios catalíticos distintos, ambos capazes de ligar o ATP e a luciferina e de produzir oxiluciferina, mas com diferentes afinidades para o ATP e para a oxiluciferina foi também avançada [618]. Nesta hipótese, o sítio catalítico com menor afinidade para o ATP ($K_m = 110 \mu\text{M}$) seria o responsável pelo clarão e, ao contrário do de maior afinidade ($K_m = 20 \mu\text{M}$), teria uma forte afinidade para a oxiluciferina produzida sendo precocemente inibido [618].

O AMP ou o CO₂, sendo também produtos da reacção bioluminescente, nunca foram encarados como os inibidores responsáveis pela rápida diminuição da velocidade de produção de luz. O AMP, quando adicionado directamente ao meio de ensaio, tem uma fraca acção inibidora [607, 632, 645, 655]; de acordo com diferentes estudos o AMP seria inibidor competitivo relativamente ao ATP com um K_i estimado em 240 μ M [607] ou um inibidor não competitivo provocando 80% de inibição na concentração de 1 mM [632]. Apesar de estar descrito que o CO₂ se liga à luciférase [629] não encontramos estudos sobre o seu efeito na reacção bioluminescente.

Para interpretar o efeito de detergentes, amortecedores e diversos sais inorgânicos na actividade bioluminescente da enzima e na forma como esta variava ao longo do tempo de reacção foram invocadas modificações mal definidas que diferentes condições ambientais podem ter na conformação da luciférase e que se reflectiriam na sua capacidade para catalisar a síntese de oxiluciferina e na velocidade com que esta poderia libertar-se da enzima [621, 622, 632, 639, 640]. Nos estudos, realizados já nesta década ou na década de oitenta, sobre o efeito estabilizador ou activador na velocidade de produção de luz da coenzima A, de diversos nucleotídeos, de polifosfatos ou do PPI ou foram invocadas explicações do mesmo tipo [610, 632-634, 636, 640, 641] ou nenhuma hipótese interpretativa foi avançada [615, 637, 644]. A hipótese de, nas modificações conformacionais putativas, estarem envolvidos centros alostéricos que ligariam os estabilizadores/activadores acima referidos foi também formulada [633].

1.6.a.4- Estudos de biologia molecular e estruturais das luciférases de insectos coleópteros.

A identificação do gene codificador da luciférase de *Photinus pyralis* (pirilampo da América do Norte) teve lugar nos anos oitenta [656, 657]. Outros genes, mais recentemente identificados, foram os correspondentes às luciférases dos pirilampos japoneses *Luciola cruciata* [658], *Luciola lateralis* [659], *Pyrocoelia miyako* e *Hotaria parvula* [660] assim como os da *Luciola mingrelica* (pirilampo do leste europeu) [661], da *Lampyrus noctiluca* (pirilampo britânico) [662], da *Photuris pennsylvanica* (outro pirilampo da América do Norte) [663] e de quatro isoenzimas do *Pyrophorus plagiophthalmus* (“click beetle”) [595]. A semelhança entre as estruturas primárias destas luciférases é elevada [595, 658-663]. Dentro da família dos pirilampos (*Lampyridae*) as percentagens de identidade situam-se entre 67% e 98% [658-663], entre as quatro isoenzimas do *Pyrophorus plagiophthalmus* são superiores a 95% e entre estas e as dos pirilampos são cerca de 50% [595].

Como será discutido no capítulo 1.7 a semelhança estrutural e funcional das luciférases de insectos coleópteros com outras enzimas que, comprovada ou presumivelmente, são capazes de catalisar a formação de acil-adenilatos é de assinalar. Estas enzimas agrupam-se sob o nome de enzimas da “superfamília da luciférase”, designação que resulta do facto de a sequência primária da luciférase de *Photinus pyralis* ter sido a primeira a ser conhecida [657] e de a superfamília se ter formado pelo reconhecimento de que as novas estruturas que iam sendo desvendadas tinham semelhanças com a da luciférase. Por comparação das estruturas primárias das enzimas dessa superfamília foram identificados três motivos sequenciais que se crê estarem envolvidos na formação e na ligação do luciferil- e do desidroluciferil-adenilato à enzima (ver capítulo 1.7).

A equipa de Brick estudou recentemente, por cristalografia de raios X, a luciférase de *Photinus pyralis* tendo concluído que podia ser descrita como sendo formada por dois domínios separados por uma fenda [664]. Os aminoácidos constituintes dos motivos sequenciais que se crê participarem na formação do centro activo estavam situados em lados opostos da fenda e na ponte que une os dois domínios [664]. A distância entre os dois domínios

era demasiado elevada para se poder aceitar como possível que pudessem, simultaneamente, interagir com os substratos tendo-se admitido que, após a ligação dos substratos, a luciférase deveria sofrer uma alteração conformacional envolvendo a aproximação entre os dois domínios e o estreitamento da fenda [664]. Esta hipótese ganhou uma maior credibilidade após o estudo, da mesma equipa e também por cristalografia de raios X, da estrutura do complexo enzima-substratos, de uma outra enzima da mesma superfamília: a sintétase 1 de gramicidina S de *Bacillus brevis* [665]. Os dois domínios desta enzima, quando complexada com os substratos, estavam muito próximos entre si e os substratos estavam encaixados na fenda formada pelos dois domínios [665].

A luciférase nativa de *Photinus pyralis* foi purificada e cristalizada ainda nos anos cinquenta tendo a sua massa molecular sido estimada por centrifugação analítica em 100 kDa [614]. Noutros estudos posteriores em que se usou filtração em gel [630] e SDS-PAGE [666] foram determinadas massas moleculares de 47 kDa e 66 kDa, respectivamente. A identificação do gene veio demonstrar que a sua massa molecular é de 60746 Da e que é composta por 550 aminoácidos [657]. Não é de excluir a possibilidade de que, em concentrações elevadas, a enzima possa estar agregada formando dímeros [587].

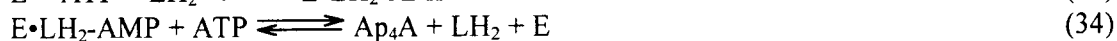
1.6.a.5- Aspectos de aplicação da reacção bioluminescente da luciférase no doseamento do ATP e em estudos de regulação da expressão de genes.

A grande especificidade da luciférase de *Photinus pyralis* relativamente ao substrato ATP foi reconhecida nos finais dos anos quarenta [597, 598]. Os primeiros estudos demonstrando o interesse prático do sistema luciférase-luciferina no doseamento do ATP são do início dos anos cinquenta [642]. Em condições de ensaio adequadas a velocidade de produção de luz nos primeiros segundos ou minutos de reacção ou a quantidade total de luz produzida durante um determinado período de tempo é proporcional à concentração de ATP no meio de ensaio; os métodos de análise baseados neste princípio são muito sensíveis e o seu uso está hoje generalizado [579, 586, 590, 591, 619, 620, 642, 667-670]. A variabilidade da sensibilidade dos diferentes luminómetros e da actividade das diferentes preparações enzimáticas disponíveis no mercado assim como a sensibilidade do sistema a, aparentemente, pequenas modificações nas condições de ensaio e a interferência de múltiplas substâncias explica que sejam indispensáveis estudos de calibragem prévia à sua utilização [590, 619, 620, 631, 655, 667] e que o uso de padrões internos tenha sido recomendado [631, 653, 667].

O gene da luciférase de *Photinus pyralis* tem sido amplamente usado como gene repórter no estudo de mecanismos de regulação da expressão de genes [531, 589, 592, 593, 637, 644, 671]. A inexistência de enzimas com actividade bioluminescente na maioria dos seres vivos e a sensibilidade dos métodos de detecção de luz fez com que a criação de genes recombinantes, contendo não só os promotores a estudar mas também o gene da luciférase, se tornasse num método muito popular de investigação [589, 592, 593, 637, 644, 657, 671]. Pelo menos num trabalho experimental o gene da luciférase de *Photinus pyralis* foi usado para o estudo da regulação da síntese de uma sintétase de acil-CoA, concretamente, o estudo da regulação da síntese de ACS1 de rato [531]. Nestes estudos usam-se, habitualmente, altas concentrações de ATP e luciferina e um dos problemas é que esta estratégia, aumentando a sensibilidade do sistema, diminui o período de tempo em que a luz mantém velocidades de produção elevadas; por esse motivo o uso de substâncias que, como a coenzima A, estabilizam a velocidade de produção de luz ao longo do tempo têm aqui uma aplicação prática importante [637].

1.6.b- Síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados pela luciferase de *Photinus pyralis*.

Estudos no laboratório de Sillero e Sillero, iniciados em 1990, mostraram que a luciferase de *Photinus pyralis* também podia catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados [363-367] e que a reacção depende da presença de luciferina [363, 364] ou de análogos que o podem substituir; concretamente, observou-se ser o caso da desidroluciferina ou da 6'-etil-luciferina [366]. Até à realização de um dos trabalhos apresentados no corpo desta memória [Artigo IV] admitia-se que, quando era a luciferina que era adicionada ao meio de ensaio, o intermediário na síntese de Ap₄A era, mesmo na presença de oxigénio, o anidrido luciferil-adenilato formado a partir de ATP e luciferina (ver equação 31) [363-367]. O complexo E•luciferil-adenilato, tal como o complexo intermediário similar, referido a propósito das sínteses de aminoacil-tRNA (ver capítulo 1.4.c.1), poderia transferir o resíduo adenilato para uma segunda molécula de ATP com conseqüente síntese de Ap₄A (ver equação 34) [363]. Neste processo reactivo, encarado como um todo (ver equação 9), a luciferina não seria consumida e desempenharia, tal como os aminoácidos na reacção homóloga das sínteses de aminoacil-tRNA, o papel de um cofactor essencial [363, 364]. A reversibilidade da reacção de síntese de Ap₄A foi demonstrada: a adição conjunta de Ap₄A e PPi levava à formação de ATP [364].



O oxigénio é um dos reagentes indispensáveis na reacção de produção de luz [565-569, 599] mas não parecia desempenhar qualquer papel no processo de síntese de Ap₄A [366].

De modo análogo ao que acontecia no caso das sínteses de aminoacil-tRNA também aqui a PPase estimulava marcadamente esta reacção [363]. Também se observou ser indispensável a presença de um catião bivalente e que as concentrações de catião bivalente em que se observava actividade máxima eram, pelo menos quando a concentração de ATP era 2 mM, equimolares com o ATP ou ligeiramente superiores; o Mg²⁺ era o metal que mostrava maior eficácia enquanto que o Zn²⁺, o Co²⁺ e o Mn²⁺ mostravam uma eficácia intermédia e o Ca²⁺ era muito menos eficaz [364]. O pH óptimo da actividade de síntese de Ap₄A era de cerca de 5,7 [364], um valor bastante mais baixo que o determinado para a actividade de produção de luz que se situa em cerca de 7,5-8 [598, 605, 614, 619]. O K_m do ATP na reacção de síntese de Ap₄A foi avaliado em 4 mM [364].

A especificidade de substratos nas reacções de síntese de dinucleosídeos polifosfatados catalisada pela luciferase também foi estudada. A adição ao meio de ensaio de dATP, p₄A ou GTP como únicos nucleotídeos (em substituição do ATP) levou, respectivamente, à formação de dAp₄dA, Ap₅A e Gp₄G; relativamente à actividade de síntese de Ap₄A (9 mU/mg de proteído) estas actividades foram, respectivamente, 33%, 44% e 9% [364]. Não foi observada síntese de dinucleotídeos quando o meio de ensaio continha como únicos substratos α,β-metileno-ATP, β,γ-metileno-ATP, ATPαS ou ATPγS [364]. Quando o meio de ensaio continha, conjuntamente, ATP e α,β-metileno-ATP ou ATPαS em concentrações semelhantes (cerca de 1-2 mM) observou-se síntese de Ap₄A, como era previsível, mas também marcada síntese de α,β-metileno-Ap₄A ou Ap₄AαS, respectivamente [364]. Contrastando com este resultado não foi obtida síntese de β,β-metileno-Ap₄A, Ap₄AβS ou Ap₃A quando o meio de ensaio continha ATP e β,γ-metileno-ATP, ATPγS ou ADP [364]. A adição conjunta ao meio de ensaio de ATPγS e variados mononucleosídeos trifosfatados (GTP, dGTP, UTP, CTP,

dCTP, XTP, TTP, ITP e dITP) e p_4G permitiu a síntese de heterodinucleosídeos tetra e penta-fosfatados (Ap_4G , Ap_4dG , Ap_4U , Ap_4C , Ap_4dC , Ap_4X , Ap_4dT , Ap_4I , Ap_4dI e Ap_5G , respectivamente) sendo o valor destas actividades de síntese semelhantes às observadas para a síntese de Ap_4A [365]. Estes resultados levaram Sillero e colaboradores [364] a concluir que os substratos preferidos para a síntese do complexo E•luciferil-nucleotidato eram nucleotídeos de adenina contendo uma cadeia de três ou mais fosfatos e um fosfato α intacto e que, para reagir com aquele complexo, era essencial a presença de um nucleotídeo com pelo menos uma cadeia de três fosfatos tendo os dois fosfatos terminais intactos. Para além dos mononucleosídeos trifosfatados acima referidos demonstrou-se que polifosfatos lineares constituídos por 3 a 20 resíduos fosfato (P_n) eram também aceitadores de adenilato; na presença conjunta de ATP e destes polifosfatos formavam-se mononucleotídeos de adenina contendo mais um fosfato que o polifosfato aceitador ($p_{(n+1)}A$) [365]. Os mononucleosídeos polifosfatados formados eram aceitadores de adenilato o que permitiu a síntese de dinucleosídeos polifosfatados com um número variado de fosfatos; usando, por exemplo, como substratos P_5 e ATP foi possível observar a formação de Ap_7A [365]. Na presença de ATP e P_3 , em igual concentração (2 mM), e de PPase observou-se a formação de p_4A , Ap_4A e Ap_5A . Ao fim de duas horas de incubação a percentagem de equivalentes de adenina era muito superior no p_4A (44%), ou mesmo no Ap_5A (23%) que no Ap_4A (14%); nas condições de ensaio utilizadas, o P_3 e o p_4A foram melhores aceitadores de adenilato que o ATP. Também o P_4 (síntese de p_5A) era melhor aceitador de adenilato que o ATP [365].

As concentrações de ATP e de enzima habitualmente utilizadas para o estudo deste tipo de actividades foram sempre várias ordens de grandeza superiores às que são habitualmente usadas para os estudos de bioluminescência e de doseamento do ATP [363-367, 590, 616, 631, 634]. A evolução das duas actividades ao longo do tempo era também muito distinta: enquanto, pelo menos nestas condições experimentais, a actividade de produção de luz decaía rapidamente em segundos sendo o clarão visível a olho nu, a actividade de síntese de Ap_4A mantinha-se, na presença de PPase e desde que houvesse substrato (ATP) disponível, praticamente constante durante horas [366].

Curiosamente, a leitura atenta de um artigo publicado em 1956 por McElroy e Green [600] mostra que estes investigadores, usando concentrações de luciférase de *Photinus pyralis* e de ATP da mesma ordem de grandeza das que são hoje usadas para a síntese de Ap_4A , estudaram nessa época a síntese de PPi não se tendo apercebido que um dos produtos formados no seu sistema de ensaio era, à luz dos conhecimentos actuais, Ap_4A e não AMP como supunham. Estes autores observaram que, na presença de PPase e luciferina, o consumo de ATP e a síntese de Pi (produto da hidrólise do PPi) se mantinham a velocidade sensivelmente constante durante horas enquanto que a emissão de luz praticamente desaparecia ao fim de poucos minutos [600]. Observaram ainda que, ao contrário da produção de luz, o fenómeno não dependia da presença de oxigénio e que a desidroluciferina formada durante a reacção (na época chamada de oxiluciferina; ver capítulo 1.6.a.3) podia substituir a luciferina [600]. Outro estudo da equipa de McElroy publicado em 1958 [604] também mostrou que o anidrido desidroluciferil-adenilato sintetizado quimicamente podia, na presença de enzima, reagir quer com o PPi quer com o ATP gerando desidroluciferina. Se, no caso do PPi , o processo reactivo foi correctamente interpretado como uma consequência da pirofosforólise do desidroluciferil-adenilato, no caso do ATP, os autores presumiram que este nucleotídeo induzia a hidrólise deste anidrido [604].

A circunstância de as actividades de síntese de Ap_4A serem comodamente estudadas *in vitro* usando concentrações elevadas de luciférase não significa necessariamente que a contribuição desta enzima para a síntese de Ap_4A nas lanternas dos pirilampos seja irrelevante. Foi recentemente observado que apesar da elevada actividade da dinucleosídeo-tetrafosfátase

assimétrica neste tecido do *Photinus pyralis* a concentração de Ap₄A é semelhante à existente noutros tecidos deste insecto [16].

1.7- Semelhanças estruturais e funcionais entre sintétases de acil-CoA, luciférase de insectos coleópteros e outras enzimas da superfamília da luciférase.

Nas sintétases de acil-CoA de cadeia longa, mais concretamente na região LS1, a região semelhante às luciférase de insectos coleópteros mais próxima da extremidade amina livre (ver capítulo 1.5.b.3), existe um motivo sequencial [514] que, de acordo com Chang e colaboradores [672], designaremos como motivo I. Este motivo pode, na sua versão mais abrangente, ser escrito como se segue: [LIVMFY]-x₂-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-[SG]-x-[PASLIVM]-[KR] (Prosite PS00455) [673]. Versões menos abrangentes desta sequência foram originalmente descritas por Toh (S-G-[ST]-T-G-x-P-K-G) [674] e por Babbitt e colaboradores ([TS]-[SG]-G-[ST]-[TE]-G-x-P-K-G) [675] no início dos anos noventa. O motivo I é comum às enzimas conhecidas como fazendo parte da superfamília da luciférase [673]. Esta superfamília inclui para além das luciférase de insectos coleópteros (EC 1.13.12.7) [595, 657-663], das sintétases de acil-CoA de cadeia longa (EC 6.2.1.3) [444, 493, 506-521] ou muito longa [548, 549] e das sintétases de acetil-CoA (EC 6.2.1.1) [418-427] de várias origens, outras enzimas como sintétases de 4-coumaril-CoA de plantas (EC 6.2.1.12) [676-678], a sintétase de 4-clorobenzoil-CoA de bactérias [675, 679], a sintétase de colil-CoA de *Eubacterium* [680], a sintétase de carnitil-CoA de *Escherichia coli* [681], a sintétase de o-succinilbenzoil-CoA de *Bacillus subtilis* (EC 6.2.1.26) [682], a sintétase 1 de gramicidina S de *Bacillus brevis* (EC 5.1.1.11) [683, 684], a sintétase 2 de gramicidina S de *Bacillus brevis* [685, 686], a sintétase 1 de tirocidina de *Bacillus brevis* [687], sintétases de δ-(L-α-amino adipil)-L-cistinil-D-valina de vários fungos [688-691], os componentes E e F do complexo sintase de enterobactina de *Escherichia coli* [692, 693], a redútase de α-amino adipato de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 1.2.1.31) [694], a sintétase de indolacetil-lisina de *Pseudomonas savastanoi* (EC 6.3.2.20) [695] e ainda um proteído envolvido no transporte de ácidos gordos de cadeia longa através da membrana celular em mamíferos [696, 697].

Um outro motivo sequencial, designado como motivo II ([YLWF]-[GSMW]-x-[TA]-E) por Chang e colaboradores [672], foi também identificado em muitos dos proteídos desta superfamília incluindo a luciférase de *Photinus pyralis* e uma sintétase de acil-CoA, concretamente a sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas oleovorans*.

Com base em estudos comparativos da estrutura primária de sintétases de acil-CoA de várias origens Black e colaboradores [698] identificaram, em 1996, um outro motivo sequencial (motivo III [672]) contendo 25 aminoácidos, comum às sintétases analisadas e que, na sua versão mais abrangente, pode ser escrito da seguinte maneira: [DN]-G-W-[LMF]-[HASKR]-T-G-D-[IV]-[GVA]-x-[WMI]-x-[PESAG]-x-[GY]-x-[LMIV]-[KRTS]-[IV]-[IVC]-D-R-[KAVR]-K. No caso das sintétases de acil-CoA de cadeia longa o motivo III está presente na região LS2, a região semelhante às luciférase de insectos coleópteros mais próxima da extremidade carboxílica livre (ver capítulo 1.5.b.3) [514]. Se se considerarem versões mais curtas (por exemplo [LY]-[RH]-[ST]-G-D) este motivo existe também na estrutura das luciférase de insectos coleópteros, nas sintétases de 4-coumaril-CoA de plantas e noutras enzimas da superfamília da luciférase [672, 698].

A análise, mais ou menos abrangente, das semelhanças, quer estruturais quer funcionais, entre os proteídos referidos acima foi sendo feita por muitos autores ao longo da última década [506-511, 514, 519, 548, 587, 588, 595, 661-663, 672, 674, 675, 678, 680, 686, 691, 698-704]. Para além das semelhanças estruturais, com graus de identidade entre enzimas

catalisando reacções distintas rondando os 20-30% [672, 680], muitas das enzimas acima referidas parecem partilhar também um mecanismo enzimico semelhante. Esse mecanismo envolveria, num primeiro passo, a transferência do resíduo adenilato do ATP para um substrato carboxílico com a síntese de um anidrido acil-adenilato e libertação de PPi e, num segundo passo, a transferência do resíduo acil para um grupo tiol.

Nalguns casos o grupo tiol existe na coenzima A que é um dos substratos consumidos no processo reactivo e as enzimas são mesmo denominadas como sintétases de acetil-CoA, acil-CoA, 4-coumaril-CoA, 4-clorobenzoil-CoA, o-succinilbenzoil-CoA, carnitil-CoA e colil-CoA. Noutros casos, no processo catalítico, o grupo tiol da 4'-fosfopanteteína (ligada de forma covalente às enzimas) forma tioésteres com determinados substratos (como aminoácidos ou outros ácidos carboxílicos) e estes tioésteres são intermediários no mecanismo enzimico; é o caso das sintétases 1 e 2 de gramicidina S, da sintétase 1 de tirocidina, da sintétase de δ -(L- α -aminoadipil-L-cistinil-D-valina) e da sintétase de enterobactina [693, 704-708]. O envolvimento de grupos tiol pode, contudo, não ser uma característica comum a todas as enzimas desta superfamília; tanto quanto sabemos, este envolvimento não foi demonstrado nos casos da redutase de α -aminoadipato, da sintétase de indolacetil-lisina e do transportador de ácidos gordos de cadeia longa.

A formação de acil-adenilatos foi demonstrada isolando e identificando estes intermediários em sistemas de ensaio adequados ou inferida da observação que a reacção de troca ATP-PPi dependia da adição ao meio de ensaio de um ácido carboxílico específico que era substrato noutra reacção catalisada pelas mesmas enzimas. Um ou ambos os tipos de evidências foram observados nos casos das sintétases de acetil-CoA [431, 554, 557], acil-CoA de cadeia média [431, 558], 4-coumaril-CoA [709], 4-clorobenzoil-CoA [710], colil-CoA [680], δ -(L- α -aminoadipil-L-cistinil-D-valina) [704, 705, 707], enterobactina [693, 711], assim como nos casos da redutase de α -aminoadipato [712, 713], da luciférase [600, 605, 647], das sintétases 1 e 2 de gramicidina S [704, 705, 714] e da sintétase 1 de tirocidina [715, 716].

Como referido no capítulo 1.6.a.2 a luciférase de *Photinus pyralis* e, presumivelmente, outras luciférase que partilham a mesma luciferina catalisam a formação de luciferil-adenilato [605] ou desidroluciferil-adenilato [647] e, no caso do desidroluciferil-adenilato, o resíduo desidroluciferina pode ser transferido para a coenzima A [643, Artigos III e IV]. A semelhança funcional entre as sintétases de acil-CoA e a luciférase foi, ainda nos anos cinquenta, realçada por Berg [430] e objecto de análise ampla, em 1967, por McElroy e colaboradores [582].

As actividades de transferência do resíduo adenilato do ATP para polifosfatos ou mononucleotídeos com formação de mono ou dinucleosídeos polifosfatados catalisadas pela sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* ou pela luciférase de *Photinus pyralis* foram discutidas nos capítulos 1.5.a.2 e 1.6.b. O aprofundamento do estudo destas actividades da luciférase e a revelação da sua existência no caso da sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* foram o objecto dos trabalhos que constituem o corpo desta memória [Artigos I a IV].

Como referido no capítulo 1.6.a.4, entre as enzimas da superfamília da luciférase, foram estudadas por cristalografia de raios X a luciférase de *Photinus pyralis* [664] e a sintétase 1 de gramicidina S de *Bacillus brevis* [665]. Nestas duas enzimas, considerando a sua estrutura tridimensional que é, como se previa, semelhante em muitos aspectos, os motivos sequenciais I, II e III estão situados muito próximos uns dos outros participando na formação do centro activo [664, 665]. A sintétase 1 de gramicidina S catalisa a síntese de fenilalanil-adenilato a partir de ATP e L-fenilalanina, a transferência da L-fenilalanina para um resíduo 4'-fosfopanteteína ligado à própria enzima e a racemização da L-fenilalanina a D-fenilalanina [683, 704, 705, 717]. A cristalização desta enzima foi feita na presença de ATP e L-

fenilalanina; na estrutura cristalina obtida não estava presente fenilalanil-adenilato mas sim AMP e L-fenilalanina cujo posicionamento sugeria que tinha ocorrido hidrólise do anidrido mantendo-se os seus componentes no mesmo local onde existiam antes da hidrólise [665]. Seis dos treze resíduos aminoácidos que interagiam, em ligações de tipo iónico ou hidrogénio, com a fenilalanina e o AMP, eram componentes dos motivos sequenciais I, II ou III [665]. Curiosamente, com a excepção de um resíduo que se ligava ao fosfato α do AMP, a maioria dos aminoácidos do motivo I estavam colocados numa posição que sugeria a possibilidade de este motivo poder ligar os fosfatos β e γ do ATP [665].

Estudos de Chang e colaboradores [672] sobre o efeito de substituições de aminoácidos nos motivos sequenciais I e II na actividade da sintétase da 4-clorobenzoil-CoA de uma estirpe de *Pseudomonas* (CBS3) comprovaram a importância destes motivos na formação do 4-clorobenzoil-adenilato. A forma nativa da enzima contém os aminoácidos correspondentes ao motivo I entre as posições 158 e 169 (V-F-Y-T-S-G-T-T-G-L-P-K) e os correspondentes ao motivo II entre as posições 302 e 306 (Y-G-T-T-E) [675]. A substituição da prolina 168 por alanina (P168A) anulava quer a actividade de síntese de 4-clorobenzoil-adenilato (estudada na ausência de coenzima A) quer a de síntese de 4-clorobenzoil-CoA [672]. As outras quatro substituições testadas (G163I, G166I, K169M e E306Q) provocaram em todos os casos diminuição nas constantes de velocidade associadas à formação do 4-clorobenzoil-adenilato e diminuição da concentração de equilíbrio deste intermediário [672]. Em geral, na reacção de síntese de 4-clorobenzoil-CoA observaram-se aumentos nos valores do K_m do ATP e do 4-clorobenzoato que contrastavam com efeitos pouco marcados, ou mesmo nulos, no K_m da coenzima A [672].

A sintétase de acil-CoA de *Escherichia coli* contém o motivo III entre as posições 431 e 455 que, no caso concreto, é constituído pela seguinte sequência: N-G-W-L-H-T-G-D-I-A-V-M-D-E-E-G-F-L-R-I-V-D-R-K-K [518, 519]. Observou-se que a substituição por alanina de diferentes aminoácidos nesta sequência anulava a actividade catalítica ou alterava a sua especificidade no que se refere ao substrato ácido gordo; por exemplo, a substituição dos resíduos valina 451 (V), aspartato 452 (D) ou lisinas 454 e 455 (K) provocava diminuição da actividade relativamente ao ácido oleico e aumento ou diminuição discreta relativamente ao ácido decanoico [698]. Estes dados levaram Black e colaboradores [698] a sugerir que este motivo sequencial poderia estar envolvido na ligação do ácido gordo às sintétases de acil-CoA ou, no caso doutras enzimas da mesma superfamília, na ligação do substrato carboxílico.

As evidências acumuladas parecem mostrar que as semelhanças estruturais acima discutidas impõem mecanismos de catálise semelhantes. É, no entanto, difícil de excluir a possibilidade de que existam excepções. Para além do caso das diversas sintétases de acil-CoA nomeadamente as de cadeia longa já discutido no capítulo 1.5.d.2, não existem, tanto quanto sabemos, evidências da formação de acil-adenilatos durante a actividade biológica das sintétases de carnitil-CoA, de o-succinilbenzoil-CoA e de indolacetil-lisina assim como do transportador de ácidos gordos de cadeia longa. Por outro lado, outras enzimas onde se comprovou a formação de acil-adenilatos não têm semelhanças estruturais com as enzimas da superfamília das luciféras; um exemplo flagrante é o caso das sintétases de aminoacil-tRNA [664, 675, 686, 718]. A semelhança funcional das sintétases de aminoacil-tRNA com enzimas que hoje se agrupam na superfamília da luciferase (luciferase de insectos coleópteros e sintétases de acil-CoA) foi, ainda nos anos sessenta, realçada por McElroy e colaboradores [582]. Esta semelhança pode ser mais ampla do que é habitualmente considerada: no caso das sintétases de isoleucil-, metionil-, asparagil- e seril-tRNA de *Escherichia coli* foi, recentemente, demonstrada a possibilidade de os aminoácidos poderem, na presença de ATP e coenzima A, ser transferidos para a coenzima A gerando como produtos os respectivos tioésteres, AMP e PPi [719].

**2– SÍNTESE DE MONO E DINUCLEOSÍDEOS POLIFOSFATADOS PELA
SINTÉTASE DE ACIL-COA DE *PSEUDOMONAS FRAGI* E PELA
LUCIFÉrase DE *PHOTINUS PYRALIS***

2.1- A síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* catalisa a síntese de adenosina-5'-polifosfatos e dinucleosídeos polifosfatados.

Artigo I

Acyl-CoA Synthetase from *Pseudomonas fragi*
catalyzes the synthesis of adenosine 5'-
polyphosphates and dinucleoside polyphosphates.

Rui Fontes, Maria A. Günther Sillero and Antonio Sillero.

J Bacteriol (1998) 180: 3152-3158

Acyl Coenzyme A Synthetase from *Pseudomonas fragi* Catalyzes the Synthesis of Adenosine 5'-Polyphosphates and Dinucleoside Polyphosphates†

RUI FONTES,¹ MARIA A. GÜNTHER SILLERO,² AND ANTONIO SILLERO^{2*}

Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain,² and Serviço de Química Fisiológica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal¹

Received 26 January 1998/Accepted 6 April 1998

Acyl coenzyme A (CoA) synthetase (EC 6.2.1.8) from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate (p₄A) and adenosine 5'-pentaphosphate (p₅A) from ATP and tri- or tetrapolyphosphate, respectively. dATP, adenosine-5'-O-[γ-thiotriphosphate] (ATPγS), adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (Ap₄A), and adenosine(5')pentaphospho(5')adenosine (Ap₅A) are also substrates of the reaction yielding p₄(d)A in the presence of tripolyphosphate (P₃). UTP, CTP, and AMP are not substrates of the reaction. The K_m values for ATP and P₃ are 0.015 and 1.3 mM, respectively. Maximum velocity was obtained in the presence of MgCl₂ or CoCl₂ equimolecular with the sum of ATP and P₃. The relative rates of synthesis of p₄A with divalent cations were Mg = Co > Mn = Zn >> Ca. In the pH range used, maximum and minimum activities were measured at pH values of 5.5 and 8.2, respectively; the opposite was observed for the synthesis of palmitoyl-CoA, with maximum activity in the alkaline range. The relative rates of synthesis of palmitoyl-CoA and p₄A are around 10 (at pH 5.5) and around 200 (at pH 8.2). The synthesis of p₄A is inhibited by CoA, and the inhibitory effect of CoA can be counteracted by fatty acids. To a lesser extent, the enzyme catalyzes the synthesis also of Ap₄A (from ATP), Ap₅A (from p₄A), and adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside (Ap₄N) from adequate adenyl donors (ATP, ATPγS, or octanoyl-AMP) and adequate adenyl acceptors (nucleoside triphosphates).

Dinucleoside polyphosphates have been detected in a wide variety of eukaryotic and prokaryotic organisms (13). In higher organisms, their concentrations are generally on the order of 0.01 to 1 μM. Human blood platelets and chromaffin cells of bovine adrenal medulla contain diadenosine polyphosphates located in the dense bodies (10, 26, 35) and chromaffin granules (32, 38), respectively, where they may reach higher local concentrations. The occurrence of dinucleoside polyphosphates has been described for lower eukaryotic (*Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*, and *Physarum polycephalum*) and for prokaryotic (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and *Clostridium acetobutylicum*) organisms (13).

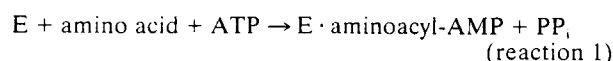
Dinucleoside tetraphosphates participate in the control of purine nucleotide metabolism (36), where Ap₄A is an activator of both the IMP-GMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) and AMP deaminase (EC 3.5.4.6) (K_m, micromolar range) and Gp₄G is an activator of GMP reductase (EC 1.6.6.8) (K_m, nanomolar range) (36). As the concentration of dinucleoside polyphosphates increases under unfavorable environmental conditions, they have been implicated in the cellular response to stress (31). A role of Ap₄A in DNA synthesis has been proposed elsewhere (14). Dinucleoside polyphosphates are also transition state analogs of some kinases (37). More recently, the dinucleoside triphosphatase activity of a

putative tumor suppressor gene product has been described (3).

The nucleoside 5'-polyphosphates (p_nN) are another family of related compounds, p₄A has been detected in rabbit and horse muscle (41), rat liver (44), *S. cerevisiae* spores (19), and chromaffin granules (38). As p₄A is a very strong inhibitor (K_i, nanomolar range) of asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase (EC 3.6.1.17) (22), changes in the level of p₄A could affect the concentration and physiological roles of Ap₄A. Other enzymes known to be inhibited (K_i, micromolar range) by p₄N are guanylate cyclase (EC 4.6.1.2) (p₄A and p₄G) (18) and phosphodiesterase I (EC 3.1.4.1) (p₄G) (9). Effects of p₄A on the tone of the vascular system, mediated by P₂ receptors, have also been described elsewhere (21).

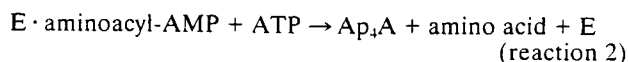
The cellular level of dinucleoside polyphosphates results from their rate of degradation and synthesis. The following specific enzymes, implicated in the cleavage of dinucleoside polyphosphates, have been described (see reference 15 for a review): asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase (EC 3.6.1.17), symmetrical dinucleoside tetraphosphatase (EC 3.6.1.41), dinucleoside tetraphosphate phosphorylase (EC 2.7.7.53), and dinucleoside triphosphatase (EC 3.6.1.29). In addition, there are other unspecific enzymes able to catalyze the hydrolysis of dinucleoside polyphosphates like *E. coli* 5'-nucleotidase (34) and phosphodiesterase I (9, 15, 26).

This paper deals with the synthesis of (di)nucleoside polyphosphates. It has been known since 1966 that some aminoacyl tRNA synthetases (30, 45) catalyze the synthesis of Ap₄A through reactions 1 and 2:

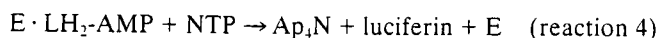
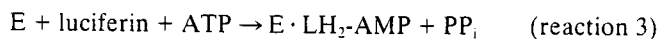


* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UAM, Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain. Phone: 34-1-3975413. Fax: 34-1-3975353. E-mail: antonio.sillero@uam.es.

† Dedicated to José Pinto de Barros, retired professor of Physiological Chemistry in the Faculdade de Medicina do Porto, Porto, Portugal.



The possibility that other enzymes (mainly synthetases and some transferases) which catalyze the formation of AMP, via nucleotidyl-containing intermediates and by releasing PP_i , could catalyze the synthesis of dinucleoside polyphosphates was later raised (17). Luciferase (EC 1.13.12.7), considered as an oxidoreductase, catalyzes the synthesis of Ap_4A with ATP as substrate and luciferin as an essential activator (27, 40):



Acetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.1) from *S. cerevisiae* also catalyzes the synthesis of p_4A and p_5A , from ATP and P_3 and P_4 , respectively (16). In the reactions catalyzed by luciferase and acetyl-CoA synthetase, ATP is a very good substrate for the formation of the $E \cdot X\text{-AMP}$ complex (X = the appropriate acyl residue), whereas any NTP (or even P_3) is an acceptor (particularly in the case of luciferase) of the AMP moiety of the complex, provided that it has an intact terminal pyrophosphate (27, 40).

Here we show that acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes the synthesis of p_4A , p_5A , Ap_4A , Ap_5A , and a variety of Ap_4Ns . In our view, these findings widen the knowledge of the mechanisms of synthesis of (di)nucleoside polyphosphates in prokaryotes and, by extrapolation, also in eukaryotes.

MATERIALS AND METHODS

Abbreviations. The abbreviations used are as follows: p_4A , adenosine 5'-tetraphosphate; p_5A , adenosine 5'-pentaphosphate; p_4G , guanosine 5'-tetraphosphate; p_3N , nucleoside 5'-tetraphosphate; P_3 , triphosphosphate; P_4 , tetraphosphosphate; Ap_2A , adenosine(5')diphospho(5')adenosine; Ap_3A , adenosine(5')triphospho(5')adenosine; Ap_4A , adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine; Ap_5A , adenosine(5')pentaphospho(5')adenosine; Ap_4N , adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside; Ap_4C , adenosine(5')tetraphospho(5')cytosine; Ap_4dC , adenosine(5')tetraphospho(5')deoxycytosine; Ap_4G , adenosine(5')tetraphospho(5')guanosine; Ap_4dG , adenosine(5')tetraphospho(5')deoxyguanosine; Ap_4X , adenosine(5')tetraphospho(5')xanthosine; Ap_4U , adenosine(5')tetraphospho(5')uridine; Ap_4dT , adenosine(5')tetraphospho(5')thymidine; Gp_4G , guanosine(5')tetraphospho(5')guanosine; NTP, nucleoside 5'-triphosphate; $ATP\gamma S$, adenosine 5'-O-[γ -thiotriphosphate]; MES, 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid; CoA, coenzyme A; octanoyl-AMP, octanoyl-adenylate; $LH_2\text{-AMP}$, luciferyl-adenylate; U, micromoles of product formed per minute; HPLC, high-performance liquid chromatography; TLC, thin-layer chromatography.

Materials. Acyl-CoA synthetase from *P. fragi* was obtained from Boehringer Mannheim. The lyophilized powder was, unless otherwise indicated, dissolved (3.62 mg/ml) in 25 mM HEPES-KOH (pH 7.6)–0.1 mM dithiothreitol–5% glycerol–0.1% bovine serum albumin (solution E) (16). CoA, dithiothreitol, octanoic anhydride, palmitic and octanoic acids, sodium tripolyphosphate, ammonium tetraphosphosphate, and the nucleotides were from Sigma or Boehringer Mannheim, except for dTTP (Pharmacia Biotech). Bovine serum albumin (fraction V, fatty acid free) was from Boehringer Mannheim. $[2,8\text{-}^3H]\text{ATP}$ (45 Ci/mmol) was from Amersham Life Sciences, and $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ was from DuPont NEN. The stock solutions of 1 mM octanoic acid and 1 mM palmitic acid were prepared by adding enough KOH so that the pH was 7.5; in the case of palmitic acid, the emulsion was further dispersed in 1% Triton X-100 or in 1% Triton X-100–5% ethanol. Phosphodiesterase from *Crotalus durissus* (EC 3.1.4.1), alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) from calf intestine, and inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) from yeast were purchased from Boehringer Mannheim. Asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase was purified from rat liver as described by Sillero et al. (39). Octanoyl-AMP was prepared from AMP and octanoic anhydride as previously described (43). HPLC chromatographs were from Hewlett-Packard or Waters. Ultrafiltration was performed with microconcentrators with exclusion limit membranes of 30 kDa (from Vivascience or Amicon Inc.).

Enzyme assays. All the assays were carried out at 30°C.

Synthesis of p_4A . Unless otherwise indicated, the reaction mixtures (50 μ l) contained 50 mM MES-KOH (pH 6.3), 0.1 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 10 mM P_3 , 11 mM $MgCl_2$, and acyl-CoA synthetase (5 to 10 μ g of protein). The reaction mixtures were analyzed by one of the following methods.

(i) **TLC.** Aliquots (3 to 4 μ l) of the reaction mixtures were spotted on silica gel plates (TLC UV254 fluorescent chromatographic plates; Merck) and developed

in dioxane-ammonium hydroxide-water (6:1:6, by volume). When $[2,8\text{-}^3H]\text{ATP}$ was used, the nucleotide spots, localized with 253-nm-wavelength light, were cut and the radioactivity was counted. When $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ was used, the TLC plates were directly analyzed in an InstantImager (Packard Instrument Co.).

(ii) **HPLC.** Aliquots of 10 to 20 μ l of the reaction mixtures were diluted in water, kept at 100°C for 90 s, chilled, filtered, and analyzed with Hypersil octyldecyl silane columns (Hewlett-Packard). Elutions were performed at a constant flow rate (0.5 ml/min) with a 20-min linear gradient (5 to 30 mM) of sodium phosphate (pH 7.5) in 20 mM tetrabutylammonium bromide–20% methanol (buffer A), followed by a 10-min linear gradient (30 to 100 mM) of sodium phosphate (pH 7.5) in buffer A or isocratic buffer (15 or 25 mM sodium phosphate, pH 7.5, in buffer A).

Synthesis of palmitoyl-CoA. Unless otherwise indicated, the reaction mixtures (50 μ l) contained 50 mM Tris-HCl (pH 8.2), 0.1 mM dithiothreitol, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $[2,8\text{-}^3H]\text{ATP}$, 1 mM CoA, 15 μ l of the palmitic acid stock solution, and acyl-CoA synthetase (0.27 μ g of protein). The analysis of the assay mixtures was carried out as described above, and the plates were developed in dioxane-ammonium hydroxide-water (6:1:5). Activity was measured as the amount of AMP formed.

Synthesis of Ap_4A and Ap_5A . The reaction mixtures (0.6 ml) contained 50 mM MES-KOH (pH 5.5), 0.1 mM dithiothreitol, 4 mM $MgCl_2$, 4 mM ATP or p_4A , inorganic pyrophosphatase (1.5 μ l), and acyl-CoA synthetase (89 μ g of protein).

Synthesis of Ap_4G or Ap_4C from ATP and GTP or CTP. The reaction mixtures (0.1 ml) contained 50 mM MES-KOH (pH 6.3), 0.1 mM dithiothreitol, 0.63 mM ATP, 3 mM GTP or CTP, 6 mM $MgCl_2$, desalted inorganic pyrophosphatase (1.7 μ l), and acyl-CoA synthetase (25 μ g of protein).

Miscellaneous methods. Inorganic pyrophosphatase used to hydrolyze the PP_i produced during the enzyme assays or the PP_i contaminating P_3 was a suspension in ammonium sulfate solution (3.2 M). As the ammonium salts inhibited the synthesis of p_4A by acyl-CoA synthetase (unpublished results from this laboratory), pyrophosphatase was desalted by ultrafiltration before use.

HPLC gel filtration of acyl-CoA synthetase was carried out by injecting into a Bio-Sil-Sec 250 column (600 by 7.5 mm; Bio-Rad) 0.5 ml of 1.8 mg of lyophilized powder dissolved in 50 mM Na_2SO_4 –20 mM sodium phosphate (pH 6.8) buffer. Elution was performed at a constant flow rate (0.5 ml/min) with the same buffer. Fractions of 0.25 ml were collected, and p_4A and palmitoyl-CoA synthetic activities were measured.

Contaminant ATP was removed from the acyl-CoA synthetase by dialysis for about 30 h at 4°C. In the first 18 h, 1 ml of the enzyme preparation was dialyzed against 1 liter of solution E without albumin replaced by 200 ml of solution E in the last 12 h.

Purification of the mono- or dinucleoside polyphosphates synthesized by acyl-CoA synthetase was performed by TLC. The entire reaction mixtures were heated at 100°C for 90 s (in the case of dinucleoside polyphosphates, the samples were previously treated with alkaline phosphatase [10 μ g of protein] for 2 h) and filtered, and the total volume was spotted on silica gel plates along a line and developed in dioxane-ammonium hydroxide-water as described above. The visible (under 253-nm-wavelength light) line spots corresponding to the nucleotides were cut, concentrated by elution with dioxane-water (1:1), and finally extracted with water.

RESULTS

Synthesis of adenosine 5'-polyphosphates (p_4A and p_5A) from ATP and P_n . A reaction mixture containing acyl-CoA synthetase, ATP, $MgCl_2$, inorganic pyrophosphatase, and P_3 or P_4 accumulated compounds with chromatographic (TLC and HPLC) mobilities similar to that of p_4A or p_5A , respectively. The synthesis of these compounds depended on the presence of enzyme, and their concentration increased with the time of incubation (Fig. 1A). The identity of the corresponding chromatographic peaks was assessed as p_4A and p_5A by the following criteria: coelution with standards in TLC and HPLC, absorption spectra, and treatment with alkaline phosphatase. This treatment yielded ATP, ADP, AMP, and adenosine in the case of p_4A and the same products plus p_4A in the case of p_5A (Fig. 1B and C).

Synthesis of p_4A and palmitoyl-CoA by the commercial enzyme preparations. (i) **Nucleotide content.** The aim of these experiments was to test whether the synthesis of p_4A was catalyzed by the acyl-CoA synthetase or a contaminating enzyme(s) present in the commercial preparations. The thermal inactivation profiles (heating the enzyme preparation at 65°C for 0 to 60 min, followed by cooling on ice) of the activities of synthesis of p_4A and palmitoyl-CoA (measured as AMP formed) were coincident, both decreasing to half of those of

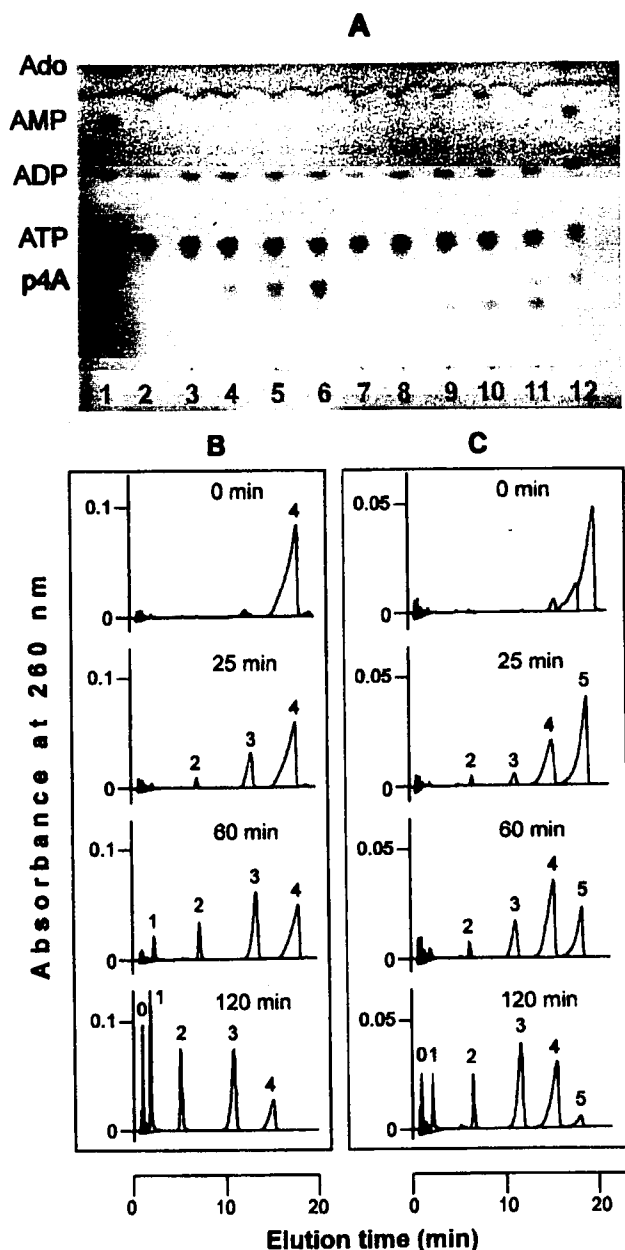


FIG. 1. (A) Synthesis of p₄A and p₅A from ATP, P₃, and P₄ catalyzed by acyl-CoA synthetase. The reaction mixtures contained 1.15 mM ATP, 0.8 μ l of desalted inorganic pyrophosphatase, 5 mM P₃ (lanes 2 to 6) or P₄ (lanes 7 to 11), and acyl-CoA synthetase (4.9 μ g of protein when the polyphosphate added was P₃ or 9.8 μ g of protein when it was P₄); other conditions and TLC analysis procedures were as described in Materials and Methods. Lanes: 1 and 12, standards of p₄A, ATP, ADP, AMP, and adenosine; lanes 2 and 7, the control mixtures without acyl-CoA synthetase after 2 and 4 h of incubation, respectively; lanes 3 to 6, the complete mixture containing P₃ taken after 0, 0.5, 1, and 2 h of incubation, respectively; lanes 8 to 11, the complete mixture containing P₄ taken after 0, 1, 2, and 4 h of incubation, respectively. (B and C) Effect of alkaline phosphatase on the presumptive p₄A (B) and p₅A (C) synthesized. Similar reaction mixtures (0.8 ml) were incubated for 7 or 36 h (in the case of P₃ or P₄ as adenylyl acceptor substrate, respectively), and the presumptive p₄A or p₅A formed was purified (see Materials and Methods) and characterized as follows: reaction mixtures (1 ml) containing 50 mM MES-KOH (pH 6.7), 0.2 mM MgCl₂, and purified p₄A (100 μ M) or p₅A (60 μ M) were treated with alkaline phosphatase (0.5 μ g of protein); at the times indicated, aliquots were taken and analyzed by HPLC. The numbers 0 to 5 on the top of the chromatographic peaks correspond to adenosine, AMP, ADP, ATP, p₄A, and p₅A, respectively.

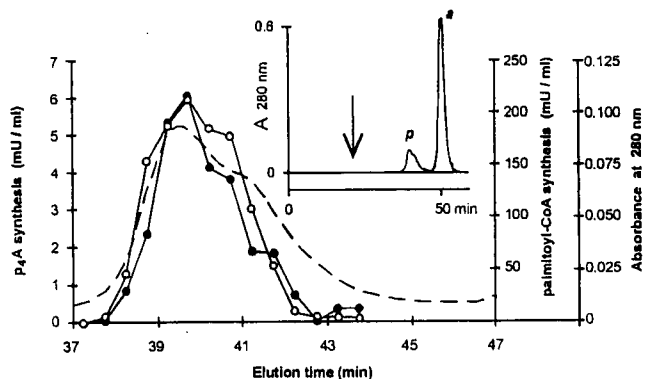


FIG. 2. Coelution of p₄A and palmitoyl-CoA synthetic activities upon gel filtration. A sample of acyl-CoA synthetase was applied to a Bio-Sil-Sec 250 column as described in Materials and Methods (inset); the arrow marks the column void volume; peaks p and a correspond to protein and adenine nucleotides, respectively. The activities of synthesis of p₄A (●) and palmitoyl-CoA (○) were studied with 15 and 0.33 μ l of the column fractions, respectively; [2,8-³H]ATP was used as radioactive substrate. Other conditions were as described in Materials and Methods. The broken line represents absorbance at 280 nm.

the nonheated enzyme preparation after 5 min at 65°C (data not shown). The commercial enzyme preparation yielded two peaks (p and a) upon elution from a Bio-Sil-Sec column (Fig. 2). Activities of synthesis of p₄A and palmitoyl-CoA coeluted exclusively with peak p, which also had a UV maximum at 280 nm. Peak a had a UV maximum similar to that of adenosine. As some of the experiments performed here (for example, determination of the K_m value for ATP) required knowing the nucleotide content of the commercial preparations, five lots of acyl-CoA synthetase were analyzed by HPLC, with a Hypersil octyldecyl silane column. In the enzyme preparations, the concentration of ATP varied between a maximum of 0.56 and a minimum of 0.22 μ mol/mg of lyophilized powder; p₄A, ADP, and AMP were always less than 0.005, 0.16, and 0.03 μ mol/mg, respectively, and no Ap₄A or other nucleotide was detected.

(ii) **Metal requirement.** The synthesis of p₄A depended on the presence of a divalent cation. Maximum activity was obtained in the presence of MgCl₂ equimolar with the sum of ATP and P₃. Similar profiles were attained with MgCl₂ and CoCl₂; less activity was measured in the presence of MnCl₂ or ZnCl₂, whereas with CaCl₂, the activity was even lower (results not shown).

(iii) **Effect of pH.** The reaction mixtures for the synthesis of p₄A were carried out in 50 mM (each) buffers specified in Fig. 3. The maximal rate was observed at pH 5.5, and at higher pH values, the activity decreased rather steadily. At pH 8.2, the activity was still 40% of that attained at pH 5.5. The activity of synthesis of palmitoyl-CoA, measured with the same buffers and pH range values, was maximal at pH 8.2 and minimal at pH 5.5 (Fig. 3). The relative rates of synthesis of palmitoyl-CoA and p₄A are ca. 10 (at pH 5.5) and ca. 200 (at pH 8.2).

Two opposite pH profiles for the same enzyme catalyzing two different reactions were also reported in the case of acetyl-CoA synthetase (synthesis of p₄A and acetyl-CoA) and for luciferase (synthesis of Ap₄A and light production), with optimum pH values in the acid and alkaline range, respectively (12, 16, 23, 40).

(iv) **K_m values in the synthesis of p₄A.** The K_m value for P₃ in the synthesis of p₄A was determined in the presence of fixed (1 mM) ATP, fixed (1 mM) free Mg²⁺, and variable (1 to 10 mM) P₃ concentrations. In these conditions, the K_m value found for P₃ was 1.3 mM (results not shown). A K_m value of 15

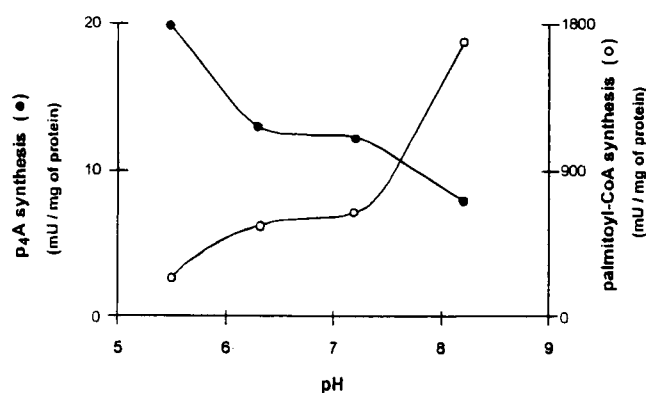


FIG. 3. Effect of pH on the synthesis of p_4A and palmitoyl-CoA catalyzed by acyl-CoA synthetase. The reaction mixtures (50 μ l) contained 50 mM MES-KOH (pH 5.5 and 6.3), HEPES-KOH (pH 7.2), or Tris-HCl (pH 8.2) and [2,8- 3H]ATP as radioactive substrate. In the case of p_4A synthesis, 8.3 μ g of protein was used; in the case of palmitoyl-CoA synthesis, the enzyme amount varied between 2.0 (pH 5.5) and 0.4 (pH 8.2) μ g of protein; other conditions were as described in Materials and Methods.

μ M for ATP was determined in the presence of 10 mM P_3 and 10.2 mM $MgCl_2$ (results not shown).

(v) **Nucleotide specificity.** The substrate specificity for the synthesis of p_4N was studied at pH 5.5 (50 mM MES-KOH) in the presence of fixed concentrations of P_3 (10 mM), nucleotide (1 mM), $MgCl_2$ (11 mM), and inorganic pyrophosphatase (0.4% [vol/vol]) and with an enzyme preparation from which ATP had been removed by dialysis (see Materials and Methods). The following nucleotides were assayed as substrates: ATP, ATP γ S, dATP, Ap_4A , Ap_5A , GTP, UTP, CTP, and AMP. The concentration of acyl-CoA synthetase in the assay containing ATP or ATP γ S was 42 μ g of protein/ml and was six times higher in the assays containing other nucleotides. The reaction mixtures and appropriate controls without enzyme were analyzed by HPLC after 0, 1, 6, and 24 h of incubation. CTP, UTP, and AMP were not substrates. With the other (di)nucleotide tested, enzyme-dependent synthesis of products with chromatographic mobilities and spectra compatible with p_4N was observed, the relative enzyme activities being as follows: ATP (100), ATP γ S (75), dATP (55), Ap_5A (30), Ap_4A (15), and GTP (6).

(vi) **Synthesis of diadenosine polyphosphates from ATP or p_4A .** Acyl-CoA synthetase-dependent synthesis of Ap_4A or Ap_5A was observed in reaction mixtures containing ATP or p_4A , respectively (see Materials and Methods). The relative activities of synthesis of p_4A versus Ap_4A and p_4A versus Ap_5A were around 100 and 40, respectively. The synthesized diadenosine polyphosphates were purified and then characterized by treatment with phosphodiesterase from *Crotalus durissus* or with asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase from rat liver. Upon phosphodiesterase treatment, formation of AMP and ATP from Ap_4A and of AMP and p_4A from Ap_5A was firstly observed (results not shown). Upon dinucleoside tetraphosphatase treatment, the products of hydrolysis of Ap_4A were AMP and ATP and those from Ap_5A were ADP and ATP (Fig. 4). These results, together with the UV spectra and coelution on TLC and HPLC with the corresponding standards, unequivocally characterized the two compounds synthesized by acyl-CoA synthetase as Ap_4A and Ap_5A , respectively.

The optimum pH value found for the synthesis of Ap_4A from ATP was 5.5, and the K_m value for ATP (determined at pH 5.5 and with 1 mM free Mg^{2+}) was 1.2 mM (results not shown).

(vii) **Synthesis of heterodinucleoside polyphosphates from ATP and NTP.** In the synthesis of Ap_4A , there are formation of an intermediate complex ($E \cdot$ acyl-AMP and/or E -AMP) and transfer of its adenylyl moiety to ATP yielding Ap_4A , with K_m values for ATP as adenylyl donor and acceptor of 0.015 and 1.2 mM, respectively. As in the case of luciferase, we supposed that the second step for the synthesis of Ap_4A by acyl-CoA synthetase could also be rather unspecific, i.e., any NTP could be acceptor of the adenylyl moiety yielding the corresponding Ap_4N compound. To diminish the transfer of AMP to another ATP and favor the synthesis of Ap_4Ns , we tested the synthesis of Ap_4G and Ap_4C with a relatively low concentration of ATP (0.63 mM) and relatively high concentrations (3 mM) of GTP and CTP. In these conditions, synthesis of Ap_4G and Ap_4C and almost no synthesis of Ap_4A were observed (data not shown). The identity of the corresponding Ap_4N was assessed by its chromatographic behavior in HPLC and UV spectra (Fig. 5). In the case of Ap_4G , the identity was also assessed by insensitivity to alkaline phosphatase and by phosphodiesterase treatment (data not shown).

(viii) **Synthesis of dinucleoside polyphosphates with ATP γ S or octanoyl-AMP.** The experiments described below were performed based on our previous experience with luciferase (27). Incubation of acyl-CoA synthetase with only ATP γ S or only octanoyl-AMP as substrate failed to produce any dinucleoside polyphosphate; however, when in addition to either of these two substrates, the reaction mixtures were supplemented with GTP, dGTP, CTP, dCTP, UTP, XTP, or dTTP, enzyme-dependent synthesis of the corresponding heterodinucleosides (Ap_4N) was observed. ATP γ S and octanoyl-AMP were thus donors of the adenylyl moiety to the intermediate complex, but not adenylyl acceptors, whereas the opposite occurred with the NTPs used. ADP and AMP were not acceptors, as no Ap_3A or Ap_2A was produced. In Fig. 6, chromatograms relative to the synthesis of Ap_4dG , Ap_4C , Ap_4U , Ap_4dC , Ap_4dT , and Ap_4X , from octanoyl-AMP or ATP γ S and the corresponding NTPs, are shown. The rates of synthesis of these heteronucleosides were of the same order of magnitude reported above for the

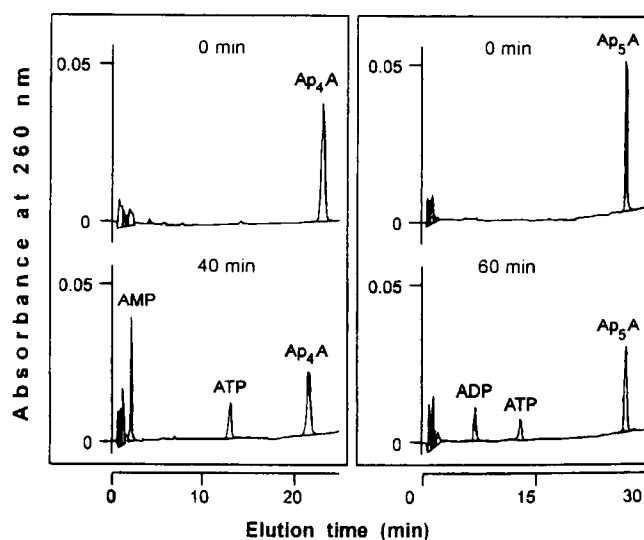


FIG. 4. Effect of asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase on Ap_4A (left panel) or Ap_5A (right panel) obtained from ATP or p_4A , catalyzed by acyl-CoA synthetase. Reaction mixtures containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM $MgCl_2$, and purified (see Materials and Methods) Ap_4A or Ap_5A (33 μ M) were treated with asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase (0.4 or 0.7 mU/ml, respectively). At the times indicated, aliquots were taken and analyzed by HPLC.

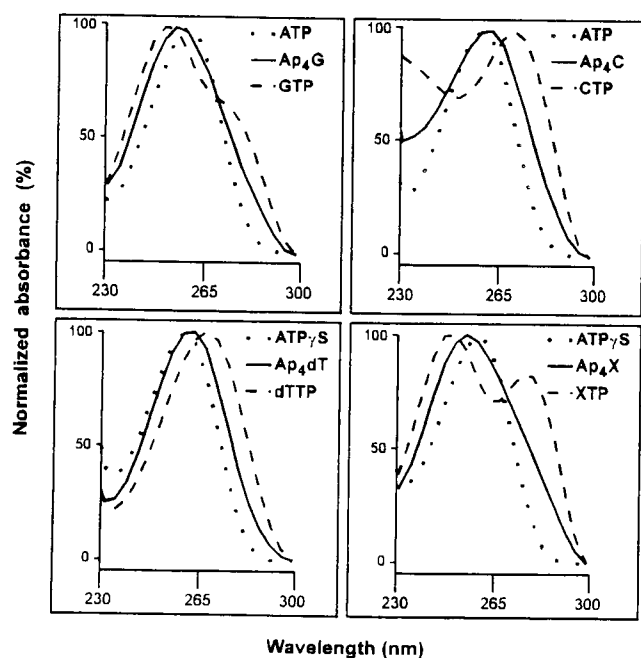


FIG. 5. Spectra of dinucleoside polyphosphates synthesized by acyl-CoA synthetase. Ap_4G and Ap_4C were synthesized as described in Materials and Methods; Ap_4dT and Ap_4X were synthesized as described for Fig. 6. These spectra were obtained with HPLC ChemStation (Hewlett-Packard) from the files produced by the same program during the analysis of the reaction mixtures by HPLC.

synthesis of Ap_4A and Ap_5A . UV spectra for Ap_4dT and Ap_4X are depicted in Fig. 5.

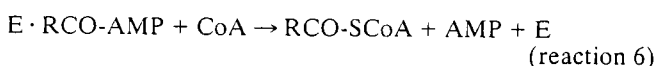
(ix) **Effect of CoA and fatty acids on the synthesis of p_4A .** In preliminary experiments, no effect of fatty acids on the synthesis of p_4A was observed. We therefore tested whether CoA had an effect. Figure 7A shows that addition of 80 μM CoA nearly abolished activity. The inhibition was reversed by addition of palmitic or octanoic acids, but not by the addition of several other compounds, including acetic acid, several amino acids (lysine, methionine, phenylalanine, and tryptophan), or luciferin at threefold-higher concentrations (Fig. 7B). As the amounts of ATP and fatty acids were in excess over CoA, and pyrophosphatase was present, the AMP was formed in stoichiometric amounts with the CoA present. The control assay mixtures were negative for the synthesis of either p_4A or AMP (Fig. 7B).

DISCUSSION

Acyl-CoA synthetase is in many aspects similar to luciferase and seems to fit into the hypothesis put forward in 1990 (17) that enzymes that catalyze the transfer of a nucleotidyl moiety, forming nucleotidyl-containing intermediates and releasing PP_i , may produce dinucleoside polyphosphates. Both enzymes catalyze the synthesis of an intermediate complex ($\text{E} \cdot \text{LH}_2\text{-AMP}$, $\text{E} \cdot \text{AMP}$, or $\text{E} \cdot \text{acyl-AMP}$ [see below]); ATP, dATP, and p_4A , nucleotides with a nonmodified α -phosphate (27, 40), are almost equally good substrates for the formation of these intermediates. In a second step, the adenylyl moiety of the complex is transferred to P_3 or ATP, yielding p_4A or Ap_4A , respectively. This second step is rather unspecific, and any NTP (with an intact terminal PP_i) can accept the adenylyl moiety of the respective enzyme intermediate complex (40). Both enzymes prefer P_3 to ATP as an acceptor substrate (27). In

another respect, both enzymes catalyze the synthesis of acyl-CoA compounds, i.e., fatty acyl-CoA for acyl-CoA synthetase (8, 20) and dehydroluciferyl-CoA for luciferase (2, 11). The similarity in the reactions catalyzed by both enzymes is related to the similarity in the amino acid sequences (1). It should be mentioned that functional similarities among acyl-CoA synthetases, aminoacyl-tRNA synthetases, and luciferase were already envisaged by McElroy et al. in 1967 (25).

Formation of enzyme-bound acetyl-AMP by acetyl-CoA synthetase was demonstrated by Berg (7), who proposed the following mechanism (A) for the synthesis of acetyl-CoA:



This sequence of reactions seems to operate in the activation of both short-chain and medium-chain fatty acids (8, 24, 42). However, the mechanism for long-chain fatty acid activation is not yet clear (4–6, 28, 29, 33) and may follow a mechanism (B) where the split of ATP into AMP and PP_i does not depend on the presence of a fatty acid (28, 29):

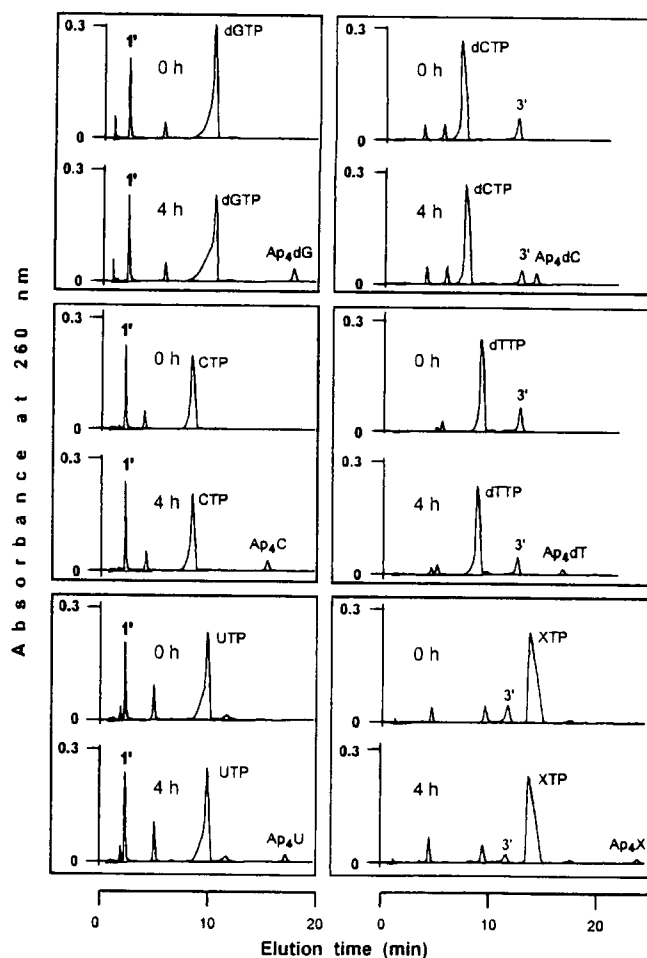


FIG. 6. Synthesis of Ap_4N with octanoyl-AMP (left panels) or $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (right panels) as adenylyl donor. The reaction mixtures (90 μl) contained 50 mM MES-KOH (pH 5.5), 0.1 mM dithiothreitol, 6 mM MgCl_2 , 1 mM octanoyl-AMP (peak 1') or $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (peak 3'), 5 mM NTP, and dialyzed acyl-CoA synthetase (26 μg of protein). At the times indicated, aliquots were withdrawn and analyzed by HPLC.

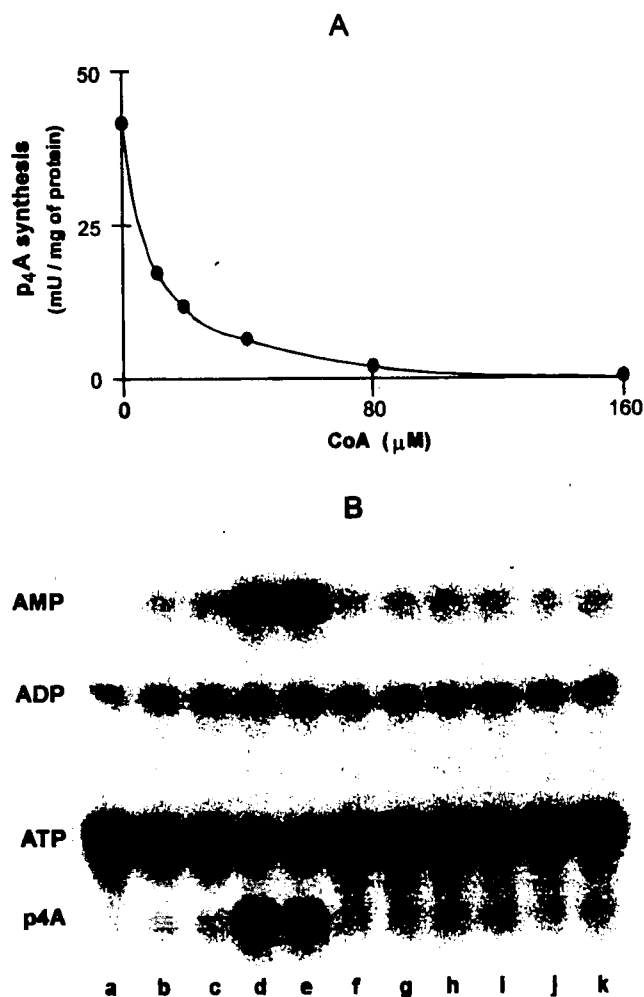


FIG. 7. Effect of CoA and organic acids on the synthesis of p₄A catalyzed by acyl-CoA synthetase. (A) Effect of CoA on the synthesis of p₄A. The reaction mixture (50 μl) contained 50 mM MES-KOH (pH 6.3), 0.1 mM dithiothreitol, 11 mM MgCl₂, 1 mM [2,8-³H]ATP, 10 mM P₃, and the indicated concentrations of CoA and acyl-CoA synthetase (8.3 μg of protein). (B) Effect of organic acids on the inhibitory effect of CoA on the synthesis of p₄A. Reaction mixtures (28 μl) containing 72 mM MES-KOH (pH 6.3), 0.14 mM dithiothreitol, 7.9 mM MgCl₂, 0.76 mM [α-³²P]ATP, 7.2 mM P₃, 0.14 mM CoA, 0.7 μl of desalted inorganic pyrophosphatase, and acyl-CoA synthetase (5.2 μg of protein) were preincubated at 30°C for 20 min. Thereafter, they were supplemented with 12 μl of the following solutions: water (lane b), 1% Triton X-100–5% ethanol (solution C; lane c), 1 mM solutions of palmitic acid in solution C (lane d), octanoic acid in water (lane e), or other possible effectors (acetic acid, lysine, methionine, phenylalanine, tryptophan, and luciferin; lanes f to k, respectively). One hour after the addition of organic acids, aliquots of the reaction were analyzed by TLC. Control without acyl-CoA synthetase is shown in lane a.



Accordingly, the synthesis of p₄A (or Ap₄A) may or may not depend on the presence of an essential effector for the reaction (a fatty acid) resulting from reaction 10 or 11, respectively:



The commercial acyl-CoA synthetase preparations from *P. fragi* catalyze the synthesis of p₄A without addition of fatty acids to the reaction mixture. This synthesis could take place through mechanism A (reaction 10), by using traces of fatty acids present as contaminants in the reaction mixture, or through mechanism B (reaction 11), in which case the presence of fatty acids is not needed. Accordingly, the inhibitory effect of CoA on the synthesis of p₄A (Fig. 7A) and the activator effect of fatty acids (Fig. 7B) added to an assay mixture containing adequate concentrations of CoA could be interpreted in two ways: (i) CoA removes the contaminating fatty acids, essential effectors for the synthesis of p₄A from the assay mixture (reactions 5 and 6), or (ii) CoA sequesters the enzyme in the form of E-CoA (reactions 7 and 8), and the addition of fatty acids, liberating free enzyme (reaction 9), allows the synthesis of p₄A to take place (reaction 11).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Olga González, Isabel de Diego, and Jara Llenas for very able technical assistance.

This work was supported by a grant from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM95/13). R.F. was supported by a Fellowship from Junta Nacional de Investigação Científica and Tecnológica (Portugal).

REFERENCES

1. Abe, T., T. Fujino, R. Fukuyama, S. Minoshima, N. Shimizu, H. Toh, H. Suzuki, and T. Yamamoto. 1992. Human long-chain acyl-CoA synthetase: structure and chromosomal location. *J. Biochem.* 111:123–128.
2. Airth, R. L., W. C. Rhodes, and W. D. McElroy. 1958. The function of coenzyme A in luminescence. *Biochim. Biophys. Acta* 27:519–532.
3. Barnes, L. D., P. N. Garrison, Z. Siprashvili, A. Guranowski, A. K. Robinson, S. W. Ingram, C. M. Croce, M. Ohta, and K. Huebner. 1996. Phit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5'''-P₁, P₃-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 35:11529–11535.
4. Bar-Tana, J., G. Rose, and B. Shapiro. 1972. Microsomal palmitoyl coenzyme A synthetase from rat liver. Partial and exchange reactions. *Biochem. J.* 129:1101–1107.
5. Bar-Tana, J., G. Rose, and B. Shapiro. 1973. Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Isolation of an enzyme-bound intermediate. *Biochem. J.* 135:411–416.
6. Bar-Tana, J., G. Rose, R. Brandes, and B. Shapiro. 1973. Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Mechanism of reaction. *Biochem. J.* 131:199–209.
7. Berg, P. 1956. Acyl adenylates: an enzymatic mechanism of acetate activation. *J. Biol. Chem.* 222:991–1013.
8. Bremer, J., and H. Osmundsen. 1984. Fatty acid oxidation and its regulation, p. 113–154. In S. Numa (ed.), *Fatty acid metabolism and its regulation*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
9. Cameselle, J. C., M. J. Costas, M. A. Günther Sillero, and A. Sillero. 1984. Two low *K_m* hydrolytic activities on dinucleoside 5', 5'''-P₁, P₄-tetraphosphates in rat liver. Characterization as the specific dinucleoside tetraphosphatase and a phosphodiesterase I-like enzyme. *J. Biol. Chem.* 259:2879–2885.
10. Flodgaard, H., and H. Klenow. 1982. Abundant amounts of diadenosine 5', 5'''-P₁, P₄-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *Biochem. J.* 208:737–742.
11. Fontes, R., A. Dukhovich, A. Sillero, and M. A. Günther Sillero. 1997. Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase. Effect of dehydroluciferin, coenzyme A and nucleoside triphosphates on the luminescent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:445–450.
12. Frenkel, E. P., and R. L. Kitchens. 1977. Purification and properties of acetyl coenzyme A synthetase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 252:504–507.
13. Garrison, P. N., and L. D. Barnes. 1992. Determination of dinucleoside polyphosphates, p. 29–61. In A. G. McLennan (ed.), *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
14. Grummt, F. 1978. Diadenosine 5', 5'''-P₁, P₄-tetraphosphate triggers initiation of *in vitro* DNA replication in baby hamster kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:371–375.
15. Guranowski, A., and A. Sillero. 1992. Enzymes cleaving dinucleoside polyphosphates, p. 81–133. In A. G. McLennan (ed.), *Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
16. Guranowski, A., M. A. Günther Sillero, and A. Sillero. 1994. Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. *J. Bacteriol.* 176:2986–2990.
17. Guranowski, A., M. A. G. Sillero, and A. Sillero. 1990. Firefly luciferase synthesizes P₁, P₄-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap₄A) and oth-

- er dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett.* **271**:215–218.
18. Ignarro, L. J., R. A. Gross, and D. M. Gross. 1976. Inhibition of mammalian soluble guanylate cyclase activity by adenosine 5'-tetraphosphate, guanosine 5'-pentaphosphate and other nucleotides. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **2**:337–346.
 19. Jakubowski, H. 1986. Sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:2378–2382.
 20. Kornberg, A., and W. E. Pricer. 1953. Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids. *J. Biol. Chem.* **204**:329–343.
 21. Lee, J. W., I. D. Kong, K. S. Park, and S. W. Jeong. 1995. Effects of adenosine tetraphosphate (ATPP) on vascular tone in the isolated rat aorta. *Yonsei Med. J.* **36**:487–496.
 22. Lobatón, C. D., C. G. Vallejo, A. Sillero, and M. A. G. Sillero. 1975. Diguano-sinetetraphosphatase from rat liver: activity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. *Eur. J. Biochem.* **50**:495–501.
 23. Lundin, A., A. Rickardsson, and A. Thore. 1976. Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal. Biochem.* **75**:611–620.
 24. Mao, L., D. S. Millington, and H. Schulz. 1992. Formation of free acyl adenylate during activation of 2-propylpentanoic acid. Valproyl-AMP: a novel cellular metabolite of valproic acid. *J. Biol. Chem.* **267**:3143–3146.
 25. McElroy, W. D., M. DeLuca, and J. Travis. 1967. Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. *Science* **157**:150–160.
 26. Ogilvie, A. 1992. Extracellular functions for Ap_nA , p. 229–273. In A. G. McLennan (ed.), *Ap_nA and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 27. Ortiz, B., A. Sillero, and M. A. Günther Sillero. 1993. Specific synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine ($n > 4$) catalyzed by firefly luciferase. *Eur. J. Biochem.* **212**:263–270.
 28. Parsons, P., and S. Huang. 1977. Mechanism of action of long chain fatty acyl-CoA ligase from rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **75**:307a.
 29. Philipp, D. P., and P. Parsons. 1979. Kinetic characterization of long chain fatty acyl coenzyme A ligase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**:10785–10790.
 30. Plateau, P., and S. Blanquet. 1992. Synthesis of Np_nN ($n = 3$ or 4) *in vitro* and *in vivo*, p. 63–79. In A. G. McLennan (ed.), *Ap_nA and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 31. Remy, P. 1992. Intracellular functions of Ap_nN : eukaryotes, p. 151–204. In A. G. McLennan (ed.), *Ap_nA and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 32. Rodríguez del Castillo, A., M. Torres, E. G. Delicado, and M. T. Miras-Portugal. 1988. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates - Ap_3A and Ap_5A - in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J. Neurochem.* **51**:1696–1703.
 33. Rose, G., J. Bar-Tana, and B. Shapiro. 1979. Palmitoyl coenzyme A synthetase activation by uncomplexed ATP. *Biochim. Biophys. Acta* **573**:126–135.
 34. Ruiz, A., C. Hurtado, J. M. Ribeiro, A. Sillero, and M. A. Günther Sillero. 1989. Hydrolysis of bis(5'-nucleosidyl)polyphosphates by *Escherichia coli* 5'-nucleotidase. *J. Bacteriol.* **171**:6703–6709.
 35. Schlüter, H., E. Offers, G. Brüggemann, M. van-der-Giet, M. Tepel, E. Nordhoff, M. Karas, C. Spieker, H. Witzel, and W. Zidek. 1994. Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* **367**:186–188.
 36. Sillero, A., and M. A. Günther Sillero. 1989. Purine nucleotide metabolism in *Artemia*, p. 95–111. In T. H. MacRae, J. C. Bagshaw, and A. H. Warner (ed.), *Biochemistry and cell biology of Artemia*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 37. Sillero, M. A. G., and J. C. Cameselle. 1992. Interactions of dinucleoside polyphosphates with enzymes and other proteins, p. 205–228. In A. G. McLennan (ed.), *Ap_nA and other dinucleoside polyphosphates*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
 38. Sillero, M. A. G., M. Del-Valle, E. Zaera, P. Michelena, A. G. García, and A. Sillero. 1994. Diadenosine 5',5''- P^1,P^4 -tetraphosphate (Ap_4A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells. *Biochimie* **76**:404–409.
 39. Sillero, M. A. G., O. Madrid, E. Zaera, and A. Sillero. 1997. 2',3'-Dideoxynucleoside triphosphates (ddNTP) and di-2',3'-dideoxynucleoside tetraphosphates (dd Np_4 ddN) behave differently to the corresponding NTP and Np_4N counterparts as substrates of firefly luciferase, dinucleoside tetraphosphatase and phosphodiesterases. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**:191–199.
 40. Sillero, M. A. G., A. Guranowski, and A. Sillero. 1991. Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase. *Eur. J. Biochem.* **202**:507–513.
 41. Small, G., and C. Cooper. 1966. Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. *Biochemistry* **5**:26–33.
 42. Webster, L. T., and F. Campagnari. 1962. The biosynthesis of acetyl and butyryl adenylates. *J. Biol. Chem.* **237**:1050–1055.
 43. Whitehouse, M., H. Moeksi, and S. Gurin. 1957. The synthesis and biological properties of fatty acyl adenylates. *J. Biol. Chem.* **226**:813–819.
 44. Zamecnik, P. C., and M. L. Stephenson. 1969. Nucleoside pyrophosphate compounds related to the first step in protein synthesis. *Alfred Benzon Found. Symp.* **1**:276–291.
 45. Zamecnik, P. C., M. L. Stephenson, C. M. Janeway, and K. Randerath. 1966. Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **24**:91–97.

2.2 - A sintétase de acil-CoA catalisa a síntese de diadenosina hexafosfato (Ap₆A).

Artigo II

Acyl-CoA synthetase catalyzes the synthesis of
diadenosine hexaphosphate (Ap₆A).

Rui Fontes, María A. Günther Sillero and Antonio Sillero.

Biochimie (1999) 81: 229-233

Acyl-CoA synthetase catalyzes the synthesis of diadenosine hexaphosphate (Ap₆A)

Rui Fontes^a, María A. Günther Sillero^b, Antonio Sillero^{b*}

^a*Serviço de Química Fisiológica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal*

^b*Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC/UAM, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UAM, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain*

(Received 12 October 1998; accepted 7 January 1999)

Abstract — The synthesis of diadenosine hexaphosphate (Ap₆A), a potent vasoconstrictor, is catalyzed by acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi*. In a first step AMP is transferred from ATP to tetrapolyphosphate (P₄) originating adenosine pentaphosphate (p₅A) which, subsequently, is the acceptor of another AMP moiety from ATP generating diadenosine hexaphosphate (Ap₆A). Diadenosine pentaphosphate (Ap₅A) and diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) were also synthesized in the course of the reaction. In view of the variety of biological effects described for these compounds the potential capacity of synthesis of diadenosine polyphosphates by the mammalian acyl-CoA synthetases may be relevant. © Société française de biochimie et biologie moléculaire / Elsevier, Paris

diadenosine hexaphosphate / diadenosine pentaphosphate / dinucleoside polyphosphates / acyl-CoA synthetase / *Pseudomonas fragi*

1. Introduction

Dinucleoside polyphosphates (Np_nN) are molecules of crescent interest in metabolic regulation and cell signaling [1–3]. Diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) is present at (sub)micromolar concentration in all the prokaryotic and eukaryotic tissues examined [4]. The occurrence of Ap₄A, Ap₅A and Ap₆A has been reported in the dense granules of human blood platelets [5–7], in some rat brain synaptic terminals [8, 9] and in chromaffin granules of bovine adrenal medullary gland [10–13]. The concentration of ATP in both the total adrenal medullary tissue and in chromaffin granules is three orders of magnitude higher than that of Ap₄A [13]. Upon liberation from the adrenal medulla, after an appropriate stimulus, the rate of hydrolysis of the secreted ATP is so high that less than 1% remains as ATP, whereas the secreted Ap₄A was apparently degraded at a much slower rate [12, 13]. Probably both ATP and Ap₄A are hydrolyzed by phosphodiesterases [14–16] (and phosphatases and nucleotidases for ATP) located in the outer aspect of cell plasma membranes and the ATP itself could be a competitive inhibitor of the degradation of Ap₄A in the extracellular fluid [12]. For that reason, the use of Ap₄A monitoring as a reliable index of true secretion from chromaffin granules was suggested [12].

The secreted ATP, the diadenosine polyphosphates, and their products of hydrolysis may interact with not yet well defined purine receptors, P_{2X}, P_{2Y}, P_{2D}, P₄ and P₁ [17–20], and modulate a variety of processes such as vascular tone [6, 21–23], cell proliferation [24, 25], cardiac function [26], neurotransmission [17, 27], platelet aggregation [28], glucose metabolism [29, 30], cellular pH [31] and neutrophil function [32].

The potential implication of dinucleoside polyphosphates in the pathogenesis of hypertension and atherosclerosis has been suggested [7, 23] and their longer stability in vivo in relation to ATP have inspired basic research on the potential clinical utility of some chemical analogues [33].

Of special interest in relation to this paper is the strong vasoconstrictor effect reported for diadenosine hexaphosphate (Ap₆A) and diadenosine pentaphosphate (Ap₅A) in the isolated perfused rat kidney at concentrations as low as 1 nM [6]. The synthesis of both Ap₆A and Ap₅A catalyzed by firefly luciferase has been previously reported [34]. However, this enzyme apparently only exists in the lanterns of fireflies and not in mammals. The synthesis of a variety of mono- and dinucleoside polyphosphates, including adenosine tetraphosphate (p₄A), adenosine pentaphosphate (p₅A), Ap₄A, Ap₅A, and various heterodinucleoside tetraphosphates (Ap₄N) by acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* has been recently reported [35]. The object of this report is to present evidence that this enzyme also catalyzes the synthesis of the strong vasoactive diadenosine hexaphosphate (Ap₆A).

* Correspondence and reprints

2. Materials and methods

2.1. Materials

The commercial preparation of *Pseudomonas fragi* acyl-CoA synthetase was from Boehringer Mannheim (catalogue no. 1002406; lot: 94110725). The lyophilized powders were dissolved (3.62 mg/mL) in 25 mM Hepes/KOH (pH 7.6), 0.1 mM dithiothreitol, 5% glycerol and 0.1% bovine serum albumin. Dithiothreitol, ammonium tetrapolyphosphate (P_4) and nucleotides were from Sigma. Bovine serum albumin (fraction V; fatty acids free), phosphodiesterase from *Crotalus durissus* (catalogue no. 108260), alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) from calf intestine (catalogue no. 108138) and inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1) from yeast (catalogue no. 108987) were purchased from Boehringer Mannheim. Asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase was purified from rat liver as described by Sillero et al. [36]. Pyrophosphatase was desalted by ultrafiltration using microconcentrators with exclusion limit membranes of 30 kDa (from Vivascience) [35]. HPLC chromatographs were from Hewlett Packard or from Waters. The Hypersil ODS and Mono Q columns were from Hewlett Packard and Pharmacia, respectively.

2.2. Methods

All the incubations were performed at 30 °C.

2.3. Synthesis of Ap_6A using ATP and P_4 as substrates of acyl-CoA synthetase

The reaction mixture (0.4 mL) contained 50 mM MES-KOH (pH 5.5), 0.1 mM dithiothreitol, 10 mM $MgCl_2$, 4.4 mM ATP, 5 mM P_4 , acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* (0.325 mg protein/mL) and desalted pyrophosphatase (1.2%; v/v). 20 μ L aliquots were withdrawn at various times of incubation at 30 °C, diluted with 180 μ L of water, kept at 100 °C for 90 s, chilled, filtered and analyzed by HPLC using an Hypersil ODS column (100 mm $\times$ 2.1 mm). Elutions were performed at a constant flow rate (0.5 mL/min) with a 20-min linear gradient (5–30 mM) of sodium phosphate (pH 7.5) in 20 mM tetrabutylammonium bromide/20% methanol (buffer A), followed by a 10-min linear gradient (30–100 mM) of sodium phosphate (pH 7.5) in buffer A.

2.4. Purification of the synthesized Ap_6A

Reaction mixtures were set up as described above. After incubation for 40 h they were heated at 100 °C for 90 s, centrifuged, the supernatant brought to pH 7.8 with HEPES-KOH mM and treated with 25 μ g of protein/mL alkaline phosphatase during 2 h. At the end of the incubation, the mixtures were heated at 100 °C for 90 s,

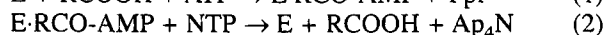
centrifuged and all the supernatant injected into a Mono Q column (0.5 cm $\times$ 5 cm) (Pharmacia) and eluted (HPLC) with 40 min linear NH_4HCO_3 gradient (0.5–0.7 M). The fractions containing the presumed Ap_6A were pooled, an aliquot was rechromatographed in the same conditions to establish the purity of the pool, and the rest concentrated by lyophilization.

2.5. Characterization of the synthesized Ap_6A . Phosphodiesterase treatment

The reaction mixture (0.17 mL) contained 15 μ M of purified Ap_6A , 50 mM HEPES-KOH (pH 7.2) and commercial phosphodiesterase of *Crotalus durissus* (2.4 μ g of protein/mL). Asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase treatment: the reaction mixture (0.28 mL) contained 12 μ M of purified Ap_6A , 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM $MgCl_2$ and rat liver asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase (0.04 mU/mL). Aliquots were taken at various times of incubation and analyzed by HPLC using an Hypersil ODS column (100 mm $\times$ 4.6 mm) and eluting with 30 mM sodium phosphate (pH 7.5) in 20 mM tetrabutylammonium bromide/20% methanol. The products have been identified by co-elution with appropriate standards.

3. Results and discussion

Although in our view the mechanism of reaction of acyl-CoA synthetase is not yet completely clarified, here it is assumed that the synthesis of Ap_4N takes place through reactions (1) and (2), with the trace amounts of fatty acid needed being supplied by the proper enzyme preparation or by other component of the reaction mixture (see reference [35]).



ATP is the preferred substrate for reaction (1) [35]. The second step is rather unspecific and all the nucleoside triphosphates tested were acceptors of the AMP moiety of the intermediate complex giving rise to a variety of heterodinucleoside polyphosphates (Ap_4N) [35]. Tri- and tetrapolyphosphates (P_3 and P_4) are also acceptor substrates for the synthesis of p_4A and p_5A , respectively [35]. The synthesis of Ap_6A could be approached using ATP and p_5A as donor and acceptor of AMP, respectively. Unfortunately, p_5A is not commercially available. However, as the enzyme synthesizes p_5A from ATP and P_4 [35], a reaction mixture containing ATP and P_4 was set up as described in *Materials and methods* and analyzed by HPLC after different periods of incubation. As expected, a compound corresponding to p_5A (figure 1, peak 5) was firstly synthesized increasing in the first 24 h of reaction and decreasing thereafter. In the first 12 h of incubation

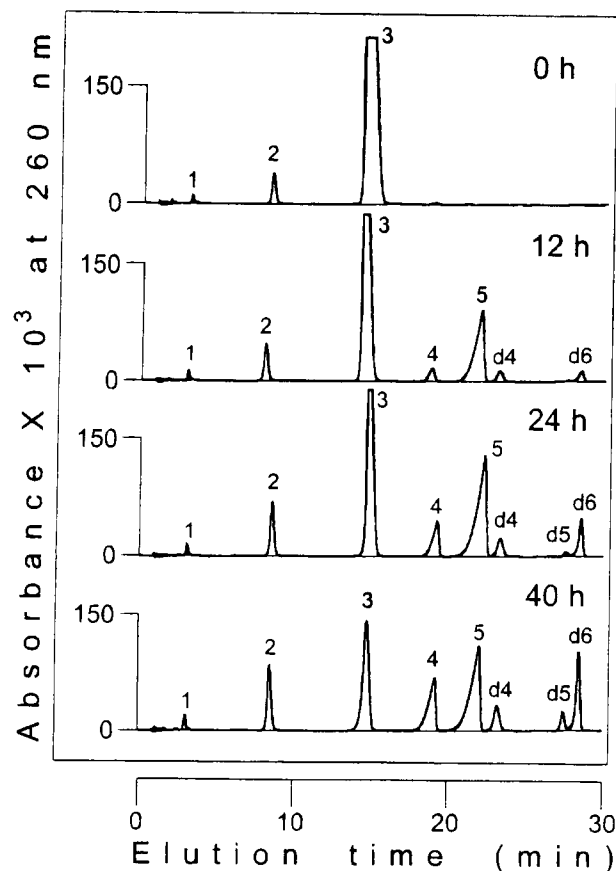


Figure 1. Synthesis of diadenosine hexaphosphate (Ap_6A) using ATP and P_4 as substrates of acyl-CoA synthetase. The reaction mixture was set up and, at the indicated times of incubation, aliquots taken and analyzed (see *Materials and methods*). Peaks 1, 2, 3, 4 and 5 correspond to AMP, ADP, ATP, p_4A and p_5A , respectively; peaks d4, d5 and d6 correspond to diadenosine tetraphosphate, pentaphosphate and hexaphosphate, respectively.

the average rate of synthesis of p_5A was 4.2 mU/mg of protein; its concentration was 1.0 mM and 1.3 mM at time 12 h and 24 h, respectively. A new peak (peak d6), corresponding presumably to Ap_6A , appeared along the time of incubation. Between time 12 h and 24 h of incubation the average rate of synthesis of Ap_6A was 0.40 mU/mg of protein and its concentration increased from 51 μM to 144 μM during that time. Synthesis of Ap_4A (peak d4) was also observed due to the dual role of ATP as donor and acceptor of adenylate (figure 1). p_4A (peak 4) and Ap_5A (d5) were also synthesized due to the P_3 present as product of hydrolysis or contaminating the P_4 preparations (figure 1). In a control without enzyme only a partial hydrolysis of ATP into ADP (peak 2) and AMP (peak 1) was observed (results not shown).

The synthesized Ap_6A was characterized by its UV spectrum, co-elution with commercial Ap_6A and by treatment with hydrolytic enzymes. For that, reaction mixtures similar to the one reported above were treated with alkaline phosphatase and, by chromatography on a Mono Q column (see *Materials and methods*), peaks corresponding to adenosine, Ap_4A , Ap_5A and Ap_6A were separated (not shown). Fractions containing the presumed Ap_6A

were joined and the purity of the pool checked as described in *Materials and methods*. The remaining of the pool was frozen, dried in vacuum, and a volume of 0.23 mL of 146 μM Ap_6A was obtained. The purified Ap_6A was treated with commercial phosphodiesterase from *Crotalus durissus* or with asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase (see *Materials and methods*). Upon phosphodiesterase treatment formation of AMP and p_5A was firstly observed and upon asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase treatment the only product of hydrolysis was ATP (figure 2).

Here we have shown that acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyzes, in vitro, the synthesis of Ap_6A , Ap_5A and Ap_4A . It has been hypothesized that the enzymes (mainly synthetases and some transferases) able to form an adenylyl intermediate with simultaneous liberation of PPi in the course of the enzyme mechanism would be able to synthesize Ap_4N [37]. Probably, these enzymes could also be able to catalyze, at least in vitro, the synthesis of p_4A , p_5A , Ap_5A and Ap_6A . It is known since 1966 that certain aminoacyl-tRNA synthetases catalyze the synthesis of Ap_4A using ATP as adenylyl donor and acceptor [38]; it has also been reported that in the

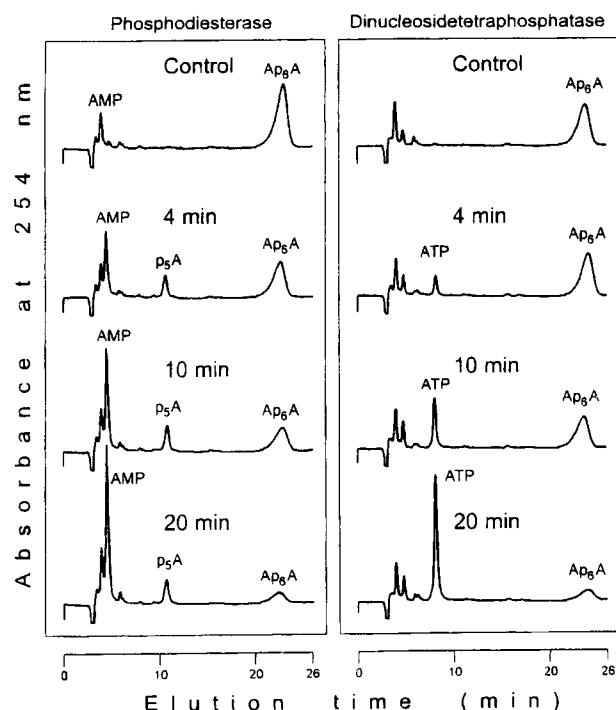


Figure 2. Characterization of diadenosine hexaphosphate (Ap_6A) by treatment with phosphodiesterase (left panel) or asymmetrical dinucleoside tetraphosphatase (right panel). The reaction mixtures were set up and, at the indicated times of incubation, aliquots taken and analyzed (see *Materials and methods*). The products were identified by co-elution with appropriate standards.

presence of ATP and P_3 lysyl-tRNA synthetase from *E. coli* can catalyze the synthesis of p_4A [39]. The synthesis of p_4A or p_5A from ATP and P_3 or P_4 , respectively, has been shown to be catalyzed by yeast acetyl-CoA synthetase [40] and firefly luciferase [34]. The possibility that, in vivo, the synthesis of Ap_3A and Ap_6A takes place through the mechanism shown to be possible in vitro (this work) is, at present, somewhat speculative and implies the simultaneous presence of those enzymes, the adequate adenylyl donor ATP and an adequate adenylyl acceptor (p_4A and p_5A or P_3 and P_4) in a particular microenvironment of the cell. Actually, p_4A is present in horse and rabbit muscle [41] and in adrenal medullary gland [13]. The occurrence of polyphosphates in mammalian tissues has also been reported [42, 43].

The in vivo relative contributions to the synthesis of Ap_6A of the different enzymes able to catalyze in vitro the synthesis dinucleoside polyphosphates is beyond the objectives of this paper. From data presented above and in a previous paper [35] it can be inferred that the activity of synthesis of Ap_6A catalyzed by acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* would be three to four orders of

magnitude lower than the activity of synthesis of palmitoyl-CoA. Similar orders of magnitude for the synthesis of Ap_4A compared to that of aminoacyl-tRNA has also been observed in the cases of valyl and methionyl-tRNA synthetases from *E. coli* and, however, this low activity did not precluded the induction of in vivo increase concentration of Ap_4N by over expression of these enzymes [44]. Acyl-CoA synthetases have been described in the membranes of rat liver peroxisomes, endoplasmic reticulum and mitochondria [45–47]. The association of acyl-CoA synthetases with membranous material supports the speculation that these enzymes could be involved in the synthesis of diadenosine polyphosphates in chromaffin granules and in synaptic terminals of the nervous system.

Acknowledgments

We thank Isabel de Diego for very able technical assistance. This work was supported by a grant from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM95/13). R.F. was supported by a Fellowship from Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (Portugal).

References

- [1] McLennan A.G., Ap_4A and Other Dinucleoside Polyphosphates, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.
- [2] Kisselev L.L., Justesen J., Wolfson A.D., Frolova L.Y., Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signalling molecules?, FEBS Lett. 427 (1998) 157–163.
- [3] Baxi M.D., Vishwanatha J.K., Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance, J. Pharmacol. Toxicol. Methods 33 (1995) 121–128.
- [4] Garrison P.N., Barnes L.D., Determination of dinucleoside polyphosphates, in: McLennan A.G. (Ed.), Ap_4A and Other Dinucleoside Polyphosphates, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, pp. 29–61.
- [5] Flodgaard H., Klenow H., Abundant amounts of diadenosine 5',5''- P_1 , P_4 -tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets, Biochem. J. 208 (1982) 737–742.
- [6] Schlüter H., Offers E., Bruggemann G., van der Giet M., Tepel M., Nordhoff E., Karas M., Spieker C., Witzel H., Zidek W., Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure, Nature 367 (1994) 186–188.
- [7] Schlüter H., Grobota I., Bachmann J., Kaufmann R., van der Giet M., Tepel M., Nofer J.R., Assmann G., Karas M., Jankowski J., Zidek W., Adenosine (5') oligophospho (5') guanosines and guanosine (5') oligophospho (5') guanosines in human platelets, J. Clin. Invest. 101 (1998) 682–688.
- [8] Pintor J., Díaz-Rey M.A., Torres M., Miras-Portugal M.T., Presence of diadenosine polyphosphates (Ap_4A and Ap_5A) in rat brain synaptic terminals. Ca^{2+} dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine, Neurosci. Lett. 136 (1992) 141–144.
- [9] Pintor J., Porras A., Mora F., Miras-Portugal M.T., Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates (Ap_4A and Ap_5A) from caudate putamen of conscious rat, Neurosci. Lett. 150 (1993) 13–16.

- [10] Rodríguez del Castillo A., Torres M., Delicado E.G., Miras-Portugal M.T., Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates (Ap₄A and Ap₅A) in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules, *J. Neurochem.* 51 (1988) 1696–1703.
- [11] Pintor J., Rotllán P., Torres M., Miras-Portugal M.T., Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release, *Anal. Biochem.* 200 (1992) 296–300.
- [12] Castillo C.J., Moro M.A., Del Valle M., Sillero A., García A.G., Günther Sillero M.A., Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla, *J. Neurochem.* 59 (1992) 723–732.
- [13] Sillero M.A.G., Del Valle M., Zaera E., Michelena P., García A.G., Sillero A., Diadenosine 5',5''-P₁, P₄-tetraphosphate (Ap₄A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells, *Biochimie* 76 (1994) 404–409.
- [14] Gasmi L., Cartwright J.L., McLennan A.G., The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I, *Biochim. Biophys. Acta* 405 (1998) 121–127.
- [15] Cameselle J.C., Costas M.J., Gunther-Sillero M.A., Sillero A., Two low *K_m* hydrolytic activities on dinucleoside 5',5''-P₁, P₄-tetraphosphates in rat liver. Characterization as the specific dinucleoside tetraphosphatase and a phosphodiesterase I-like enzyme, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 2879–2885.
- [16] Guranowski A., Sillero A., Enzymes cleaving dinucleoside polyphosphates, in: McLennan A.G. (Ed.), *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, pp. 81–133.
- [17] Pintor J., Miras-Portugal M.T., P₂ purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system, *Gen. Pharmacol.* 26 (1995) 229–235.
- [18] Edgecombe M., McLennan A.G., Fisher M.J., Characterization of the binding of diadenosine 5',5''-P₁, P₄-tetraphosphate (Ap₄A) to rat liver cell membranes, *Biochem. J.* 314 (1996) 687–693.
- [19] Rodríguez-Pascual F., Cortes R., Torres M., Palacios J.M., Miras-Portugal M.T., Distribution of [³H]diadenosine tetraphosphate binding sites in rat brain, *Neuroscience* 77 (1997) 247–255.
- [20] Ralevic V., Burnstock G., Receptors for purines and pyrimidines, *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 413–492.
- [21] Ralevic V., Hoyle C.H., Burnstock G., Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries, *J. Physiol.* 483 (1995) 703–713.
- [22] Davies G., MacAllister R.J., Bogle R.G., Vallance P., Effect of diadenosine phosphates on human umbilical vessels: novel platelet-derived vasoconstrictors, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 40 (1995) 170–172.
- [23] Schlüter H., Tepel M., Zidek W., Vascular actions of diadenosine phosphates, *J. Auton. Pharmacol.* 16 (1996) 357–362.
- [24] Heidenreich S., Tepel M., Schlüter H., Harrach B., Zidek W., Regulation of rat mesangial cell growth by diadenosine phosphates, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2862–2867.
- [25] Schulze-Lohoff E., Zanner S., Ogilvie A., Sterzel R.B., Vasoactive diadenosine polyphosphates promote growth of cultured renal mesangial cells, *Hypertension* 26 (1995) 899–904.
- [26] Vahlensieck U., Boknik P., Knapp J., Linck B., Muller F.U., Neumann J., Herzig S., Schlüter H., Zidek W., Deng M.C., Scheld H.H., Schmitz W., Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (Ap₆A) via A1-adenosine receptors, *Br. J. Pharmacol.* 119 (1996) 835–844.
- [27] Panchenko V.A., Pintor J., Tsyndrenko A.Y., Miras-Portugal M.T., Krishtal O.A., Diadenosine polyphosphates selectively potentiate N-type Ca²⁺ channels in rat central neurons, *Neuroscience* 70 (1996) 353–360.
- [28] Ogilvie A., Extracellular functions of ApnA, in: McLennan A.G. (Ed.), *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, pp. 229–273.
- [29] Craik K.M., McLennan A.G., Fisher M.J., Adenine dinucleotide-mediated activation of glycogen phosphorylase in isolated liver cells, *Cell. Signal.* 5 (1993) 89–96.
- [30] Edgecombe M., Craddock H.S., Smith D.C., McLennan A.G., Fisher M.J., Diadenosine polyphosphate-stimulated gluconeogenesis in isolated rat proximal tubules, *Biochem. J.* 32 (1997) 451–456.
- [31] Schlatter E., Haxelmans S., Ankorina I., Kleta R., Regulation of Na⁺/H⁺ exchange by diadenosine polyphosphates, angiotensin II, and vasopressin in rat cortical collecting duct, *J. Am. Soc. Nephrol.* 6 (1995) 1223–1229.
- [32] Gasmi L., McLennan A.G., Edwards S.W., Neutrophil apoptosis is delayed by the diadenosine polyphosphates, Ap₅A and Ap₆A: synergism with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, *Br. J. Haematol.* 95 (1996) 637–639.
- [33] Chan S.W., Gallo S.J., Kim B.K., Guo M.J., Blackburn G.M., Zamecnik P.C., P₁, P₄-dithio-P₂, P₃-monochloromethylene diadenosine 5',5''-P₁, P₄-tetraphosphate: a novel antiplatelet agent, *Eur. J. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4034–4039.
- [34] Ortiz B., Sillero A., Günther Sillero M.A., Specific synthesis of adenosine (5') tetraphospho (5') nucleoside and adenosine (5') oligophospho (5') adenosine (*n* > 4) catalyzed by firefly luciferase, *Eur. J. Biochem.* 212 (1993) 263–270.
- [35] Fontes R., Günther Sillero M.A., Sillero A., Acyl coenzyme A synthetase from *Pseudomonas fragi* catalyses the synthesis of adenosine 5'-polyphosphates and dinucleoside polyphosphates, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 3152–3158.
- [36] Sillero M.A.G., Madrid O., Zaera E., Sillero A., 2',3'-dideoxynucleoside triphosphates (ddNTP) and di-2',3'-dideoxynucleoside tetraphosphates (ddNp₄ddN) behave differently to the corresponding NTP and Np₄N counterparts as substrates of firefly luciferase, dinucleoside tetraphosphatase and phosphodiesterases, *Biochim. Biophys. Acta* 1334 (1997) 191–199.
- [37] Guranowski A., Sillero M.A.G., Sillero A., Firefly luciferase synthesizes P₁, P₄-bis(5'-adenosyl) tetraphosphate (Ap₄A) and other dinucleoside polyphosphates, *FEBS Lett.* 271 (1990) 215–218.
- [38] Plateau P., Blanquet S., Synthesis of NpnN (*n*=3 or 4) in vitro or in vivo, in: McLennan A.G. (Ed.), *Ap₄A and Other Dinucleoside Polyphosphates*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992, pp. 63–79.
- [39] Zamecnik P.C., Stephenson M.L., A possible regulatory site located at the gateway to protein synthesis, in: Lamborg M.R., Kenney F.T. (Eds.), *Regulatory mechanism for protein synthesis in mammalian cells*, Academic Press, San Pietro, New York, 1968, pp. 3–16.
- [40] Guranowski A., Günther Sillero M.A., Sillero A., Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 2986–2990.
- [41] Small G., Cooper C., Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate, *Biochemistry* 5 (1966) 26–33.
- [42] Wood H.G., Clark J.E., Biological aspects of inorganic polyphosphates, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 235–260.
- [43] Kumble K.D., Kornberg A., Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 5818–5822.
- [44] Brevet A., Chen J., Lévêque F., Plateau P., Blanquet S., In vivo synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap₄N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 8275–8279.
- [45] Singh H., Poulos A., Distinct long chain and very long chain fatty acyl CoA synthetases in rat liver peroxisomes and microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 266 (1988) 486–495.
- [46] Miyazawa S., Hashimoto T., Yokota S., Identity of long-chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria, and peroxisomes in rat liver, *J. Biochem. (Tokyo)* 98 (1985) 723–733.
- [47] Hesler C.B., Olymbios C., Haldar D., Transverse-plane topography of long-chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6600–6605.

2.3 - Efeito da desidroluciferina, coenzima A e nucleosídeos trifosfatados na reacção luminescente. Síntese da desidroluciferina pela luciférase de pirilampo.

Artigo III

Effect of dehydroluciferin, coenzyme A and
nucleoside triphosphates on the luminescent reaction.
Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase.

Rui Fontes, Alexey Dukhovich, Antonio Sillero, and
Maria A. Günther Sillero.

Biochem Biophys Res Comm (1997) 237: 445-450

Synthesis of Dehydroluciferin by Firefly Luciferase: Effect of Dehydroluciferin, Coenzyme A and Nucleoside Triphosphates on the Luminescent Reaction

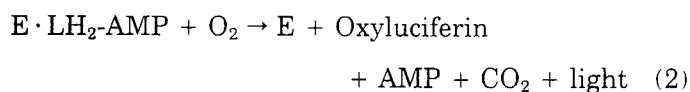
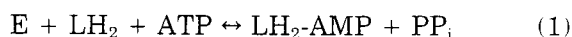
Rui Fontes,* Alexey Dukhovich, Antonio Sillero, and Maria A. Günther Sillero¹

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas del CSIC, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain; and *Serviço de Química Fisiológica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal*

Received July 18, 1997

The formation of dehydroluciferin (L) from luciferin (LH₂) in the reaction catalyzed by firefly luciferase (EC 1.13.12.7) has been studied. The E·LH₂-AMP complex may follow two different pathways: towards production of light and towards the synthesis of the E·L-AMP complex. This last step has an inhibitory effect on light emission as molecules of the enzyme are trapped in a light unproductive complex. The effects of CoA and nucleoside 5'-triphosphates (NTPs) on light emission are quantitatively different. CoA combines with the L moiety of the E·L-AMP complex, yielding L-CoA, promoting liberation of free luciferase, and increasing light yield. NTP reacts with the AMP moiety of the same complex, generating adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside (Ap₄N) and, probably, the E·L complex and scarcely increasing light production. The results are discussed in relation to previous reports, by others, on luciferase. © 1997 Academic Press

The luminescent reaction catalyzed by firefly luciferase (EC 1.13.12.7) is classically written according to the following scheme:

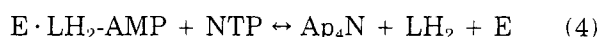


¹ Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, Madrid, 28029 Spain. Fax: 34-1-3975353. E-mail: magunther@iib.uam.es.

Abbreviations used: Ap₄A, adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine or diadenosine tetraphosphate; Ap₄N, adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside; E, luciferase; LH₂, D-luciferin; L, dehydroluciferin; LH₂-AMP, luciferyl-adenylate; L-AMP, dehydroluciferyl-adenylate; NTP, nucleoside 5'-triphosphate; RLU, relative light units.

The light emission starts with an initial flash that either is maintained during a particular period of time or decays in few seconds (minutes) to a low basal level. Depending on the relative concentration of luciferase, luciferin, ATP and the nature of the buffer and metals present, almost any type of kinetic can be obtained (1) that oscillates between the two extremes mentioned above. The inhibition of light emission was explained by the formation of a very efficient inhibitor(s) mainly oxyluciferin, dehydroluciferin (L), or other oxidative products (X) of luciferin (LH₂), either by themselves or forming E·X-AMP complexes (2,3,4). A different explanatory model for the luciferase luminescent reaction has been recently forwarded (5). In our view the kinetic of the reaction is not yet fully understood.

Firefly luciferase catalyzes the synthesis of a variety of dinucleoside polyphosphates, mainly adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (Ap₄A) and adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside (Ap₄N) (equations 3 and 4) (6,7); dehydroluciferin can substitute for luciferin in this reaction, which is greatly accelerated in the presence of pyrophosphatase (8):



To follow the synthesis of Ap₄N relatively high concentrations of luciferase, luciferin and ATP were used (6,7). These conditions, although far away from the usual ones currently used in kinetic experiments of light emission, showed a significant synthesis of dehydroluciferin from luciferin. The object of this paper is to present the evidence for this synthesis and to propose a new scheme for the luciferase catalyzed reaction in which the formation of the E·L-AMP complex may be a factor responsible for the decline of light emission after the initial flash.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Luciferase from firefly (*Photinus pyralis*) was purchased from Sigma (catalogue no. L-5226). A stock solution (4.5 mg of protein/ml) of luciferase was dissolved in 0.5 M Hepes/KOH (pH 7.5). D-luciferin (LH_2), ATP, CTP, UTP and CoA were obtained from Sigma. Dehydroluciferin (L) was prepared from D-luciferin as previously described (9,10). Polygram Cel 300 UV₂₅₄ fluorescent chromatographic plates were purchased from Macherey-Nagel (Germany). Fluorescence was measured in a Perkin Elmer Luminescence Spectrometer (LS 50). Bioluminescence was followed with a luminometer (Optocomp 1) from Celsis Ltd.

Methods. In the experiments performed to measure light production the reaction mixtures contained in a final volume of 0.15 ml: 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM ATP, 10 μM luciferin and luciferase (6.7 μg of protein). The reaction was initiated with the injection of 0.1 ml of 15 μM luciferin and the luminometer was physically modified in order to reduce the light reaching the photomultiplier tube. The light was integrated every 0.1 s for 10 s.

When the analysis of the reaction mixture was performed by thin layer chromatography (TLC) aliquots of 5 μl were spotted onto the plates, eluted with a solution of 95% ethanol and 1 M ammonium acetate (7:3), and the fluorescent spots visualized using light at a wavelength of 366 nm. All the experiments were run at room temperature.

RESULTS

Formation of dehydroluciferin (dehydroluciferyl-adenylate) in the firefly luciferase catalyzed reaction. Reaction mixtures of 0.02 ml were set up containing high concentrations of luciferin (0.1 mM), ATP (1 mM) and luciferase (22.5 μg of protein). At the times indicated (5 sec, 10 min and 1 h), the reaction mixtures were heated in boiling water for 1 min and analyzed by TLC as indicated in Methods (Fig. 1, lanes 4, 5, 6, respectively). The spot corresponding to luciferin diminished along the time of reaction and practically disappeared after 1 h of incubation. The disappearance of luciferin was accompanied by the appearance of a different spot migrating slower, and at the same position as a marker of chemically synthesized dehydroluciferin. Controls with inactivated luciferase or without ATP (Fig. 1, lanes 3 and 7 respectively) did not show any visible synthesis of dehydroluciferin. The spot of the presumed dehydroluciferin obtained after 1 h of incubation was eluted from the TLC plate and its absorption and emission spectra of fluorescence determined (Fig. 2). They were indistinguishable from those of the chemically synthesized dehydroluciferin, and in good agreement with previous data for this compound (2, 9, 11).

Dehydroluciferin, although unable to support light production, is a good substrate for the synthesis of both E·L-AMP (12) and Ap_4A (13). It seems then that dehydroluciferin, once formed, could exist in the reaction mixture in the form of E·L-AMP.

Kinetics of light production in the absence or presence of dehydroluciferin (dehydroluciferyl-adenylate). The production of light in experimental conditions where the concentrations of enzyme and substrates are high

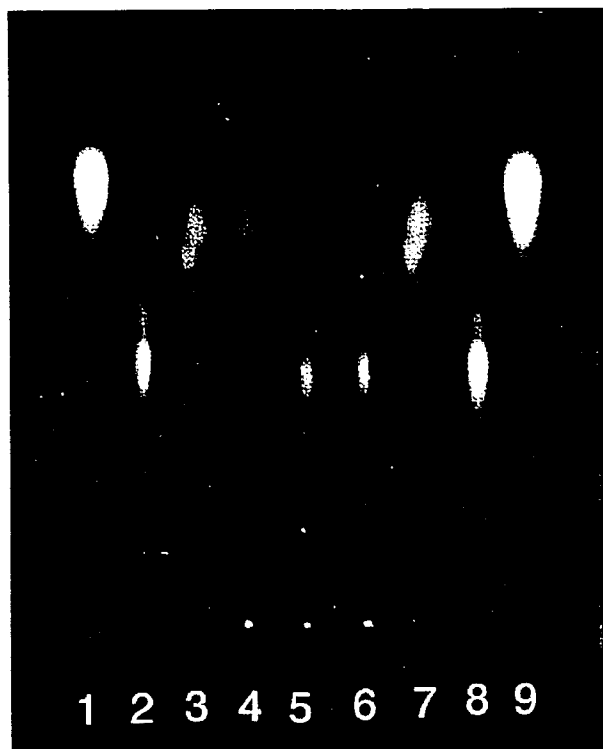


FIG. 1. Synthesis of dehydroluciferin by firefly luciferase. Reaction mixtures containing, in a final volume of 0.02 ml, 150 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 2 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 0.1 mM luciferin and luciferase (22.5 μg of protein) were incubated for 5 s (lane 4), 10 min (lane 5) or 1 h (lane 6) and after heat inactivation aliquots spotted onto TLC plates (see Methods). Reaction mixtures incubated during 10 min and containing heat inactivated luciferase (lane 3) or no ATP (lane 7) were run in parallel and treated as above. Luciferin standard (lanes 1 and 9); chemically synthesized dehydroluciferin (lanes 2 and 8).

can not be measured unless the sensitivity of the luminometer is decreased. For this purpose an inner mirror located in the reaction chamber, was rotated in such a way that less than 1% of the generated light could reach the photomultiplier tube. In this way, the kinetics of the reaction could be followed in a wide range of experimental conditions (Figs. 3 and 4).

Reactions mixtures, set up as described in Methods, were preincubated for 3 min with increasing amounts of dehydroluciferin before the light production was initiated with the injection of luciferin. The final concentrations of dehydroluciferin varied between zero and 2.5 μM (Fig. 3). In the absence of dehydroluciferin, the reaction produced an initial flash followed by a decrease in light emission. As the concentration of dehydroluciferin increased the amount of light produced in the first 10 s decreased hyperbolically approaching zero. In the conditions of the experiment the concentration of dehydroluciferin producing half the light of the control was estimated as 0.07 μM (Fig. 3). In separate experiments without preincubation, where the reaction mixture contained 10 μM LH_2 and 2.5 μM L, the light

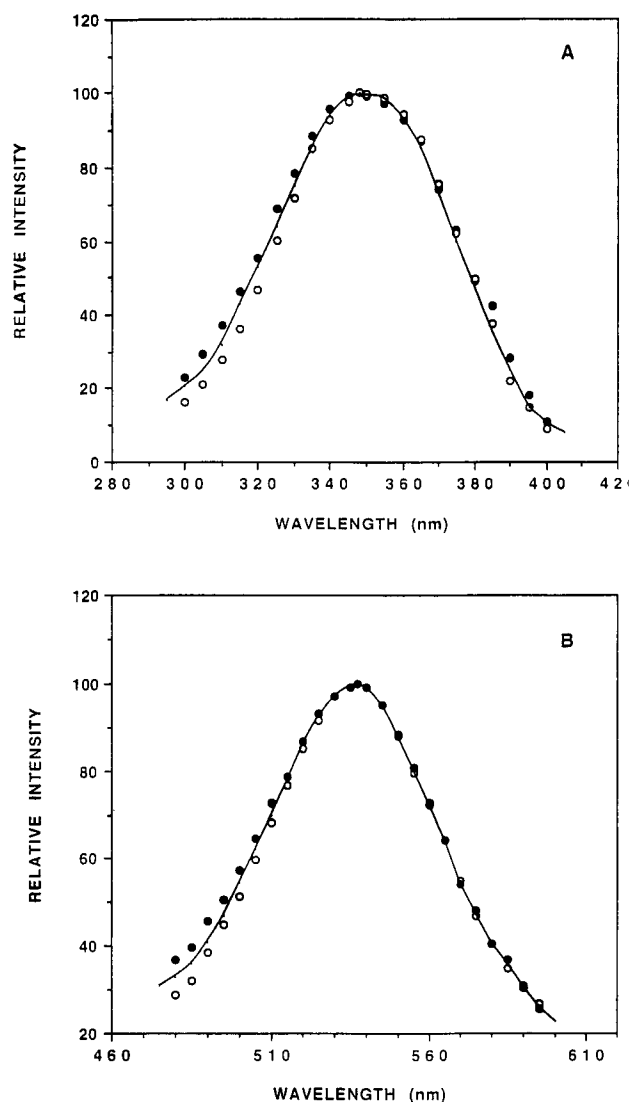


FIG. 2. Fluorescence absorption (A) and emission spectra (B) of enzymatically (closed circles) and chemically synthesized dehydroluciferin (open circles). The spectra were measured, in 50 mM Hepes/KOH (pH 6.0), with emission wavelength 537 nm (A) and excitation wavelength 348 nm (B) and were normalized to relative intensity equal to 100 at peak absorption and peak emission respectively.

emitted for the first 2 s was 24% of that emitted by a control without L (not shown). In comparison, when L was preincubated with the enzyme the light emitted for the first 2 s was only 1% of the corresponding control (Fig. 3).

The effect of CoA and nucleoside 5'-triphosphates on the time course of the luciferase catalyzed reaction. It was reported that CoA (14-16) and different nucleotides (16-18) were able to influence the luminescent reaction. Based on those reports and on the results presented above, the effect of CoA and two nucleotides (UTP and CTP) on the enzyme was approached in the following way.

Reactions mixtures, set up as described in Methods, were preincubated for 3 min with dehydroluciferin and different concentrations of UTP, CTP or CoA before the injection of luciferin (Fig. 4). The standard reaction (without dehydroluciferin) gave the usual flash of light followed by a decrease in luminescence. When the standard reaction was supplemented with 2.5 μ M dehydroluciferin, a sharp decline in light emission was produced, confirming results from Fig. 3. If the reaction mixture containing luciferin and dehydroluciferin was supplemented with CTP or UTP a concentration dependent slight increment of light emission was observed. By the contrary, addition of CoA produced a big increase in the registered luminescence (Fig. 4).

The products of the luciferase catalyzed reaction, in the absence and in the presence of CoA (0.25 mM), UTP or CTP (0.5 mM) were also analyzed by thin layer chromatography after 15 s, 3 and 6 min of incubation (Fig. 5). In the absence of effectors, the appearance of the spot corresponding to dehydroluciferin was seen after 15 s of incubation increasing its intensity with time of incubation. The presence of UTP or CTP does not seem to appreciably affect the amount of dehydroluciferin formed in relation to the control. However, in the presence of CoA, dehydroluciferin was not detected but a new spot, probably corresponding to L-CoA (or LH_2 -CoA), is appreciated near the origin and increased with time. A spot with the same mobility was produced after incubation of chemically synthesized dehydroluciferin in the presence of CoA, ATP and luciferase (results not shown).

DISCUSSION

These experiments were started aiming to investigate the mechanism of synthesis of Ap_4A from ATP by firefly luciferase. For that, high concentrations of luciferase, luciferin and ATP were used (6,7) and in these conditions, the synthesis of dehydroluciferin was easily detected by thin layer chromatography (Fig. 1). As its synthesis is ATP and luciferase dependent, we presume that the $\text{E} \cdot \text{L-AMP}$ complex could be formed by oxidation of the luciferin moiety of the $\text{E} \cdot \text{LH}_2\text{-AMP}$ complex. The formation of oxyluciferin and light production may take place simultaneously with the synthesis of the $\text{E} \cdot \text{L-AMP}$ complex. To test the effect of dehydroluciferin on light emission, reaction mixtures were preincubated for 3 min in the presence of enzyme, ATP and variable amounts of L, prior to the addition of LH_2 . When the concentrations of LH_2 and L were, respectively, 10 and 2.5 μ M, the yield of light was around 1% of the control without dehydroluciferin (Fig. 3). These results can be interpreted as if L-AMP is so tightly bound to the enzyme that can be partially liberated only with an excess of luciferin. The dissociation constant for the $\text{E} \cdot \text{L-AMP}$ complex is, according

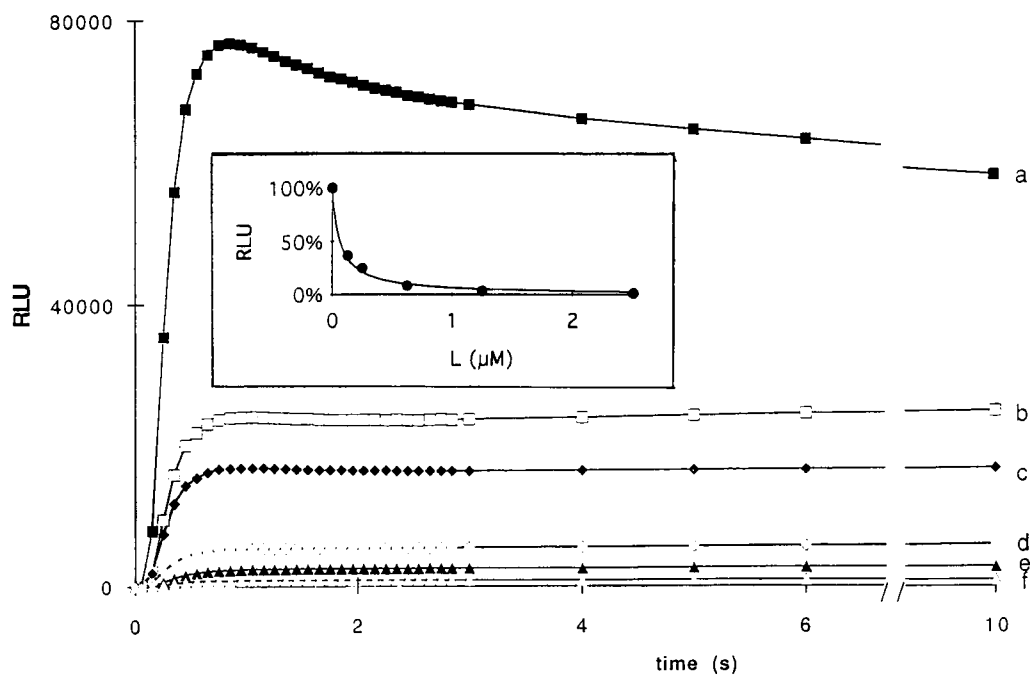


FIG. 3. Light production in the absence and in the presence of dehydroluciferin. The reaction mixtures contained in a final volume of 0.15 ml: 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, 10 μM luciferin and luciferase (6.7 μg of protein). When indicated the reaction mixtures were supplemented with dehydroluciferin (L) and preincubated for 3 min before the injection of 0.1 ml of 15 μM luciferin which initiated the light producing reaction. After the injection of luciferin the final concentrations (μM) of dehydroluciferin were zero (a), 0.13 (b), 0.25 (c), 0.63 (d), 1.25 (e) and 2.5 (f). The light was integrated every 0.1 s for 10 s. Each of the curves shown is the average of 4 (no added dehydroluciferin) or 3 experiments. The insert shows the light measured in the first 10 s at the different concentrations of dehydroluciferin used.

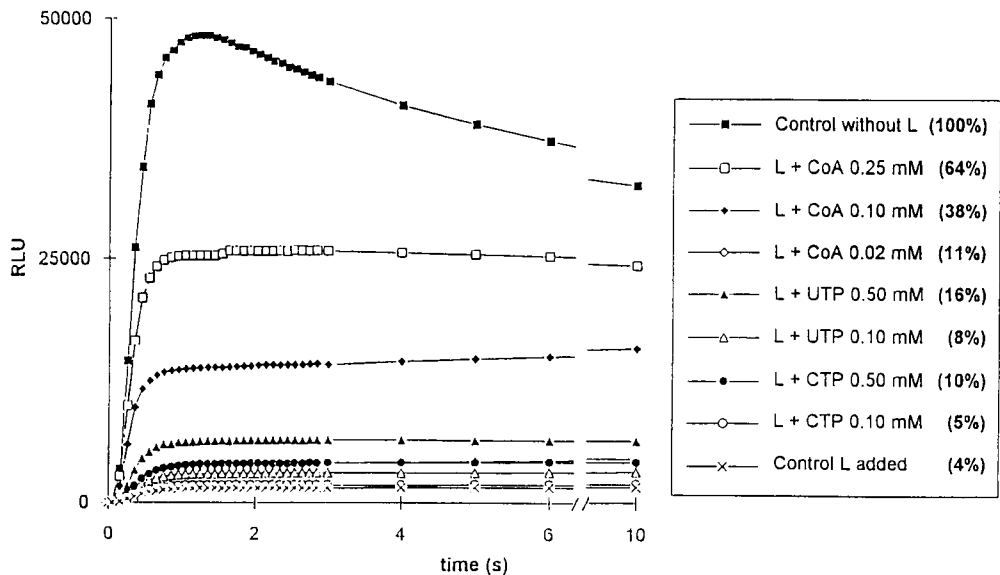


FIG. 4. Effect of CoA, UTP and CTP on light emission in the presence of dehydroluciferin. The reaction mixtures contained in a final volume of 0.15 ml: 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, 0.01 mM luciferin, luciferase (6.7 μg of protein) and 1.9 μM dehydroluciferin (except in the control without dehydroluciferin). When indicated the reaction mixtures were supplemented with CoA, UTP or CTP and preincubated for 3 min before the injection of 0.1 ml of 15 μM luciferin which initiated the light producing reaction. After the injection of luciferin the final concentrations of CoA, UTP and CTP were as indicated. The light was integrated every 0.1 s for 10 s. Each of the curves shown is the average of 3 experiments. The light measured in the first 10 s at the different conditions assayed is shown in the insert; 100% corresponds to 3.8×10^6 RLU.

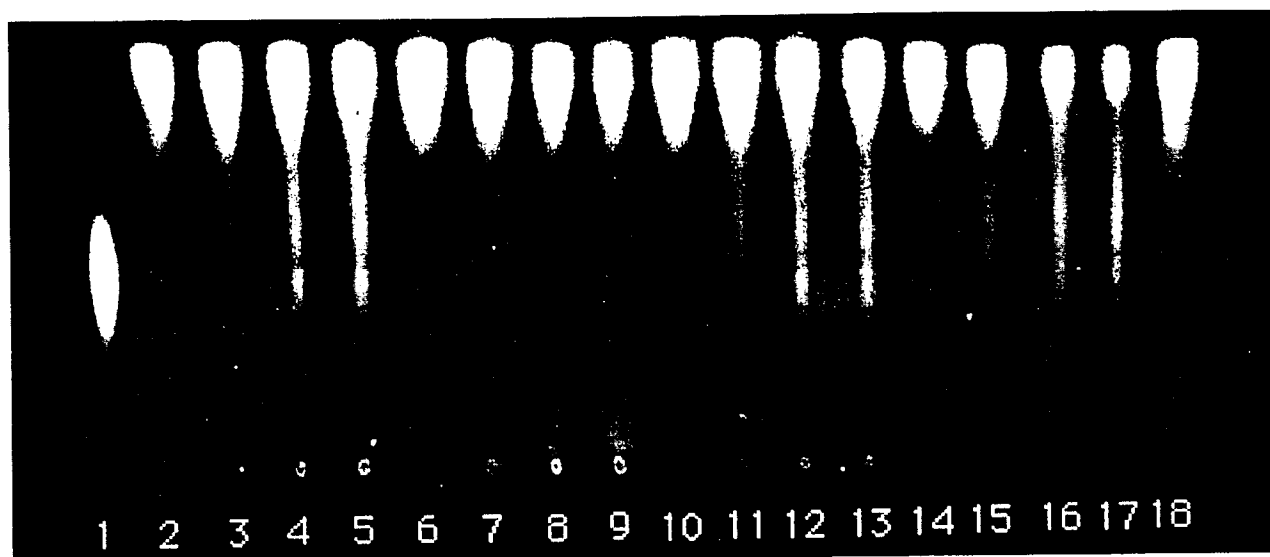


FIG. 5. Thin layer chromatography of the products of the luciferase catalyzed reaction in the presence of CoA, UTP or CTP. The reaction mixtures contained, in a final volume of 0.04 ml: 50 mM Hepes/KOH (pH 7.5), 5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM ATP, 0.1 mM luciferin and luciferase (18 μ g of protein). When indicated, the mixtures were supplemented with 0.25 mM CoA (lanes 6-9), 0.5 mM UTP (lanes 10-13) or 0.5 mM CTP (lanes 14-17); control without effector (lanes 2-5). Aliquots were withdrawn and spotted onto the TLC plate 15 s (lanes 3, 7, 11 and 15), 3 min (lanes 4, 8, 12 and 16) or 6 min (lanes 5, 9, 13 and 17) after the addition of luciferase which initiated the reaction (see Methods). Reaction mixtures without luciferase (lanes 2, 6, 10 and 14) or without ATP (lane 18) were incubated for 10 min and treated as above. Dehydroluciferin standard in lane 1.

to Rhodes and McElroy (12, 19), as low as 0.5 nM which indicates the high stability of that complex.

CoA, but not NTPs, could very effectively diminish the inhibition promoted by dehydroluciferin. As oxyluciferin, contrary to dehydroluciferin, does not have a carboxylic group (20-21) it is not expected to react with CoA. CoA could react with the E · L-AMP complex yielding L-CoA (14) and liberating E. However, NTPs (ATP included) react with the AMP residue of E · L-AMP complex giving rise to Ap_4N (13) and, probably, E · L. The different effect of CoA and NTP on light emission could be due to: i) different K_m and V_{max} values relative to these compounds in their reactions with the E · L-AMP complex; ii) liberation of free luciferase by CoA, whereas NTPs, after producing Ap_4N , may leave the enzyme in the form of the relatively stable E · L complex (22), unable to produce light.

It is known that the kinetic of light emission varies depending on the experimental conditions and that, to evaluate ATP or enzyme, appropriate standards have to be run (1). Although some still unknown factors may contribute to the light emission kinetic, we propose here that, as soon as the E · LH_2 -AMP is formed part of the enzyme is diverted toward an unproductive complex unable to emit light (E · L-AMP). Hence, experimental conditions favouring formation of the complex E · L-AMP could induce decline in light emission.

The results presented here need to be discussed in relation to previous work mainly from McElroy and DeLuca. They, and their groups, have made very important contributions to the mechanism of light produc-

tion by this enzyme focusing the problem from many different view points. In 1958 they demonstrated that a compound identified as dehydroluciferin (then named oxyluciferin) was the major product formed in the course of the reaction (14). This compound was believed to be the primary compound concerned with the inhibition of light emission and reacted with ATP with liberation of PP_i . They also demonstrated the formation of L-CoA in the presence of CoA, ATP and luciferase and the immediate rise in the light intensity, when CoA was added secondarily to a bioluminescent reaction (14). With the exception of the name (oxyluciferin) given to this compound, it is evident that, in 1958, they were describing results similar to those presented here.

However, since then, the understanding of the mechanism of action of luciferase (very complicated in itself, and not yet completely known) became confused by several factors:

(a) In some later publications (23-25), the reaction of synthesis of L or E · L-AMP (from $LH_2 + ATP$) in the presence of luciferase has been indicated but, in general, the formation of E · L-AMP directly from E · LH_2 -AMP catalyzed by luciferase, has been ignored or, at least, not explicitly mentioned (4-7,13,26-29).

(b) The inhibitory effect of the E · L-AMP complex has been ignored as a factor in the decrease of the light intensity after the initial flash. The light decay has been explained considering that an enzyme complex containing the tightly bound product of the luminescent reaction is formed (28). Oxyluciferin was charac-

terized by Gotto and described as the final product of LH_2 oxidation (21), but the identification of oxyluciferin as the only active species in product inhibition of light emission is, at least, doubtful (29,30).

(c) In the usual luminometric assay of luciferase, the concentrations of ATP and LH_2 are so low that the formation of L may pass unnoticed, even if its synthesis is looked for. On the other side, at higher concentrations of enzyme and substrates (conditions probably prevalent *in vivo*) the reaction can not be followed with commercial luminometers.

(d) On some reports, the role of CoA and NTPs (16-18) on light emission were thought to be similar and partly ascribed to undefined conformational changes of the enzyme. Moreover, the presence of ATP in current commercial preparations of CoA [around 0.1%, unpublished observations from this laboratory], may contribute to false results, particularly when working at low ATP concentrations.

Concluding remarks. Recently (5), the inhibition of the initial flash of light, observed at low ATP and high LH_2 concentrations when the enzyme was preincubated with ATP, was explained by the formation of an inactive intermediate $\text{E}^* \cdot (\text{LH}_2)_2$ complex, unconsidering, in those experimental conditions, the synthesis of L in the course of the reaction. By the contrary, the main contribution of this paper is to present the possibility that $\text{E} \cdot \text{LH}_2$ -AMP complex once formed may follow two different pathways: i) toward production of light as it is transformed into $\text{E} \cdot \text{X}$ -AMP (X=intermediate products) ending in the formation of oxyluciferin and emission of light; ii) toward the synthesis of $\text{E} \cdot \text{L}$ -AMP. As L-AMP binds tightly to luciferase (12,19), its formation in the course of the reaction may contribute to sequester enzyme molecules, so inhibiting light production. In our view, the kinetic of the light emission reaction is not fully understood and, depending on the experimental conditions, the enzyme presents different kinetic light emission profiles, that could be explained by different theoretical mechanisms, reporting, probably, a particular view of the same problem: i.e. the very complicated action of the enzyme *in vivo*, not yet satisfactory explained.

ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PM95/13). R.F. was supported by a Fellowship from Junta Nacional de Investigación Científica e Tecnológica (Portugal). A.D. is a Visiting Professor in the Universidad Autónoma de Madrid, funded by the Dirección General de Investigación Científica y Técnica. We thank Isabel de Diego for able technical assistance.

REFERENCES

- DeLuca, M., Wannlund, J., and McElroy, W. D. (1979) *Anal. Biochem.* **95**, 194-198.
- DeLuca, M. (1976) in *Advances in Enzymology* (Meister, A., Ed.), Vol. 44, pp. 37-68, Wiley, New York.
- McElroy, W. D. (1962) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrback, K., Eds.), 2nd ed., Vol. 6, pp. 401-442, Academic Press, New York.
- McElroy, W. D., DeLuca, M., and Travis, J. (1967) *Science* **157**, 150-160.
- Lembert, N., and Idahl, L.-Å. (1995) *Biochem. J.* **305**, 929-933.
- Sillero, M. A. G., Guranowski, A., and Sillero, A. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 507-513.
- Ortiz, B., Sillero, A., and Sillero, M. A. G. (1993) *Eur. J. Biochem.* **212**, 263-270.
- Guranowski, A., Sillero, M. A. G., and Sillero, A. (1990) *FEBS Lett.* **271**, 215-218.
- White, E. H., McCapra, F., and Field, G. F. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 337-343.
- Dukhovich, A., Sillero, A., and Günther Sillero, M. A. (1996) *FEBS Lett.* **395**, 188-190.
- Morton, R. A., Hopkins, T. A., and Seliger, H. H. (1969) *Biochemistry* **8**, 1598-1607.
- Rhodes, W. C., and McElroy, W. D. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 1528-1537.
- Ortiz, B., Fernández, V. M., Sillero, M. A. G., and Sillero, A. (1995) *J. Photochem. and Photobiol. B: Biology* **29**, 33-36.
- Airth, R. L., Rhodes, W. C., and McElroy, W. D. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **27**, 519-532.
- Wood, K. V. (1990) *J. Cell Biol.* **111**, 380A.
- Ford, S. R., Buck, L. M., and Leach, F. R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 180-184.
- Ford, S. R., Chenault, K. D., Hall, M. S., Pangburn, S. J., and Leach, F. R. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 261-267.
- Ford, S. R., Hall, M. S., and Leach, F. R. (1992) *Anal. Biochem.* **204**, 283-291.
- Rhodes, W. C., and McElroy, W. D. (1958) *Science* **128**, 253-254.
- Plant, P. J., White, E. H., and McElroy, W. D. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 98-103.
- Suzuki, N., and Goto, I. (1971) *Tetr. Lett.* **22**, 2021-2024.
- DeLuca, M., and McElroy, W. D. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **18**, 836-842.
- McElroy, W. D., and Seliger, H. H. (1963) in *Advances in Enzymology* (Nord, F. F., Ed.), Vol. 25, pp. 119-166, Wiley, New York.
- DeLuca, M., Witz, G. W., and McElroy, W. D. (1964) *Biochemistry* **3**, 935-939.
- DeLuca, M., and McElroy, W. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 921-925.
- Denburg, J. L., and McElroy, W. D. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* **141**, 668-675.
- DeLuca, M., Brand, L., Cebula, T. A., Seliger, H. H., and Makula, A. F. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 6702-6704.
- Wulff, K. (1983) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, J., and Grassl, M., Eds.), pp. 340-368, Verlag Chemie, Weinheim/Deerfield Beach, FL/Basel.
- Lemasters, J. J., and Hackenbrock, Ch. R. (1977) *Biochemistry* **16**, 445-447.
- Gates, B. J., and DeLuca, M. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* **169**, 616-621.

- 2.4 - O desidroluciferil-adenilato é o intermediário mais importante na síntese de Ap_4A catalisada pela luciférase de pirilampos na presença de luciferina.**

Artigo IV

Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap_4A catalyzed by firefly luciferase.

Rui Fontes, Begoña Ortiz, Anabel de Diego, Antonio Sillero and María A. Günther Sillero.

FEBS Lett (1998) 438:190-194

Dehydroluciferyl-AMP is the main intermediate in the luciferin dependent synthesis of Ap₄A catalyzed by firefly luciferase

Rui Fontes^b, Begoña Ortiz^a, Anabel de Diego^a, Antonio Sillero^a, María A. Günther Sillero^{a,*}

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC, Facultad de Medicina, UAM, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

^bServiço de Química Fisiológica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Received 9 September 1998

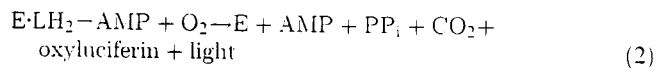
Abstract It was previously assumed that E·LH₂-AMP was the intermediate complex in the synthesis of Ap₄A catalyzed by firefly luciferase (EC 1.13.12.7), when luciferin (LH₂) was used as cofactor. However, here we show that LH₂ is partly transformed, shortly after the onset of the luciferase reaction, to dehydroluciferin (L) with formation of an E·L-AMP complex which is the main intermediate for the synthesis of Ap₄A. Formation of three more derivatives of LH₂ were also observed, related to the production of light by the enzyme. CoA, a known stimulator of light production, inhibits the synthesis of Ap₄A by reacting with the E·L-AMP complex and yielding L-CoA.

© 1998 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Ap₄A; Luciferase; Luciferin; Dehydroluciferin; Coenzyme A

1. Introduction

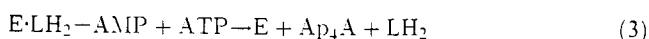
Firefly luciferase (EC 1.13.12.7) catalyzes the production of light using luciferin (LH₂) and ATP as cofactors.



The production of light starts with an initial flash that usually decays in few seconds to low basal levels, even in the presence of excess luciferin and ATP [1]. Depending on the relative concentrations of enzyme, luciferin, ATP and the nature of the buffers and metals present in the reaction mixture, almost any kind of kinetics can be observed [2]. The interpretation of these phenomena is still not clear. The E·LH₂-AMP complex may follow at least two pathways: toward production of light (Eq. 2) and toward E·L-AMP formation [3,4]. As L-AMP binds very strongly to luciferase [5] the formation of the E·L-AMP complex contributes to the inhibition of light production by sequestering active enzyme molecules [4]. In another respect, the activating effect of CoA in the luminescent reaction has been interpreted as a consequence of its reaction with the L moiety of the E·L-AMP

complex yielding L-CoA and liberating enzyme, allowing it to recycle with further light production [3–5].

Firefly luciferase also catalyzes the synthesis of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) according to the previously proposed general reaction [6]



Using other nucleoside triphosphates (NTP) or P₃ as acceptors of the AMP moiety luciferase catalyzes the synthesis of Ap₁N and p₁A, respectively [7]. As Eq. 1 is freely reversible, the synthesis of Ap₄A is greatly accelerated by pyrophosphatase [6]. Contrary to light emission (see above) the rate of synthesis of Ap₄A is constant along time (min or hours) depending on the availability of the substrate ATP [8]. Dehydroluciferin and 6'-ethyl-luciferin (both non-oxidizable compounds by luciferase) are also cofactors in the synthesis of dinucleoside polyphosphates [8].

The object of this work was to explore further the role of luciferin and dehydroluciferin and the effect of CoA on the synthesis of Ap₄A catalyzed by luciferase. The main outcomes are that (i) in the presence of oxygen and luciferin, the main intermediate in the synthesis of dinucleoside polyphosphates is E·L-AMP and not, as previously assumed, E·LH₂-AMP; (ii) CoA, activator of the production of light, is a strong inhibitor of the synthesis of dinucleoside polyphosphates.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Luciferase from firefly (*Photinus pyralis*) was purchased from Sigma (catalogue no. L-5226). A stock solution (4.5 mg of protein/ml) of luciferase was dissolved in 0.5 M HEPES/KOH (pH 7.5). D-Luciferin (LH₂), ATP, sodium tripolyphosphate (P₃), and CoA were obtained from Sigma. Inorganic pyrophosphatase (EC 3.6.1.1; 200 U/ml) was from Boehringer Mannheim. [α-³²P]ATP was from DuPont NEN. Dehydroluciferin (L) was prepared from D-luciferin as previously described [8,9]. The thin layer chromatography (TLC) UV₂₅₄ silica gel fluorescent plates were from Merck.

2.2. Luciferase assay

The reaction mixtures contained, unless otherwise indicated, 100 mM HEPES/KOH (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, PPase (0.5%; v/v), 20–35 μM dehydroluciferin or luciferin, and luciferase 0.45–0.9 mg of protein/ml. Incubations were carried out at 30°C. Product formation was analyzed by HPLC or by TLC.

2.2.1. HPLC. Reaction mixtures (0.05 ml) were stopped by the addition of 0.1 ml of 10 mM EDTA in 66% methanol and centrifuged for 1–2 min at 13000 rpm. Aliquots of the supernatant (0.05 ml) were injected into a Hypersil ODS column (4.6 × 100 mm) and eluted at a constant flow rate (0.5 ml/min) with 2 mM phosphate buffer (pH 7) in 32% methanol. Chromatograms were registered simultaneously at the following wavelengths: 260, 327, 348 and 385 nm. The calculations made to transform the areas of the chromatographic peaks into concentrations were based on the relative molar absorbance of luciferin

*Corresponding author. Fax: (34) (91) 3975353.
E-mail: magunther@iib.uam.es

Abbreviations: Ap₄A, adenosine(5')tetraphosphat(5')adenosine; L, dehydroluciferin; L-AMP, dehydroluciferyl-adenylate; Lase, luciferase; L-CoA, dehydroluciferyl-coenzyme A; LH₂, luciferin; LH₂-AMP, luciferyl-adenylate; P₃, tripolyphosphate; p₄A, adenosine 5'-tetraphosphate; PPase, pyrophosphatase

and dehydroluciferin at, respectively, 327 and 348 nm [10], and on the relative molar absorbance of dehydroluciferin and L-AMP at 353 nm [5]. To calculate the concentration of L-CoA it was assumed that at 348 nm of wavelength the molar absorbance of L-CoA was identical to that of L-AMP.

2.2.2. TLC. The reaction mixtures (0.02 ml), as above, were supplemented with 0.1 μ Ci of [α - 32 P]ATP. At the indicated times aliquots (3 μ l) were spotted on TLC plates. The plates were first developed (13 cm) in dioxane/50 mM acetic acid (4:1) and, after drying, developed again (10 cm) in dioxane/ammonium hydroxide/water (6:1:5). The fluorescent spots were observed using light at a wavelength of 366 nm, and the radioactivity measured in an InstantImager (from Packard Instruments). Standards of non-radioactive AMP, Ap₄A, ADP, ATP and p₄A were eluted simultaneously.

3. Results

3.1. Synthesis and characterization of dehydroluciferyl-AMP

Reaction mixtures containing [α - 32 P]ATP, luciferase and dehydroluciferin or luciferin were incubated in the absence or in the presence of pyrophosphatase, and analyzed by TLC (Fig. 1). The synthesis of Ap₄A was higher in the presence of L than in the presence of LH₂ and, in both cases, stimulation by pyrophosphatase was evident, particularly after 30 min of incubation (Fig. 1). On the contrary, synthesis of AMP was clearly observed only in the presence of LH₂; its rate of synthesis (irrespective of the presence or absence of pyrophosphatase) was very high at the onset of the reaction and then decreased sharply. In addition to the expected spots corresponding to ATP and ADP (contaminating the [α - 32 P]ATP preparations) a new radioactive compound (spot 'a'), fluorescent when irradiated with light of 366 nm wavelength, and migrating just in front of markers of L and LH₂, was also observed. The radioactivity in spot 'a', more intense with L than with LH₂, did not change markedly during the time of incubation. Spot 'a' could correspond to an intermediate of the luciferase catalyzed reactions rather than to a product. The nature of spot 'a' was approached testing the reac-

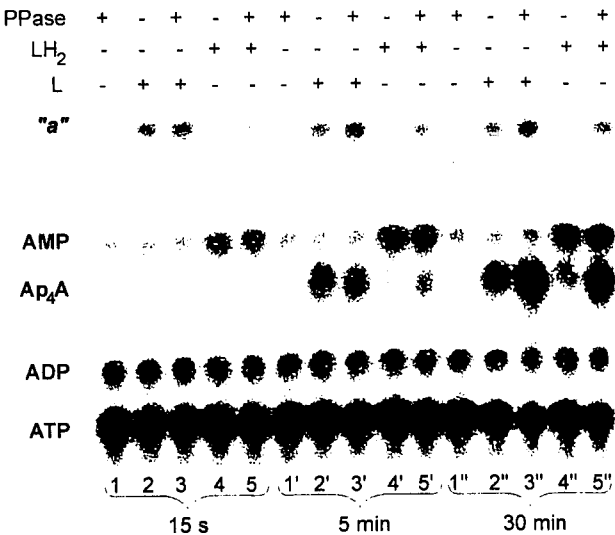


Fig. 1. Synthesis of L-AMP, AMP and Ap₄A catalyzed by firefly luciferase. Effect of dehydroluciferin, luciferin and pyrophosphatase. Reaction mixtures containing [α - 32 P]ATP, luciferase (0.9 mg of protein/ml), 30 μ M L or LH₂, and pyrophosphatase (PPase), as indicated, were incubated at 30°C. At 15 s, 5 min and 30 min aliquots were taken and spotted on TLC. The plates were developed and the radioactivity measured as described in Section 2. Elution position of non-radioactive standards of AMP, ADP, ATP and Ap₄A are shown. Lanes 1, 1' and 1'' correspond to a control without either L and LH₂; 'a' presumptive L-AMP.

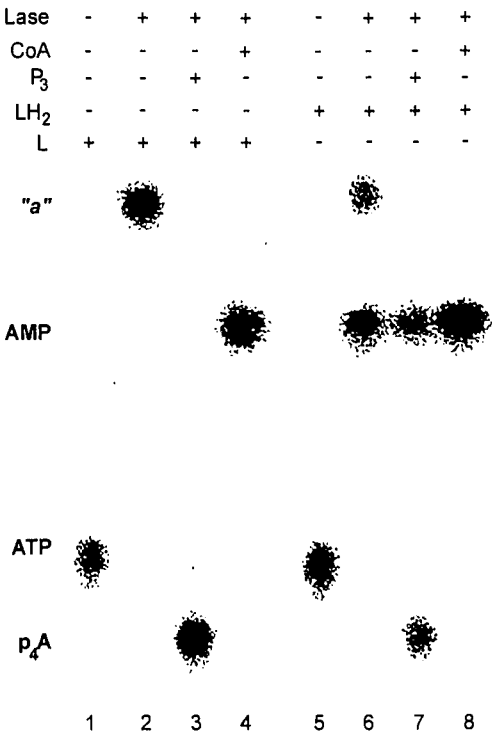


Fig. 2. Luciferase catalyzed reaction. Radioactive products formed in the presence of P₃ or CoA. Reaction mixtures containing [α - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol; about 0.01 μ M), PPase, 20 μ M L or LH₂, 5 mM MgCl₂, and 4 mM P₃ or 0.1 mM CoA were incubated in the presence or in the absence of luciferase (0.68 mg of protein/ml) for 10 min. The TLC plate was developed and the radioactivity counted as described in Section 2. Elution position of non-radioactive AMP, ATP and p₄A are indicated; 'a' presumptive L-AMP. Lanes 1 and 5: Controls without enzyme.

tivity of the presumed intermediate with P₃ and CoA (Fig. 2). When dehydroluciferin was used (lanes 1–4) the compound corresponding to spot 'a' disappeared in the presence of P₃ or CoA giving place to p₄A and AMP, respectively (Fig. 2). The results obtained with luciferin (lanes 5–8) were very similar (apart from the synthesis of AMP in the absence of added CoA, already observed in the experiment described in Fig. 1). Since formation of LH₂-CoA has never been reported, in our view spots 'a' (Figs. 1 and 2) should correspond mainly to L-AMP.

3.2. Analysis by HPLC of the synthesis of L and L-AMP catalyzed by luciferase: effect of pyrophosphatase

To better identify the reaction products or intermediates, reaction mixtures containing luciferase, ATP and dehydroluciferin or luciferin were incubated for 30 min in the absence or presence of pyrophosphatase and analyzed by HPLC as described in Section 2. When dehydroluciferin was used as cofactor, it gave rise to a new peak (result not shown) identified as corresponding to L-AMP by its absorption spectrum [11] (Fig. 3). When luciferin was used as cofactor, it gave rise to (among other compounds, see Fig. 4) dehydroluciferin and L-AMP. These two products were easily identified by their elution position and absorption spectra coincident either with chemically synthesized dehydroluciferin or with the L-AMP synthesized by luciferase from dehydroluciferin and ATP (Fig. 3). No peak corresponding to LH₂-AMP could be observed (results not shown). The final concentrations (μ M) of

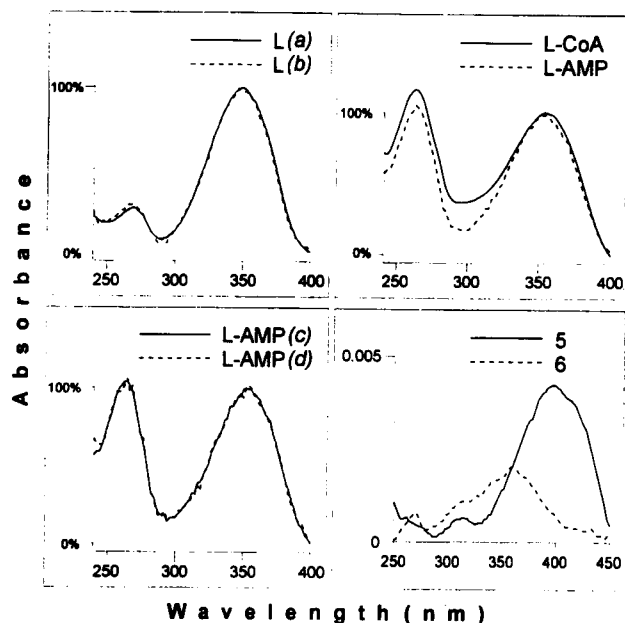


Fig. 3. UV absorption spectra of L, L-AMP, L-CoA and other products formed during the firefly catalyzed reaction. *a* and *b* correspond to the spectra of L chemically or enzymatically synthesized, respectively; *c* and *d* are the spectra of L-AMP enzymatically synthesized from L or from LH₂, respectively. These spectra and that of L-CoA were normalized to a relative absorbance of 100% at 348 nm (L) or 354 nm (L-AMP and L-CoA). Spectra of compounds 5 and 6 were obtained from analysis of reaction mixtures containing luciferase and luciferin as the ones described in Fig. 4.

L-AMP, after 30 min incubation, in the assays with L or (LH₂) were 4.4 (0.8) and 7.8 (3.4), in the absence and presence of pyrophosphatase, respectively. In both cases the presence of pyrophosphatase increased the level of L-AMP in the reaction mixture. The above values were in good agreement with the calculated concentrations of [α -³²P]AMP in spots 'a' in Fig. 1.

3.3. Time course of the products formed during the luciferase catalyzed reaction

The analysis by HPLC of the luciferase assay performed in the presence of LH₂ showed that L+L-AMP account for only around 16% of the consumed LH₂, the rest being transformed to other products as a consequence of the luminescent reaction. To follow the time course of the UV absorbing products formed, reaction mixtures containing ATP, luciferin and luciferase were incubated in the absence and presence of pyrophosphatase, and analyzed by HPLC for more prolonged elution times (Fig. 4). In addition to the peaks corresponding to LH₂, L and L-AMP, other UV absorbing products of the reaction (4, 5 and 6) were now detected in these new experimental conditions. Pyrophosphatase greatly affected the relative concentration of L and L-AMP enhancing the formation of the last. Peaks 4 and 6 reached a maximum in the first minute of the reaction declining during the incubation time, whereas peak 5 appears later in the course of the reaction. This behavior was independent of the presence or absence of pyrophosphatase. The spectra of compounds 5 and 6 are shown in Fig. 3. The absorbance of peak 4 was too low to obtain a good spectrum, although its maximum seemed to be around 400 nm (not shown). All spectra were taken in elution buffer (2 mM phosphate buffer (pH 7) in 32% methanol).

3.4. Effect of CoA on the concentration of dehydroluciferyl-AMP and on the synthesis of Ap₁A

It was known that while CoA activated the luminescent reaction [3,4], it inhibited the synthesis of Ap₁A (unpublished results from this laboratory and this work). Since, in our view, this finding seemed to be related to the level of L-AMP present in the reaction, we tried to analyze, simultaneously, the effect of CoA on the synthesis of Ap₁A and on the level of L-AMP. The experiment was performed in the presence of [α -³²P]ATP, luciferase, pyrophosphatase, fixed concentrations (35 μ M) of luciferin or dehydroluciferin and variable concentrations of CoA (0–0.1 mM) (Fig. 5). While, in the presence of L, a concentration of 0.025 mM CoA inhibited only slightly the synthesis of Ap₁A, the same amount of CoA almost abolished the synthesis of Ap₁A in the presence of LH₂. The CoA dependent inhibitory profile of the synthesis of Ap₁A and the level of L-AMP could be superimposed both with LH₂ or L as cofactors (Fig. 5). This was further tested analyzing by HPLC the relative amounts of L, L-AMP and L-CoA, in the presence of increasing concentrations of CoA in the assays where the added cofactor was L (Fig. 5, inset). L-CoA eluted just before L and its UV spectrum (Fig. 3) was similar to that of L-AMP although not identical. With increasing concentrations of CoA, L-CoA increased and L decreased, and the concentration of L-AMP almost did not change as long as the added CoA was in defect compared to the L present. Both L and L-AMP disappeared, and were converted to L-CoA, when CoA (100 μ M) was in large excess relative to L (35 μ M).

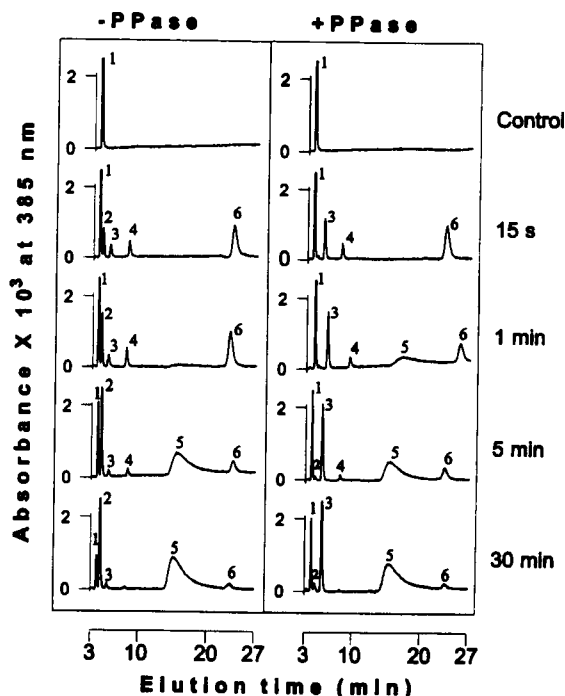


Fig. 4. Time course of the products formed during luciferase catalyzed reaction in the presence of luciferin and ATP. Reaction mixtures (0.25 ml) containing ATP, luciferase (0.9 mg of protein/ml) and 30 μ M LH₂ were incubated in the absence or presence of PPase. At 15 s, 1, 5 and 30 min aliquots were taken and analyzed by HPLC as described. The figures 1, 2 and 3 on top of the chromatographic peaks correspond to LH₂, L and L-AMP, respectively; 4, 5 and 6 correspond to products related to light production.

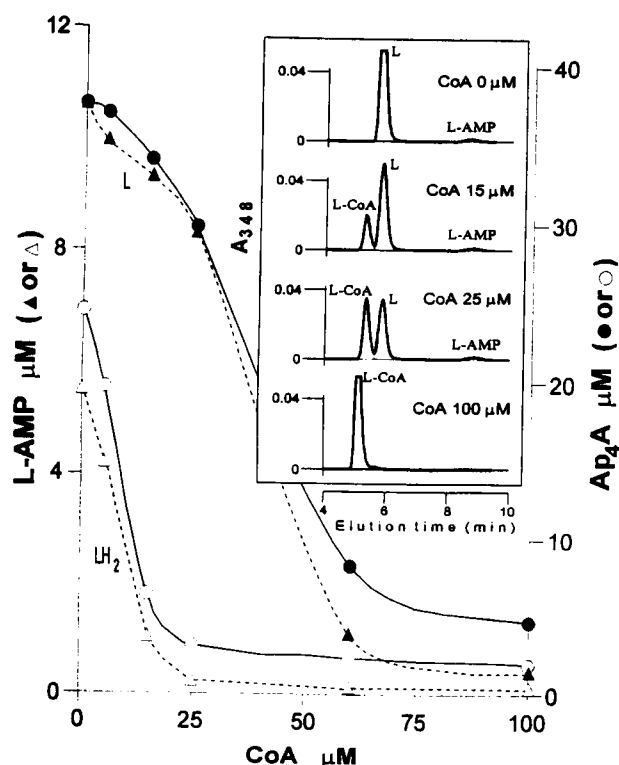


Fig. 5. Effect of CoA on the synthesis of Ap₁A and L-AMP catalyzed by luciferase in the presence of dehydroluciferin or luciferin. Reaction mixtures containing [α -³²P]ATP, luciferase (0.9 mg of protein/ml), PPase, 35 μ M L (full symbols) or LH₂ (empty symbols) and CoA as indicated were incubated for 1 h and analyzed by TLC as described. The concentrations of L-AMP (triangles) and Ap₁A (circles) represent the average of two experiments. Inset: Effect of increasing concentrations of CoA on the relative levels of L, L-AMP and L-CoA in the luciferase catalyzed reaction. Reaction mixtures containing 0.5 mM ATP, luciferase (0.45 mg of protein/ml), PPase, 35 μ M of L and the indicated concentrations of CoA were incubated for 30 min. The reactions were analyzed by HPLC as described.

4. Discussion

During the last years, firefly luciferase, ATP, other nucleoside triphosphates and polyphosphates of different chain length were used for the synthesis of a variety of (di)nucleoside polyphosphates [6,7,12]. In general luciferin was used as cofactor and the reaction analyzed by HPLC, after prolonged times of incubation, usually hours. In those experiments, little attention was paid either to the kinetics of light production (that could be observed by the naked eye) or to the fate of luciferin in the course of the reaction, and the synthesis of dinucleoside polyphosphates was thought to take place through formation of the E·LH₂-AMP complex (Eq. 3). However, here we show that, even using LH₂ as cofactor, the main intermediate donor of AMP is the E·L-AMP complex, rather than E·LH₂-AMP.

With the help of a sensitive method (using radioactive [α -³²P]ATP), the synthesis of Ap₁A could be correlated with the appearance of a compound ('a' in Figs. 1 and 2) that was later identified as L-AMP (see below). In the presence of L, this compound appeared at the very onset of the reaction, its level increased only slightly during incubation time and the presence of pyrophosphatase increased both its steady state level and the amount of Ap₁A synthesized. In the presence of

LH₂ two main differences were appreciated: (i) rapid synthesis of AMP, due to the oxidation of the E·LH₂-AMP complex, concomitant with the production of light and the production of oxyluciferin, and (ii) less synthesis of Ap₁A and a lower level of the presumptive L-AMP, as compared to the results obtained with L. Again, in the case of LH₂, the steady state level of the presumptive L-AMP was related to the amount of Ap₁A synthesized.

The fate of LH₂ was approached analyzing the reaction mixtures by HPLC (Fig. 4). Peaks corresponding to L and L-AMP were formed as well as three other new peaks, termed 4, 5 and 6 (Fig. 4), one of which could correspond to oxyluciferin [13–15]. Apparently, pyrophosphatase had little effect on the rate of formation of compounds 4, 5 and 6, but it greatly affected the relative concentrations of L and L-AMP enhancing the formation of the latter (Fig. 4). A compound with spectral characteristics compatible with LH₂-AMP that eluted in the same elution position as L, was observed in very low amounts (less than 0.4 μ M) in assays performed in the presence of LH₂ and CoA, when almost no L was present (results not shown). The low concentrations of LH₂-AMP attained in the luciferase reactions are in line with previous results from this laboratory [16]. Although CoA is a strong inhibitor of the synthesis of Ap₁A in the presence of LH₂ as cofactor, the synthesis of Ap₁A could not be completely abolished, even in the presence of high concentrations of CoA (see Fig. 5), due, probably, to the presence of low concentrations of the E·LH₂-AMP intermediate which in the presence of ATP could give rise to Ap₁A. The fact that 6'-ethyl-luciferin, a non-oxidizable analogue of luciferin, is also a cofactor in the synthesis of Ap₁A [8] demonstrates that at least one complex other than E·L-AMP could react with ATP in the synthesis of Ap₁A.

The different effect of CoA on light production (stimulator) and on the synthesis of Ap₁A (inhibitor), reported here for the first time, can now be easily explained. As CoA reacts with the E·L-AMP complex generating L-CoA and AMP (Figs. 2 and 5) and free enzyme, luciferase can enter in a second cycle of light production, as far as LH₂ and ATP are available. The inhibitory effect of CoA on the synthesis of Ap₁A is more effective with LH₂ than with L as a consequence of the lower levels of L and L-AMP attained when the cofactor added to the reaction mixtures was LH₂. With dehydroluciferin the inhibition was observed clearly only when the concentration of added CoA was in excess over the cofactor while with luciferin the inhibitory effect was observed even when the added CoA was in defect. In both cases, the rate of synthesis of Ap₁A was correlated with the steady state concentration of L-AMP (Fig. 5). The concentration of L-AMP remains almost constant, despite addition of CoA, if sufficient dehydroluciferin remains in the assay media to react with ATP and maintain the steady levels of the intermediate in the synthesis of Ap₁A, L-AMP (Fig. 5).

Acknowledgements: This investigation was supported by a grant (PM 95/13) from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica. R.F. was partially supported by a Fellowship from Junta Nacional de Investigación Científica e Tecnológica.

References

- [1] McElroy, W.D. and Seliger, H.H. (1963) Adv. Enzymol. 25, 119–166.

- [2] DeLuca, M., Wannlund, J. and McElroy, W.D. (1979) *Anal. Biochem.* 95, 194–198.
- [3] Airth, R.L., Rhodes, W.C. and McElroy, W.D. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* 27, 519–532.
- [4] Fontes, R., Dukhovich, A., Sillero, A. and Günther Sillero, M.A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 445–450.
- [5] Rhodes, W.C. and McElroy, W.D. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1528–1537.
- [6] Guranowski, A., Sillero, M.A.G. and Sillero, A. (1990) *FEBS Lett.* 271, 215–218.
- [7] Ortiz, B., Sillero, A. and Günther Sillero, M.A. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 263–270.
- [8] Ortiz, B., Fernández, V.M., Günther Sillero, M.A. and Sillero, A. (1995) *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 29, 33–36.
- [9] White, E.H., McCapra, F. and Field, G.F. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 337–343.
- [10] Bowie, L.J. (1978) *Methods Enzymol.* 57, 15–28.
- [11] Imai, K. and Goto, T. (1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 2803–2809.
- [12] Sillero, M.A.G., Guranowski, A. and Sillero, A. (1991) *Eur. J. Biochem.* 202, 507–513.
- [13] Suzuki, N., Sato, M., Okada, K. and Goto, T. (1972) *Tetrahedron* 28, 4065–4074.
- [14] Suzuki, N. and Goto, T. (1972) *Tetrahedron* 28, 4075–4082.
- [15] Brovko, L., Gandelman, O. and Ugarova, N. (1990) *Biol. Lumin., Proc. Int. Sch., 1st 1989 (Jezowska-Trzebiatowska, Ed.)* pp. 292–308, Bogusawa, Singapore.
- [16] Dukhovich, A., Sillero, A. and Günther Sillero, M.A. (1996) *FEBS Lett.* 395, 188–190.

3– DISCUSSÃO

3.1- A convicção de que os mono e os dinucleosídeos polifosfatados são moduladores de processos biológicos justifica o interesse do estudo da sua síntese.

Como já foi apresentado na Introdução (capítulos 1.2 e 1.3) está descrito que quer os mono quer os dinucleosídeos polifosfatados existem nos seres vivos e têm efeitos biológicos diversos, podendo actuar quer no interior quer na superfície celular. Na nossa opinião, não é de estranhar que tenham sido descritas uma quantidade tão grande de acções em processos biológicos tão diversos (ver capítulo 1.3): a sua semelhança estrutural com nucleotídeos que, como o ATP, desempenham papéis chave nos seres vivos permite antecipar que muitas outras serão descobertas no futuro.

Quer no meio intracelular quer em algumas secreções as concentrações dos mono e dos diadenosídeos polifosfatados serão, em geral, de ordem de grandeza μM ou inferior e muito inferiores às do ATP (ver capítulos 1.2 e 1.3.c.1). A dificuldade em defender o possível significado fisiológico de muitos dos papéis que lhes são atribuídos resulta não só destas baixas concentrações mas também da possibilidade de o ATP e de outros nucleotídeos competirem com eles para os locais de ligação nas enzimas, canais iónicos ou receptores da superfície celular com que interagem. No entanto, as concentrações, num determinado micro-ambiente do espaço intra ou extracelular, serão diferentes daquelas que têm sido medidas em células encaradas como um todo. É também possível que estas concentrações sejam influenciadas por determinadas condições fisiológicas, patológicas ou terapêuticas. A recente descoberta de que a transcriptase reversa do HIV-1 pode catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados a partir de nucleosídeos trifosfatados que, como determinados antivirais sintéticos de natureza nucleosídica, não contêm o grupo hidroxilo 3' ilustra a afirmação anterior [371]. A provar-se que os derivados fosforilados desses antivirais podem, tal como o ddATP, ser substratos na síntese de dinucleosídeos polifosfatados deve considerar-se a hipótese de que este processo de síntese, para além de poder desbloquear a síntese de DNA (ver capítulo 1.4.d.2), dará origem a compostos que são potencialmente inibidores das cinases envolvidas na fosforilação dos referidos antivirais (ver capítulo 1.3.b.3). Estas considerações e a possibilidade de que um determinado efeito possa vir a demonstrar-se poder ser positiva ou negativamente modulado por outros agentes biológicos impõem uma atitude de prudência na avaliação crítica dos resultados experimentais obtidos com os mono e os dinucleosídeos polifosfatados.

Como referido no capítulo 1.3 alguns dos efeitos dos dinucleosídeos polifosfatados poderão resultar de ligação específica a determinadas enzimas, canais iónicos ou receptores. Também a maior potência dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados na indução de determinados efeitos e a estabilidade destes compostos no meio extracelular relativamente ao ATP reforçam a convicção de que, em muitos casos, os efeitos observados poderão ter significado fisiológico (1.3.b, 1.3.c e 1.3.g). O crescente número de investigadores interessados nesta temática é simultaneamente causa e consequência destas ideias.

Até ao momento, a única enzima conhecida que catalisa especificamente a hidrólise de dinucleosídeos polifosfatados com quatro ou mais resíduos fosfato em mamíferos é a dinucleosídeo-tetrafosfátase assimétrica (ver capítulo 1.4.a.1). Esta enzima é muito fortemente

inibida por mononucleosídeos tetrafosfatados (p_4N) de tal maneira que o metabolismo dos dinucleosídeos polifosfatados estará estreitamente relacionado com o daqueles compostos.

O uso de mono ou dinucleosídeos polifosfatados no desenvolvimento de novos medicamentos [169, 219], de métodos de purificação e de análise de enzimas [82, 92, 97, 104-106, 261] e na investigação de mecanismos enzimáticos [99-103] mostra que o interesse do estudo dos efeitos destes compostos em processos biológicos não se esgota nos aspectos focados nos parágrafos anteriores.

3.2 - A síntese de acil-CoA e a síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados. A hipótese e os seus fundamentos.

Como já referido no capítulo 1.4.d o nosso trabalho experimental integra-se num projecto mais vasto que visa testar a hipótese de que, para além das sínteses de aminoacil-tRNA, outras enzimas capazes de formar um complexo intermediário $E \cdot X \cdot NMP$ (X =ácido orgânico) com concomitante libertação de PPi poderiam também catalisar a síntese de dinucleosídeos polifosfatados [363].

A pertinência da hipótese formulada foi demonstrada pelas descobertas a que deu origem (ver capítulos 1.5.a.2 e 1.6.b) entre as quais se inclui o nosso trabalho sobre a síntese de acil-CoA [Artigos I e II]. Antes da nossa incorporação na equipa de Sillero e Sillero demonstrou-se que a luciférase de *Photinus pyralis* catalisa a síntese de mono e de dinucleosídeos polifosfatados [363-365] e que a síntese de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* catalisa a síntese de mononucleosídeos polifosfatados [368].

Relativamente a estas enzimas, as evidências experimentais obtidas *in vitro* carecem, até ao momento, de verificação *in vivo*. Existem, no entanto, evidências experimentais apoiando a possibilidade de que enzimas de natureza desconhecida mas que catalisam a síntese simultânea de PPi e dinucleosídeos polifosfatados estariam envolvidas nos aumentos de concentração de dinucleosídeos polifosfatados associados à estimulação de células β dos ilhéus de Langerhans com glicose [36] ou de linhas celulares de mamífero com etanol [33].

No mesmo ano em que a hipótese acima referida foi tornada pública (1990) [363] o grupo de Remy [33] observou que, quando adicionado ao meio de cultura de duas linhas celulares de mamífero (A-549 e HTC), o etanol provocava aumentos marcados (até 30 vezes) na concentração intracelular de Ap_4N . Foi verificado que, na presença de etanol, ocorria síntese de Ap_4N que podia ser inibida pela adição de PPi ao meio de cultura tendo este dado sido interpretado como uma evidência a favor de que as enzimas responsáveis pela acumulação de dinucleosídeos polifosfatados podiam ser sínteses de aminoacil-tRNA. No entanto, a adição de acetato de Zn^{2+} em concentrações que, *in vitro*, não inibem e podem mesmo estimular marcadamente a actividade de síntese de Ap_4N de sínteses de aminoacil-tRNA provocou anulação da acumulação de Ap_4N . Também se observou que as concentrações de etanol que eram capazes de induzir acumulação intracelular de Ap_4N provocavam anulação da actividade de síntese de Ap_4A da síntese de aminoacil-tRNA testada, concretamente, da síntese de fenilalanil-tRNA [33].

A possibilidade de outras enzimas, para além das sínteses de aminoacil-tRNA, poderem participar na síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados (nomeadamente os que contém, pelo menos, um resíduo adenina) com libertação concomitante de PPi não podia, nem pode, ser ignorada e, seguindo esta linha de pensamento, decidiu-se estudar a possibilidade de a síntese de acil-CoA ser uma dessas enzimas.

3.3 - A síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* catalisa a síntese de p₄A, p₅A, Ap₄A, Ap₅A, Ap₆A e heterodinucleotídeos contendo adenina.

Os estudos preliminares foram realizados usando como método de análise TLC em placas de gel de sílica eluídas com misturas de dioxano, amoníaco e água em proporções adequadas. A escolha justificava-se já que este método havia sido antes utilizado com sucesso em estudos de hidrólise e fosforólise de dinucleosídeos polifosfatados [214] e, no laboratório de Sillero e Sillero, no estudo da síntese de mononucleosídeos polifosfatados catalisada pela síntese de acetil-CoA [368]. As placas que usámos (comercializadas pela Merck) eram de alumínio revestido com gel de sílica misturado com uma substância fluorescente que, quando irradiada com luz de 250-260 nm de comprimento de onda, emitia luz de cor branca. As bases púricas e pirimídicas, assim como os nucleosídeos e nucleotídeos correspondentes, absorvem luz na mesma banda de comprimentos de onda em que a substância fluorescente contida nas placas é excitada [720] anulando a fluorescência da placa. Tirando partido destas características estes compostos podiam ser visualizados como manchas escuras quando as placas eram irradiadas com luz de comprimento de onda adequado. Esses estudos preliminares mostraram que a preparação comercial de síntese de acil-CoA purificada de *Pseudomonas fragi* (EC 6.2.1.3) comercializada pela Boehringer podia catalisar, a partir de ATP e P₃, a síntese de um composto que coeluiu com o p₄A comercial. Na figura 1 do Artigo I mostra-se a fotografia de uma placa, obtida sob iluminação de uma lâmpada cuja emissão era máxima nos 254 nm de comprimento de onda; quando o P₄ substituíu o P₃ o composto maioritariamente formado tinha um *rf* de valor ligeiramente mais baixo e, logicamente, admitimos que se tratava de p₅A.

O p₄A e o p₅A putativos sintetizados enzimicamente foram purificados e concentrados usando TLC [Artigo I]. Depois de extraídos da placa confirmámos, usando HPLC, que tinham um espectro idêntico ao da adenina e um tempo de retenção compatível com a identificação anterior [Artigo I]. Para obter separação e caracterizar os picos usámos métodos que eram já uma rotina no laboratório de Sillero e Sillero [363-366, 378]. O sistema cromatográfico era de tipo par iónico e estava acoplado a um sistema de detecção que media a absorvância numa banda de comprimentos de onda pré-seleccionada (“diode array detector”). Todo o sistema funcionava sob controlo de um programa informático (“HP ChemStation”) que gravava a informação permitindo a visualização e a comparação dos espectros de absorção correspondentes aos picos registados [Artigo I]. Tirando partido da hidrólise sequencial dos mononucleotídeos catalisada pela fosfátase alcalina foi possível determinar o número de resíduos fosfato nos dois compostos formados e, desta forma, confirmar de modo inequívoco a sua identidade (ver figura 1 do Artigo I). A partir do composto que coeluiu com o p₄A obtiveram-se, por hidrólise, compostos com tempos de retenção idênticos aos do ATP, ADP, AMP e adenosina comerciais; a partir do composto que se admitia ser p₅A obtiveram-se para além destes mesmos picos um outro com tempo de retenção idêntico ao do p₄A comercial. Os espectros de absorção de todos estes compostos eram, como previsto, idênticos entre si.

Foi também possível mostrar que a síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*, na ausência de polifosfatos e na presença de ATP ou de p₄A, catalisava a síntese de compostos que tinham um espectro de absorção idêntico ao dos substratos e que coeluiam com o Ap₄A ou o Ap₅A comerciais, respectivamente [Artigo I]. Tal como no caso dos mononucleotídeos, estes dinucleotídeos foram purificados e concentrados usando TLC [Artigo I]. No caso dos dinucleotídeos, o processo de purificação foi facilitado pelo tratamento, com fosfátase alcalina, dos meios de ensaio onde havíamos provocado a sua síntese; como previsto, este tratamento permitiu a hidrólise dos substratos ATP e p₄A não afectando os dinucleotídeos sintetizados [Artigo I]. A adenosina formada migrava, no sistema de TLC a que já nos referimos, muito

próximo da frente separando-se claramente do Ap₄A e do Ap₅A. Depois de extraídos da placa, a identidade dos produtos formados na presença de ATP ou p₄A foi confirmada de modo inequívoco tirando partido do modo como a fosfodiesterase I (ver capítulo 1.4.a.5) e a dinucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica (ver capítulo 1.4.a.1) catalisam a sua hidrólise. No caso do Ap₄A ambas as enzimas catalisavam a formação de AMP e ATP; no caso do Ap₅A a fosfodiesterase I catalisava a formação de AMP + p₄A e a dinucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica a formação de ADP + ATP (ver figura 4 do Artigo I). Quando, mais tarde, sintetizámos Ap₄G a partir de ATP_γS e GTP usámos também TLC para purificar e concentrar o produto e fosfodiesterase I para a sua identificação: na presença desta enzima formava-se, como resultado da rotura hidrolítica, AMP e GTP assim como GMP e ATP [Artigo I].

Ainda mais tarde, pudemos demonstrar que a sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* podia catalisar a síntese de Ap₆A [Artigo II]. A impossibilidade de obter no mercado p₅A, o aceitador de adenilato adequado neste caso, levou-nos a tentar a síntese de Ap₆A utilizando a capacidade da enzima para catalisar a síntese daquele mononucleotídeo a partir de ATP e P₄ [Artigo II]. Como método de análise usámos HPLC com o sistema tipo par iónico a que já nos referimos [Artigo II]. Após 12 horas de ensaio era possível observar um pico que, tendo em conta o seu espectro e tempo de retenção, se identificou como correspondendo ao p₅A (o pico 5 na figura 1 do Artigo II). Entre as 12 horas e as 40 horas de ensaio um outro pico com um tempo de retenção elevado (pico d6 na figura 1 do Artigo II) aumentou de tamanho e suspeitámos que correspondia ao Ap₆A. A confirmação de que o composto correspondente a este pico era, de facto, Ap₆A foi também obtida através da sua purificação, concentração e posterior hidrólise com as duas enzimas hidrolíticas acima referidas [Artigo II]. Importa, no entanto, esclarecer que a técnica que havíamos usado para a purificação do Ap₄A, do Ap₅A e do Ap₄G (TLC eluindo com uma mistura de dioxano, amoníaco e água) não era exequível no caso do Ap₆A já que neste sistema cromatográfico o Ap₆A e o Ap₅A (que também se formava como consequência, presumimos, da presença de P₃ contaminando o P₄ [Artigo II]) praticamente coeluíam. Assim, decidimos usar para a separação, não dispensando o tratamento prévio com fosfatase alcalina, um outro sistema de separação em HPLC em que o eluente era o hidrogenocarbonato de amónio (troca iónica) [Artigo II]. Injectando, repetidamente, alíquotas do meio de ensaio, recolhendo o eluído correspondente ao composto com tempo de eluição mais elevado e concentrando por liofilização no vazio a baixa temperatura obteve-se uma solução empobrecida em hidrogenocarbonato de amónio e onde a concentração de Ap₆A foi avaliada em 146 µM [Artigo II]. A identificação dos produtos formados quando esta solução foi tratada com fosfodiesterase I (AMP e p₅A) ou dinucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica (apenas ATP) confirmou que o dinucleotídeo sintetizado era, como suspeitávamos, Ap₆A (ver figura 2 do Artigo II).

Logo no início do trabalho experimental com a sintétase de acil-CoA observámos que a síntese de p₄A não dependia nem era estimulada pela adição de ácidos gordos ao meio de ensaio [Artigo I]. Tendo em conta os resultados anteriormente obtidos pela equipa de Sillero e Sillero com a sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* (ver capítulos 1.5.a.2 e 1.5.d.1) e os resultados que podiam ser analisados consultando a literatura (ver capítulo 1.5.d.2) esta ausência de estimulação e, sobretudo, a ausência de dependência eram previsíveis. A mesma ausência de estimulação pelos ácidos gordos tinha sido observada por Bar-Tana e colaboradores quando estes autores estudaram a reacção de troca ATP-PPi, usando sintétase de acil-CoA de cadeia longa de rato [432]. Contudo, até ao momento da nossa descoberta, todas as enzimas em que se havia demonstrado actividade catalítica de síntese de mono e diadenosídeos polifosfatados com concomitante libertação de PPi, tinham a sua identificação facilitada pelo facto desta actividade depender ou, pelo menos, ser estimulada por um cofactor orgânico que funcionava como substrato noutra actividade das mesmas enzimas.

Era esse o comportamento observado quando as enzimas utilizadas eram várias sintétases de aminoacil-tRNA, a sintétase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* e a luciférase de *Photinus pyralis* (ver capítulos 1.4.c.1.1, 1.5.a.2 e 1.6.b). A convicção generalizada de que as sintétases de acil-CoA partilham, com estas enzimas, um mecanismo em que ocorre a formação de um intermediário acil-adenilato justificavam que, antes de prosseguir com o trabalho experimental, fosse dedicada alguma atenção à possibilidade de que a preparação enzimática comercializada pela Boehringer pudesse estar contaminada com outra enzima que tivesse as actividades catalíticas que havíamos descoberto. A hipótese tinha um baixo grau de probabilidade já que estávamos a usar uma preparação purificada. Apesar disso, considerámos que era importante testar a possibilidade de que uma das actividades de transferência de adenilato por nós descobertas (a de síntese de p₄A) e a de síntese de palmitil-CoA pudessem ser separáveis por cromatografia (ver figura 2 do Artigo I) ou de ocorrer inactivação diferencial destas actividades pelo calor [Artigo I]. Os resultados obtidos apontaram, claramente, no sentido de que a enzima responsável pela actividade observada era a sintétase de acil-CoA [Artigo I]. No trabalho experimental subsequente, outras evidências foram somadas a estas, nomeadamente a possibilidade de o ATP poder ser substituído por octanoil-adenilato na síntese de heterodinucleosídeos polifosfatados (ver figura 6 do Artigo I) assim como a acção específica de ácidos gordos como antagonistas da acção inibidora da coenzima A (ver figura 7B do Artigo I).

Nos estudos em que observámos coeluição e inactivação paralela pelo calor das actividades de síntese de palmitil-CoA (medida como síntese de AMP) e p₄A, os meios de ensaio continham, como de resto muitos outros, ATP marcado com trítio e usámos TLC como método analítico [Artigo I]. A aplicação, prévia à eluição, nos mesmos locais onde se aplicavam as amostras do meio de ensaio, de uma solução contendo distintos nucleotídeos (p₄A, ATP, ADP e AMP) e adenosina garantia, mesmo com baixas taxas de conversão (essenciais para o estudo de velocidades iniciais), a possibilidade de visualizar o local para onde os produtos tinham eluído. As placas de alumínio revestido eram cortadas, de modo a individualizar as manchas correspondentes ao ATP e p₄A (no caso de síntese de p₄A) e ao ATP e AMP (no caso da síntese de palmitil-CoA), e a radioactividade associada aos pedaços de placa era medida usando um contador de cintilações. A percentagem de conversão do ATP em p₄A ou AMP era calculada comparando os resultados nos trilhos correspondentes aos ensaios enzimáticos e aos respectivos controlos; a actividade enzimática era calculada tendo em conta o tempo de incubação assim como a quantidade química de ATP e a quantidade de enzima adicionadas às misturas reactivas.

3.4 - Caracterização da actividade de síntese de p₄A da sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*. A luciférase de *Photinus pyralis* como termo de comparação.

O estudo da sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* avançou com o objectivo de caracterizar melhor as actividades de síntese descobertas dando prioridade à de síntese de p₄A que era, entre essas actividades, aquela em a velocidade era mais elevada [Artigo I].

A necessidade de adicionar um catião bivalente ao meio de ensaio era previsível (ver capítulos 1.5 e 1.6) e, desde o início, que o catião escolhido foi o Mg²⁺. Os estudos prévios confirmaram essa dependência e mostraram que, para obter uma actividade óptima, o catião devia ser adicionado para uma concentração molar semelhante ao somatório das concentrações de P₃ e ATP. O nosso trabalho experimental mostrou que outros catiões bivalentes como o Co²⁺, o Mn²⁺, o Zn²⁺ e, em menor grau, o Ca²⁺ podiam, com eficácias diferentes, substituir o Mg²⁺ e que os perfis dos gráficos actividade *versus* concentração de catião eram, com excepção do do Ca²⁺, parecidos [Artigo I]. A dependência da presença de catiões bivalentes na

actividade de síntese de p_4A (e Ap_4A) doutras enzimas foi também observada por outros investigadores (ver capítulos 1.4.c.1.1, 1.4.d.1, 1.5.a.2 e 1.6.b). No caso da luciférase, em que foram testados os mesmos catiões, também o Ca^{2+} era o menos eficaz [364]. A existência de dependência de Mg^{2+} no caso da síntese de acetil-CoA a partir de ATP, acetato e coenzima A, ou da reacção de troca ATP-PPi catalisadas pela síntetase de acetil-CoA, assim como na produção de luz a partir de ATP e luciferina catalisada pela luciférase já foi referida na Introdução (ver capítulos 1.5.a.1 e 1.6.a.2). No entanto, tal dependência não existia quando as actividades de síntese de acetil-CoA ou de produção de luz foram estudadas usando acetil-adenilato e coenzima A no primeiro caso ou luciferil-adenilato, em meio aeróbio, no segundo [413, 430, 604]. Estes dados levam-nos a admitir que, pelo menos nestas enzimas, o Mg^{2+} terá um papel na ligação dos fosfatos β e γ do primeiro ATP à enzima e que, presumivelmente, será essencial à ligação do segundo ATP ou do P_3 , nos caso das sínteses de Ap_4A ou de p_4A , respectivamente. As semelhanças estruturais entre as diferentes síntetases de acil-CoA (incluindo nestas as síntetases de acetil-CoA) e entre estas enzimas e as luciférases de insectos coleópteros (ver capítulo 1.7) apoiam a especulação de que um fenómeno semelhante deve ocorrer no caso das síntetases de acil-CoA em geral e da síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* em particular.

Entre as síntetases de acil-CoA, na sua actividade de síntese de acil-CoA, a única em que o pH óptimo é inferior a 7 é a síntetase de dicarboxilil-CoA de fígado de rato (ver capítulo 1.5). Também está descrito que o rendimento quântico e a velocidade inicial de produção de luz na reacção bioluminescente da luciférase de *Photinus pyralis* diminuem marcadamente quando se baixa o pH do meio de ensaio para valores inferiores a 7 [598, 605, 606, 614, 619]. Tendo em conta que as actividades de síntese de Ap_4A ou p_4A , quer no caso da luciférase de *Photinus pyralis* quer no da síntetase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae*, tinham valores de pH óptimo inferiores a 7 (ver capítulos 1.5.a.2 e 1.6.b) escolhemos, para iniciar o nosso trabalho de investigação com a síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*, um valor de pH de 6,3 e um amortecedor adequado a este pH (MES). O estudo comparado das actividades de síntese de p_4A e palmitil-CoA usando quatro valores de pH entre 5,5 e 8,2 e três amortecedores distintos mostrou que, neste intervalo, a actividade de síntese de p_4A aumentava quando o pH diminuía e que a de síntese de palmitil-CoA variava de forma inversa [Artigo I]. As tentativas para encontrar um máximo de actividade de síntese de p_4A entre pH 6,3 e 5,5 (usando MES como amortecedor) ou, usando outros amortecedores, num valor de pH inferior a 5,5 foram infrutíferas. Estudos das actividades de síntese de Ap_4A e Ap_5A , usando os mesmos amortecedores e valores de pH idênticos, mostraram, como era previsível, que também estas actividades eram mais elevadas a pH 5,5 [Artigo I]. Na teoria mais recentemente avançada para explicar o aumento do comprimento de onda da luz emitida na reacção bioluminescente da luciférase quando o pH do meio baixa admite-se que a diminuição do pH provoca um relaxamento do centro activo da enzima, permitindo que os anéis benzotiazole e tiazole da oxiluciferina (ver Figura II) assumam uma configuração mais estável, concretamente que os planos desses anéis tendam, nessas condições, a ficar perpendiculares entre si [596]. A pH superior a 7 a enzima estaria mais compactada impondo que esses anéis estivessem no mesmo plano [596]. Esta teoria e as semelhanças estruturais entre a luciférase e as síntetases de acil-CoA (ver capítulo 1.7) apoiam a especulação de que o aumento das actividades de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados com a descida do pH seja uma consequência do relaxamento das enzimas facilitando a ligação dos substratos aceitadores ao local de ligação do PPi. Outra possibilidade, que será também considerada no caso da luciférase (ver capítulo 3.9), é que valores de pH mais baixos aumentem a concentração estacionária dos intermediários envolvidos no processo reactivo. No caso da síntetase de acetil-CoA de coração de boi foi observado por Webster e Campagnari [431] que a pH de 7,4 a

quantidade de acetil-adenilato formado, a partir de ATP e acetato na ausência de coenzima A, era superior à que podia ser obtida a pH 8,1.

Foram observados aumentos na concentração intracelular de Ap₄A em culturas de *Physarum polycephalum* tratadas com ácido fórmico ou tratadas com dinitrofenol com o meio de cultura a pH 4,6 [32]. Não é de excluir a possibilidade de que o aumento da concentração de Ap₄A provocado pela acidificação do meio possa estar relacionado com actividades enzimáticas de síntese de Ap₄A que, como a da síntetase de acil-CoA [Artigo I], de acetil-CoA [368] ou a da luciférase de *Photinus pyralis* [364], sejam favorecidas por um pH inferior a 7.

Para o estudo do efeito da concentração de P₃ na velocidade da reacção de síntese de p₄A utilizámos uma concentração fixa de ATP (1 mM) e distintas concentrações de P₃ variando entre 1 e 10 mM sendo o pH 6,3. Tendo nós observado antes que a concentração óptima de MgCl₂ a adicionar ao meio de ensaio dependia da concentração de P₃ e ATP, decidimos utilizar distintas concentrações de MgCl₂ nos ensaios com distintas concentrações de P₃ de modo que a concentração de Mg²⁺ livre fosse fixa [Artigo I]. Admitindo um pH, uma concentração de Mg²⁺ livre e uma força iónica determinadas, as proporções entre as várias formas de ATP e P₃ (protonadas e não protonadas e complexadas e não complexadas com o Mg²⁺) mantêm-se constantes quando a concentração total do nucleotídeo e do polifosfato variam. Nestas condições, a percentagem das diferentes formas que interagem com a enzima como substratos e, eventualmente como inibidores ou activadores, manter-se-ia constante apesar da variação na concentração total de P₃. Aceitando como aplicáveis às nossas condições as constantes aparentes de dissociação protónica e de afinidade com o Mg²⁺ que encontrámos na literatura [721, 722] e, ignorando eventuais erros que pudessem resultar de variações da força iónica, calculámos a concentração de MgCl₂ a adicionar aos distintos meios de ensaio para que a concentração de Mg²⁺ livre fosse 1 mM. Respeitando esses cálculos adicionámos o MgCl₂ para concentrações que variavam entre 2,9 mM na mais baixa concentração de P₃ utilizada (1 mM) e 11,4 mM na mais elevada (10 mM); estas concentrações em pouco diferiam do somatório das concentrações do ATP (1 mM) e do P₃. Em consequência de reflexões de teor semelhante e aceitando pressupostos idênticos estudámos o efeito da concentração de ATP na velocidade de reacção de síntese de Ap₄A impondo também uma concentração de Mg²⁺ livre de 1 mM. Neste caso, o valor de pH escolhido para o ensaio foi 5,5 e enquanto o ATP variou entre 1 e 10 mM a concentração de MgCl₂ variou entre 1,8 e 9 mM. Nas condições de ensaio escolhidas os K_m foram estimados em 1,3 mM no caso do P₃ e 1,2 mM no caso do ATP [Artigo I]. Apesar de avaliados em condições de ensaio distintas, estes valores são da mesma ordem de grandeza dos que haviam antes sido estimados para o P₃, no caso da síntese de p₄A catalisada pela síntetase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* (4,7 mM) [368], e para o ATP, no caso da síntese de Ap₄A catalisada pela luciférase de *Photinus pyralis* (4 mM) [364].

Os ensaios preliminares realizados com o objectivo de estudar a variação da actividade de síntese de p₄A com a concentração de ATP mostraram que o valor do K_m para este nucleotídeo deveria ser inferior a 50 µM. Usando concentrações de ATP variando entre 1,5 e 200 µM, concentrações fixas de P₃ e MgCl₂ de 10 mM e de 10,2 mM, respectivamente, e como método de separação TLC avaliámos o K_m do ATP em 15 µM [Artigo I]. Uma das dificuldades deste estudo resultou da escolha de uma gama tão ampla de concentrações de ATP. A avaliação de velocidades iniciais seria impossível se usássemos concentrações fixas de enzima e um tempo único para avaliar a velocidade. Por esse motivo usámos três tempos de paragem para cada ensaio e distintas concentrações de enzima para as distintas concentrações de ATP utilizadas; a concentração de síntetase de acil-CoA purificada variou entre 1,1 e 94,8 µg de proteína/ml. Neste estudo, como noutros realizados a partir de Maio de 1997, pudemos dispor de um sistema de detecção de radioactividade comercializado pela "Packard

Instruments" ("InstantImager") baseado nas propriedades ionizantes da radiação e num sistema electrónico que quantificava e traduzia em imagens a radioactividade da placa. As limitações do sistema inviabilizavam o uso do trítio e escolhemos usar $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. O valor de 15 μM que estimámos como sendo o do K_m do ATP na síntese de $p_4\text{A}$ traduz a elevada afinidade deste nucleotídeo para o local da enzima onde sofre rotura entre os fosfatos α e β . Os valores do K_m do ATP nos estudos de síntese de acis-CoA encontrados na literatura, variando com as condições de ensaio e a enzima utilizada, eram, à excepção de dois [433, 501], de ordem de grandeza mM (ver capítulo 1.5.b.2). Num destes trabalhos, Bar-Tana e colaboradores [433] usaram a síntetase de acil-CoA de rato e estudaram, com o objectivo de determinar o mecanismo enzimático, a variação do K_m do ATP em função da concentração de coenzima A. O valor do K_m do ATP diminuía quando baixava a concentração de coenzima A sendo de 11 μM na mais baixa concentração de coenzima A utilizada (0,42 μM) [433]. No outro estudo, Grayson e Westkaemper [501] usaram a enzima de *Pseudomonas aeruginosa* e, neste caso, o K_m do ATP era 35 μM mesmo na presença de uma concentração de coenzima A de 200 μM . No caso da síntetase de acetil-CoA de *Saccharomyces cerevisiae* também já se tinha observado que na reacção de síntese de $p_4\text{A}$ o valor do K_m do ATP (160 μM) [368] era muito inferior aos valores que diferentes autores haviam estimado para este parâmetro na reacção de síntese de acetil-CoA catalisada pela mesma enzima (ver capítulo 1.5.a.1).

A diferença (duas ordens de grandeza) entre os valores do K_m do ATP nas reacções de síntese de $p_4\text{A}$ e Ap_4A catalisadas pela síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* [Artigo I] são um reflexo das diferentes afinidades do ATP para os sítios da enzima onde se liga como dador e aceitador de adenilato.

O liofilizado de síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* comercializado pela Boehringer continha nucleotídeos de adenina e, em todos os lotes utilizados, o mais abundante era o ATP (ver figura 2 do Artigo I). Em termos percentuais (m/m de liofilizado) o somatório dos nucleotídeos $p_4\text{A}$, ATP, ADP e AMP variava, nos diferentes lotes utilizados, entre 19 e 35%. Este achado, algo surpreendente, foi tido em conta nos estudos enzimáticos em que se usava ATP: determinávamos em cada lote a quantidade de ATP de modo a, tendo em conta a quantidade de liofilizado adicionado aos ensaios, ajustar o volume de solução de ATP para obter a concentração pretendida. Esta estratégia não era, no entanto, adequada quando estudámos a especificidade da enzima em relação aos nucleotídeos. Nestes casos, a preparação enzimática foi previamente dialisada de modo a remover os nucleotídeos contaminantes [Artigo I]. Dos mono e dinucleotídeos testados como possíveis dadores de NMP ao P_3 (e consequente síntese de $p_4\text{N}$) foram completamente ineficazes o AMP, o UTP e o CTP [Artigo I]. Com o GTP a actividade (síntese de $p_4\text{G}$) foi apenas 6% da observada no ensaio em que a actividade era mais elevada, concretamente, aquele em que se usou ATP [Artigo I]. Actividades intermédias entre estes dois extremos foram observadas nos ensaios em que se usou $\text{ATP}\gamma\text{S}$, dATP, Ap_5A ou Ap_4A [Artigo I]. Estes resultados não foram inesperados. Não foi possível encontrar na literatura estudos em que o $\text{ATP}\gamma\text{S}$, o Ap_5A e o Ap_4A tivessem sido testados como potenciais substratos na reacção de síntese de acis-CoA catalisada por síntetases de acil-CoA mas, nos estudos sobre a especificidade destas enzimas em relação aos nucleotídeos, apenas o dATP podia substituir o ATP [438, 453, 455]. Nos estudos sobre a luciférase de *Photinus pyralis* a equipa de Sillero e Sillero já tinha observado, antes da nossa incorporação, que o $\text{ATP}\gamma\text{S}$ e o Ap_4A , não contendo modificações no fosfato α relativamente ao ATP, podiam ser dadores de adenilato [364, 365]. Também já tinha sido observado que esta enzima podia catalisar a síntese de Gp_4G a partir de GTP; este nucleotídeo podia funcionar como substrato dador, neste caso, de guanilato mas, tal como no caso da síntetase de acil-CoA [Artigo I], a sua eficácia era muito baixa [365].

As semelhanças funcionais entre a luciferase de *Photinus pyralis* e a síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* foram também evidenciadas quando estudámos a especificidade de substratos aceitadores de adenilato. Havia sido observado que, no caso da luciferase, eram aceitadores de adenilato, para além dos polifosfatos, mononucleotídeos com três ou mais fosfatos e sem modificações nos dois fosfatos terminais; não eram aceitadores o ATP γ S e nucleosídeos mono e difosfatados [364, 365]. Observámos um comportamento idêntico no caso da síntese de acil-CoA [Artigos I e II]. Já referimos que o P₃ e o P₄ assim como o ATP, o p₄A e o p₅A eram aceitadores de adenilato. Nem o ATP γ S (usado como exemplo de nucleosídeo trifosfatado modificado num dos dois fosfatos terminais) nem o AMP nem o ADP (usados como exemplos de nucleosídeos mono e difosfatados) eram substratos aceitadores; todos os nucleosídeos trifosfatados sem modificações nos fosfatos terminais testados (GTP, dGTP, CTP, dCTP, UTP, TTP e XTP) mostraram ser, quando ensaiados na presença de um substrato dador de adenilato adequado (ATP, octanoil-AMP ou ATP γ S), substratos aceitadores [Artigo I]. Pudemos assim sintetizar diversos heterodinucleosídeos tetrafosfatados contendo adenina (Ap₄G, Ap₄dG, Ap₄C, Ap₄dC, Ap₄U, Ap₄dT e Ap₄X) que foram identificados comparando os seus espectros e tempos de eluição com os dos compostos que lhes deram origem [Artigo I]. No caso do Ap₄G, como já referido no capítulo 3.3, uma identificação mais completa foi também empreendida. Quer no caso da luciferase [364] quer no da síntese de acil-CoA [Artigo I] o ADP foi testado como aceitador e, em ambos os casos, o resultado foi negativo. O comportamento da luciferase e da síntese de acil-CoA parece contrastar com o de variadas sínteses de aminoacil-tRNA e o das ligases de DNA e RNA de bacteriófago T4 onde foi possível observar capacidade para catalisar a síntese de Ap₃A (ver capítulos 1.4.c.1.2, 1.4.d.1 e 1.6.b).

3.5 - A participação da síntese de acil-CoA na síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados, *in vivo*. Uma hipótese em aberto.

Em virtude das variações em sentidos opostos a razão entre as actividades de síntese de p₄A e de palmitil-CoA aumentava marcadamente quando o pH descia mas, mesmo a pH 5,5, o mais favorável para a síntese de p₄A e o menos adequado para a síntese de palmitil-CoA, a actividade que havíamos descoberto era uma ordem de grandeza inferior à que inspirou a denominação da enzima (ver figura 3 do Artigo I). Variando nos diferentes lotes de enzima utilizada, o valor da actividade de síntese de p₄A, no estudo descrito na figura 3 do Artigo I, foi avaliado em 20 mU/mg de proteído quando o pH era 5,5 e em 12 mU/mg de proteído quando o pH era 7,2 [Artigo I]. As velocidades de síntese de Ap₄A, Ap₅A, Ap₆A e dos heterodinucleotídeos eram uma a duas ordens de grandeza mais baixas que a de síntese de p₄A [Artigos I e II]. A massa molecular das sínteses de acil-CoA ronda os 60-80 kDa (ver capítulos 1.5.b.2, 1.5.b.3 e 1.5.c); no caso concreto da síntese de *Pseudomonas oleovorans* foi identificado um gene (*alkK*) codificante de uma síntese de acil-CoA com 59 kDa de massa molecular [520]. Apesar da extensa pesquisa bibliográfica (ver capítulo 1.5) não encontrámos nenhuma informação, nem sobre a massa molecular nem de qualquer outro tipo, sobre a síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*. Presumindo um valor de 60 kDa para a sua massa molecular e admitindo que o único proteído presente no liofilizado adquirido era a enzima activa, o valor de 12 mU/mg de proteído correspondendo à síntese de p₄A a pH 7,2 seria equivalente a um número de renovação ("turn-over number") de 0,012 s⁻¹. Um valor da ordem de 0,0001 s⁻¹ era, a pH neutro, o valor do número de renovação no caso da síntese do Ap₄A e dos outros dinucleosídeos polifosfatados. Estes valores são extremamente baixos mas devem ser confrontados com os de outras enzimas que catalisam a síntese de Ap₄A, nomeadamente os correspondentes às enzimas que se comprovou poderem catalisar a síntese deste composto *in vivo*.

Num estudo a que já fizemos referência na Introdução (capítulo 1.4.c.1.4), a equipa de Plateau e Blanquet [354] demonstrou que a concentração de Ap₄N estava aumentada em estirpes de *Escherichia coli* transformadas com plasmídeos multicópia contendo os genes correspondentes às sínteses de metionil-, valil-, fenilalanil- ou lisil-tRNA e superprodutoras destas enzimas. A actividade de síntese de Ap₄A destas sínteses foi avaliada *in vitro* a pH 7,8, usando ATP numa concentração de 2 mM. No caso das sínteses de metionil- e valil-tRNA esta actividade de síntese era, respectivamente, 0,002 e 0,005 s⁻¹ independentemente da presença ou da ausência de Zn²⁺. A actividade das sínteses de fenilalanil- e lisil-tRNA era, mesmo na ausência de Zn²⁺, mais elevada (0,014 e 0,024 s⁻¹, respectivamente) aumentando marcadamente na presença deste catião (para 0,38 e 2,03 s⁻¹, respectivamente). Qualquer destes valores é, pelo menos, uma ordem de grandeza superior (caso da síntese de metionil-tRNA) ao da actividade da síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*. Contudo, apesar das enormes diferenças entre as actividades de síntese de Ap₄A (*in vitro*) das diferentes sínteses de aminoacil-tRNA envolvidas no estudo, a equipa de Plateau e Blanquet [354] não observou correlação entre as actividades avaliadas *in vitro* e os níveis intracelulares de Ap₄N nas bactérias superprodutoras das diferentes sínteses. Possivelmente só estudos deste tipo permitirão verificar se a síntese de acil-CoA pode, *in vivo*, catalisar a síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados. Não é de prever que aumentos de actividade catalítica da mesma ordem de grandeza dos que são observados no fígado por variações da dieta ou mesmo com tratamento com fenofibrato (4 vezes [529]) possam repercutir-se nos níveis intracelulares de Ap₄N. Nos estudos da equipa de Plateau e Blanquet com *Escherichia coli* as bactérias superprodutoras tinham aumentos de 20 a 74 vezes nas actividades enzimáticas, mas as concentrações dos dinucleosídeos tetrafosfatados só aumentavam 3 a 14 vezes [354].

Com base nos resultados obtidos no laboratório de Sillero e Sillero com a luciférase de *Photinus pyralis* [364, 365] e no valor da sua massa molecular (60,7 kDa) [657] é possível estimar que o número de renovação desta enzima na síntese de Ap₄A (pH 7,5 e ATP 2 mM) é duas ordens de grandeza superior (0,01 s⁻¹) ao da síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi*. Nos estudos que realizámos com a luciférase de *Photinus pyralis*, quando a actividade de síntese de Ap₄A foi avaliada, usámos uma concentração de ATP de 100 µM [Artigo IV] e, obviamente, obtivemos valores mais baixos (cerca de 0,001 s⁻¹) que os que haviam sido anteriormente descritos. No caso da luciférase não encontrámos estudos que comprovem ou desmintam, de forma categórica, a existência desta actividade *in vivo*. No entanto, como referido na Introdução (capítulo 1.6.b), apesar da elevada actividade da nucleosídeo-tetrafosfatase assimétrica nas lanternas de *Photinus pyralis*, a concentração de Ap₄A nestes órgãos era idêntica à dos restantes tecidos do pirilampo, indiciando que poderá ser a luciférase a enzima responsável pela manutenção dos níveis de Ap₄A nas lanternas [16].

O estudo do efeito da coenzima A na reacção de síntese de p₄A mostrou que aquele composto era um potente inibidor; nas condições de ensaio utilizadas, de que destacamos a ausência de ácido gordo adicionado, o valor de I₅₀ foi estimado em 9 µM (ver figura 7A do Artigo I). No entanto, esta acção inibidora podia ser, específica e eficazmente, removida pela adição de ácidos gordos (octanoico ou palmítico) ao meio de ensaio (ver figura 7B do Artigo I) pelo que é de presumir que os acis-CoA (octanoil e palmitil-CoA) não sejam inibidores da reacção de síntese de p₄A. Na reacção de tioesterificação catalisada pela síntese de acil-CoA de cadeia longa de fígado [504] ou de coração de rato [505] observou-se, na década de setenta, que o palmitil-CoA é um inibidor, competitivo em relação à coenzima A, e que o valor do seu K_i seria cerca de 4 µM [504, 505]. As concentrações de coenzima A não esterificada e de acil-CoA no espaço extramitocondrial do coração de rato foram estimadas por Oram e colaboradores [505] como sendo, respectivamente, inferior a 22 µM e cerca de 5-17 µM. Estes dados indiciam que a coenzima A presente nas células não será um impedimento absoluto para

que a síntese de mono ou dinucleosídeos polifosfatados, catalisada pela sintétase de acil-CoA, possa ocorrer *in vivo*. É possível que variações nas concentrações relativas de coenzima A e acil-CoA modulem a actividade desta enzima de tal forma que aumentos na quantidade de acil-CoA relativamente à de coenzima A contribuam para aumentar a velocidade de síntese dos mono e dos dinucleosídeos polifosfatados.

A existência de polifosfatos, com variados comprimentos de cadeia, em concentrações de 30-110 μM (em termos de resíduos fosfato) foi observada em diferentes tecidos de rato e ratinho [723]. Estas concentrações são muito mais baixas que as de ATP, com que se admite que competem no ambiente intracelular, e também muito mais baixas que os valores de K_m que foram avaliados para o P_3 nas reacções de síntese de $p_4\text{A}$ catalisadas pelas sintétases de acil-CoA (1,3 mM [Artigo I]) ou acetil-CoA (4,7 mM [368]) lançando a dúvida se as condições *in vivo* serão adequadas à síntese de mononucleosídeos polifosfatados por acção das enzimas que podem *in vitro* catalisar a síntese de $p_4\text{A}$ e $p_5\text{A}$ usando P_3 e P_4 como aceitadores de adenilato. No entanto, estes dados também mostram que a actividade destas enzimas são muito sensíveis a eventuais variações na concentração intracelular dos polifosfatos.

3.6 - Os mecanismos de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados pela sintétase de acil-CoA e pela luciférase de *Photinus pyralis*.

Existe uma convicção generalizada de que no mecanismo enzimático das sintétases de acil-CoA ocorre, como proposto por Berg nos anos cinquenta para a sintétase de acetil-CoA [413, 552], a formação de um intermediário acil-adenilato (ver equações 25-27 na página 39). Contudo, como referido no capítulo 1.5.d.2, no caso das sintétases de acil-CoA de cadeia longa (EC 6.2.1.3), as evidências experimentais a favor deste mecanismo são escassas. Em relação a estas enzimas foi mesmo proposto, pela equipa de Parsons nos finais dos anos setenta [455, 563], um mecanismo enzimático alternativo onde se considera que o acil-adenilato não é intermediário no processo catalítico (ver equações 13, 28 e 29 na página 42).

De acordo com um ou outro destes mecanismos o dador de adenilato ao P_3 ou a outro aceitador adequado seria, nas reacções por nós estudadas, o complexo E•acil-adenilato ou o complexo E-AMP. O nosso trabalho experimental não permitiu discriminar entre estes dois mecanismos já que qualquer deles poderá explicar os resultados por nós observados [Artigo I].

Tendo nós observado que, na ausência de coenzima A, a adição de ácidos gordos ao meio de ensaio não estimulava a actividade de síntese de $p_4\text{A}$ catalisada pela sintétase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* admitimos que a rotura entre os fosfatos α e β do ATP não dependa estritamente da presença do ácido gordo e que o mecanismo proposto pela equipa de Parsons seja uma possibilidade a considerar [Artigo I]. No entanto, não é de excluir a possibilidade de a preparação enzimática por nós utilizada ou qualquer outro componente adicionado às misturas reactivas contivesse, como contaminante, um ácido gordo ou um análogo que o pudesse substituir. Amostras de dois lotes da enzima que estávamos a utilizar foram enviadas ao “Departamento de Química Orgánica del Consejo Superior de Investigación Científica” (Madrid) para serem analisados, por cromatografia gasosa, relativamente ao conteúdo em palmitato. De acordo com essa análise ambos os lotes continham ácido palmítico numa concentração de cerca de 0,1% (m/m de liofilizado). Admitindo que o único proteído contido no liofilizado era a sintétase de acil-CoA as quantidades de palmitato e de enzima eram, em termos molares, da mesma ordem de grandeza, enfraquecendo a possibilidade de que este ácido gordo pudesse estar presente nos meios de ensaio em concentração saturante. No entanto, não foi excluída a possibilidade de que outros ácidos gordos, para além do palmítico, pudessem estar também presentes. Acresce que as sintétases de acil-CoA são, relativamente ao substrato carboxílico, bastante inespecíficas e que quer as sintétases de acil-CoA de cadeia longa quer as de cadeia média podem aceitar como substratos ácidos orgânicos que não podem

estritamente ser considerados ácidos gordos (ver capítulos 1.5.b.2 e 1.5.c.2). A impossibilidade de demonstrar dependência de ácidos gordos (ou mesmo, simplesmente, activação) na reacção de troca ATP-PPi catalisada pela sintétase de acil-CoA de cadeia longa de fígado de rato, constatada por outros investigadores [432], poderá ser também, eventualmente, consequência da presença de contaminantes insuspeitados. Quer nesta reacção de troca quer nas reacções de síntese por nós estudadas os ácidos carboxílicos não são consumidos e funcionariam, de acordo com o mecanismo proposto por Berg, como cofactores no processo catalítico.

O esforço por nós dedicado à resolução do problema do mecanismo enzimico da síntese de acil-CoA foi escasso e não foi maior devido, em parte, à previsível dificuldade do estudo mas, também, ao reduzido interesse actual da comunidade científica relativamente a esta questão. O facto de todas as sintétases de acil-CoA cuja estrutura primária é conhecida partilharem os motivos sequenciais que, em outras enzimas da mesma superfamília, se demonstrou estarem envolvidos na ligação e formação de acil-adenilatos é uma evidência muito forte a favor do mecanismo proposto por Berg (ver capítulo 7). O isolamento do suposto intermediário acil-adenilato apenas confirmaria aquilo que é uma convicção generalizada que, para se impor, não parece carecer de demonstração experimental (ver capítulo 1.5.d.2). Acresce que, no momento em que o nosso interesse particular no estudo do mecanismo da sintétase de acil-CoA era elevado existia, no laboratório onde decorria o nosso trabalho experimental, um interesse geral, também por nós partilhado, em esclarecer aspectos do mecanismo de síntese de Ap₄A e de produção de luz catalisadas por uma outra enzima da mesma superfamília: a luciférase de *Photinus pyralis*. Dado o uso generalizado desta enzima no doseamento de ATP e em estudos da regulação da expressão de genes como gene repórter (ver capítulo 1.6.a.5), esta investigação era, potencialmente, de um grande interesse teórico e prático e poderia também ajudar a obter informações úteis num eventual regresso à investigação da sintétase de acil-CoA.

Como referido na Introdução (capítulo 1.6.a.2), na reacção bioluminescente da luciférase de *Photinus pyralis* ocorre a formação de um intermediário luciferil-adenilato que, oxidado pelo oxigénio atmosférico, leva à formação de oxiluciferina e consequente emissão de luz (ver equações 31-33 na página 43).

A reacção de síntese de Ap₄A e de outros dinucleosídeos e mononucleosídeos polifosfatados catalisada pela luciférase depende da adição ao meio de ensaio de luciferina ou de análogos deste composto, como a desidroluciferina e a 6'-etil-luciferina [363, 366]. Admitia-se que, quando era a luciferina que era adicionada ao meio de ensaio, o intermediário dador de adenilato nestas reacções de síntese seria, mesmo em condições aeróbias, o luciferil-adenilato (ver capítulo 1.6.b).

No entanto, alguns dados experimentais obtidos no laboratório de Sillero e Sillero, antes da nossa incorporação na equipa, punham em dúvida este mecanismo. Um facto intrigante era que a síntese de Ap₄A podia, na presença de PPase, ser observada durante horas até, praticamente, ao esgotamento do substrato ATP, mesmo quando a luciferina era adicionada para concentrações molares inferiores às de luciférase e largamente inferiores às de ATP. Nestas circunstâncias, era de admitir que toda a luciferina fosse rapidamente consumida e se transformasse em oxiluciferina e nos seus produtos de degradação (ver capítulo 1.6.a.2). A oxiluciferina é um composto que não contém nenhum grupo carboxílico (ver capítulo 1.6.a.2 e Figura II) e era, portanto, improvável que pudesse funcionar como cofactor (ver capítulo 1.6.b). O mesmo acontece em relação à dioxiluciferina, um dos prováveis produtos de degradação da oxiluciferina (ver capítulo 1.6.a.2 e Figura II). No caso da luciférase, invocar a possibilidade de um hipotético intermediário E-AMP, afigurava-se descabido já que a reacção de síntese de Ap₄A dependia, como referido acima, da adição ao meio de ensaio de um cofactor

adequado [363, 366]. Outro facto que questionava o papel do luciferil-adenilato na reacção de síntese de Ap_4A era que esta actividade de síntese podia ser inibida pela coenzima A. Sabia-se que a coenzima A podia reagir com o desidroluciferil-adenilato com formação de desidroluciferil-CoA e AMP [643] mas não existiam (nem existem) evidências a favor da possibilidade de uma reacção semelhante poder ocorrer no caso do luciferil-adenilato. Quando o efeito inibidor da coenzima A foi estudado usando luciferina ou desidroluciferina como cofactores observou-se, contra todas as expectativas, que a coenzima A era um inibidor mais potente quando o cofactor era a luciferina.

3.7 - O mecanismo de síntese de Ap_4A pela luciférase de *Photinus pyralis*. A luciférase também catalisa a oxidação da luciferina a desidroluciferina: uma informação essencial durante muito tempo ignorada.

Questionada a natureza do intermediário na reacção de síntese de Ap_4A catalisada pela luciférase a chave para a solução do problema poderia, eventualmente, estar relacionada com a reacção de síntese de desidroluciferina estudada na segunda metade da década de cinquenta pela equipa de McElroy [600, 643]. Como já foi referido na Introdução (capítulo 1.6.a.3) com base na convicção de que este composto era o responsável pela emissão de luz, a desidroluciferina (ver Figura II) era, na época, designada como oxiluciferina e as referências à sua síntese enzimica são extremamente escassas e, em muitos casos, ambíguas após se ter reconhecido, no início dos anos sessenta, que este composto não era o emissor procurado. Não era de excluir a possibilidade de que a escassez de referências à síntese enzimica de desidroluciferina tivesse como causa a incapacidade para reproduzir o fenómeno usando preparações de luciférase e de luciferina mais puras que as que era possível preparar há quarenta anos.

Assim, decidiu-se repetir uma experiência realizada na década de cinquenta e descrita por Airth, Rhodes e McElroy [643] usando as preparações de luciférase e luciferina comercializadas pela Sigma que eram, desde 1990, utilizadas nos estudos de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados. A experiência do laboratório de Sillero e Sillero aconselhava a introdução de uma pequena variação na técnica de análise dos meios reactivos: em vez de cromatografia em papel usámos TLC em que a placa (comercializada pela Macherey-Nagel) estava revestida com celulose e tinha características cromatográficas semelhantes ao papel [Artigo III]. De resto, utilizámos a mesma mistura eluente (etanol e acetato de amónio a pH 7,5) e a mesma técnica de visualização dos produtos e reagentes. Quando a placa era iluminada com uma lâmpada que emitia luz com um máximo nos 366 nm de comprimento de onda, a luciferina comercial e a desidroluciferina (que havíamos sintetizado quimicamente) nela aplicadas podiam ser visualizadas como manchas fluorescentes num fundo escuro com valores de r_f distintos (ver figuras 1 e 5 do Artigo III). No estudo descrito nas figuras 1 e 2 do Artigo III reproduzimos as observações de Airth, Rhodes e McElroy [643]. A síntese de desidroluciferina a partir de luciferina dependia da adição de ATP ao meio de ensaio e era catalisada pela luciférase de *Photinus pyralis* comercializada pela Sigma [Artigo III]. Uma das duas manchas fluorescentes que eram visíveis nos trilhos onde se havia aplicado o meio de ensaio completo e que estavam ausentes nos correspondentes aos ensaios controlo, com enzima desnaturada ou sem ATP, tinha um r_f (cerca de 0,4) idêntico ao da desidroluciferina sintetizada quimicamente; a outra mancha tinha r_f igual a zero (ver figura 1 do Artigo III) e admitimos, como Plant e colaboradores [601], poder corresponder a produtos de degradação da oxiluciferina. Estudos de fluorimetria (ver figura 2 do Artigo III) e ensaios em que se estudou o efeito da desidroluciferina e da coenzima A (ver figuras 3, 4 e 5 do Artigo III) nas reacções catalisadas pela luciférase reforçaram a nossa convicção de que os resultados obtidos

na década de cinquenta eram reprodutíveis (ver capítulo 1.6.a.3) e não o resultado do uso de preparações de luciferase e luciferina eventualmente pouco puras. Como era previsível, os espectros de emissão e excitação da solução que foi obtida tratando com Hepes (pH 6,0) a celulose correspondente às manchas com *rf* de 0,4 acima referidas coincidiam com os da desidroluciferina sintetizada quimicamente (ver figura 2 do Artigo III). Quando meios de ensaio contendo luciferina, ATP e enzima eram suplementados com coenzima A as manchas fluorescentes correspondentes à desidroluciferina deixavam de ser observadas nos trilhos correspondentes e, em sua substituição, surgiam manchas com *rf* de cerca de 0,1 (ver figura 5 do Artigo III). Uma mancha com *rf* de valor idêntico também podia ser observada quando, em ensaios semelhantes, a desidroluciferina substituída a luciferina e admitimos, tal como Airth, Rhodes e McElroy [643], que essa mancha deveria corresponder, em ambos os casos, a desidroluciferil-CoA [Artigo III].

Para os ensaios de bioluminescência dispúnhamos de um luminómetro que podia injectar, de forma automática, um volume fixo de 100 µl no tubo de ensaio encerrado na câmara e medir a luz produzida, de forma contínua ou descontínua, durante intervalos de tempo tão curtos como 0,1 segundos, armazenando a informação em memória. Escolhemos iniciar as reacções injectando uma solução de luciferina na restante mistura reactiva. Os ensaios preliminares mostraram que, nas condições de ensaio que havíamos escolhido para os estudos de TLC, a velocidade de luz produzida nos primeiros segundos de reacção ultrapassava o limite máximo em que o luminómetro podia ser considerado um aparelho de medida adequado [Artigo III]. A primeira hipótese de solução do problema (baixar a concentração de enzima) revelou-se insuficiente; o problema foi resolvido colocando uma barreira que obstruía parcialmente a janela existente entre a câmara onde decorria a reacção e o tubo fotomultiplicador [Artigo III]. A velocidade de produção de luz era bastante estável entre os segundos 0,3 e 10 (ver figuras 3 e 4 do Artigo III) mas, quando a luz produzida era registada durante vários minutos, pudemos confirmar, como muitos autores antes de nós (ver capítulo 1.6.a.3), que na presença de ATP na concentração de 100 µM e na ausência de desidroluciferina adicionada o perfil dos gráficos velocidade de produção de luz *versus* tempo era de tipo clarão. Concretamente, nestas condições, ao fim de 2 minutos de reacção a velocidade de produção de luz era cerca de 28% da máxima, que se atingia no primeiro segundo. Também observámos que a desidroluciferina pré-incubada com a enzima e o ATP podia, numa concentração duas ordens de grandeza inferior à de luciferina (que, como já referido, era injectada para iniciar a reacção), inibir em mais de 50% a velocidade de produção de luz nos primeiros 10 segundos de reacção e que a coenzima A podia contrariar este efeito inibidor (ver figuras 3 e 4 do Artigo III). Como comentado na Introdução (capítulo 1.6.a.3), o efeito da coenzima A como estabilizador ou activador da velocidade da produção de luz é conhecido desde os finais da década de cinquenta [643]; ignorados durante trinta anos, os efeitos da coenzima A na reacção bioluminescente da luciferase têm sido objecto de um interesse renovado já nesta década [632-634, 637, 640, 644].

Os resultados por nós obtidos podiam ser interpretados de forma coerente admitindo que o luciferil-adenilato podia seguir duas sequências reactivas distintas: (i) formação de desidroluciferil-adenilato e/ou desidroluciferina e (ii) formação de oxiluciferina e concomitante produção de luz [Artigo III]. A desidroluciferina e/ou o desidroluciferil-adenilato, embora não sendo os produtos responsáveis pela produção de luz, podiam ter um papel na inibição da velocidade da produção de luz que se seguia ao clarão inicial [Artigo III]. Em contradição com interpretações mais recentes, acerca do mecanismo de acção da coenzima A, que propõem que esta substância induz alterações conformacionais na luciferase, pareceu-nos mais razoável o mecanismo proposto nos finais da década de cinquenta pela equipa de McElroy (ver capítulo 1.6.a.3 e Artigo III). A eliminação da desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato e a sua

substituição por desidroluciferil-CoA corresponderia à substituição de inibidores da reacção bioluminescente por uma substância, o tioéster, aparentemente desprovida desse efeito (ver capítulo 1.6.a.3 e Artigo III). Um dos factos de investigação recente que, na nossa opinião, apoia o mecanismo de acção da coenzima A proposta nos anos cinquenta, é a observação de que na sua actividade estimuladora ou estabilizadora da produção de luz o grupo tiol tem um papel essencial [633]. A equipa de Leach publicou em 1995 [633] um estudo onde se demonstrava que, entre os derivados da coenzima A testados, apenas a 3'-defosfocoenzima A tinha um efeito semelhante; os derivados da coenzima A em que o grupo tiol não existia, estava oxidado ou participava na formação de tioésteres eram desprovidos de efeito.

3.8 - O desidroluciferil-adenilato é o principal intermediário na síntese de Ap₄A mesmo quando se adiciona luciferina ao meio de ensaio. Dois novos métodos de estudo das reacções catalisadas pela luciférase de *Photinus pyralis*.

O sistema de TLC utilizado nas experiências descritas no Artigo III permitia separar a desidroluciferina da luciferina mas, aparentemente, não permitia separar a desidroluciferina do seu adenilato nem separar os nucleotídeos adicionados ou formados durante os ensaios. Tendo em conta o pH do eluente (7,5) a possibilidade de ocorrer hidrólise do desidroluciferil-adenilato durante as duas horas em que se processava a eluição também não era de excluir. Os anidridos acil-adenilato são instáveis; sofrem hidrólise em meio aquoso e a sua estabilidade melhora quando se baixa o pH do meio [539, 604]. No caso do luciferil-adenilato a sua semi-vida foi avaliada em 10 minutos a pH 7,6 e em 70 minutos a pH 6,5 [604]. Tendo em conta os estudos de McElroy e DeLuca (ver capítulo 1.6.a.3) presumíamos que, nas nossas condições de ensaio, concretamente na presença de ATP e luciférase, pelo menos parte da desidroluciferina quimicamente sintetizada adicionada ao meio de ensaio se convertia no respectivo adenilato [Artigo III]. No caso da síntese enzimática de desidroluciferina a partir de luciferina, dada a dependência de ATP (ver figuras 1 e 5 do Artigo III), presumimos que o luciferil-adenilato se oxidava a desidroluciferil-adenilato e que este poderia, na presença do PPi libertado, sofrer pirofosforólise parcial. O PPi formar-se-ia durante a síntese de luciferil-adenilato e a sua concentração seria equimolar com o somatório das concentrações dos anidridos luciferil- e desidroluciferil-adenilato, da oxiluciferina e do Ap₄A.

Para a separação da desidroluciferina do respectivo adenilato desenvolvemos um novo sistema de TLC. Quando amostras de meios de ensaio, onde se havia adicionado ATP, desidroluciferina sintetizada quimicamente e luciférase, eram aplicadas em placas de gel de sílica idênticas às que usávamos para separar nucleotídeos (ver capítulo 3.3) e estas placas eram eluídas com uma mistura de dioxano e ácido acético diluído (50 mM) na proporção de 4 para 1 (v/v) observávamos, com luz de 366 nm de comprimento de onda, a separação de duas manchas fluorescentes [Artigo IV]. As duas manchas, embora com valores de *r_f* muito próximos (cerca de 0,85 e 0,9), eram muito bem definidas sendo que a que tinha o *r_f* mais baixo coelua com a desidroluciferina e era a única que se observava nos trilhos correspondentes a ensaios controlo em que a luciférase estava ausente. Admitimos, como hipótese, que a mancha fluorescente com *r_f* mais elevado poderia corresponder a desidroluciferil-adenilato e esta suspeita saiu reforçada quando suplementámos o meio de ensaio com [α -³²P]ATP e observámos que essa mancha, que designámos “a”, era, nestas condições, radioactiva (ver figuras 1 e 2 do Artigo IV). Embora esteja descrito que o rendimento quântico da fluorescência do desidroluciferil-adenilato é, em meio aquoso, extremamente baixo e, concretamente, cerca de 60 vezes mais baixo que o da desidroluciferina [604, 652] a comparação entre a intensidade da fluorescência das duas manchas, que era apreciada a olho nu, era incompatível com uma diferença tão elevada. De facto, nem a

desidroluciferina nem o respectivo adenilato podiam ser considerados como estando em meio aquoso quando aderentes à placa de gel de sílica. Não encontramos nenhum estudo descrevendo o comportamento do rendimento quântico da fluorescência do desidroluciferil-adenilato em meios não aquosos mas, no caso de um análogo, o éster de desidroluciferol e adenilato, o rendimento quântico era, quando dissolvido em etilenoglicol, 25 vezes mais elevado que quando dissolvido em água [652].

No sistema de eluição em TLC que desenvolvemos o p₄A, o ATP e o ADP tinham um *r_f* de valor zero mas, o AMP e o Ap₄A, apesar dos seus valores de *r_f* serem baixos (cerca de 0,2 e 0,1 respectivamente), frequentemente separavam-se entre si e dos outros nucleotídeos. Uma das potencialidades que explorámos foi a possibilidade de voltar a eluir a placa com uma mistura de dioxano, amoníaco e água e obter, em geral, uma excelente separação dos nucleotídeos AMP, Ap₄A, ADP, ATP e p₄A (ver figuras 1 e 2 do Artigo IV).

Para confirmar a identidade do composto correspondente à mancha “a” e que, como referido, presumíamos corresponder ao desidroluciferil-adenilato estudámos a sua reactividade com a coenzima A e o P₃ (ver figura 2 do Artigo IV). Usando [α-³²P]ATP e uma concentração química de ATP muito baixa, concretamente 3 ordens de grandeza mais baixa que a de luciférase e a de desidroluciferina, pudemos converter, na presença de PPase, todo o ATP presente no meio de ensaio em desidroluciferil-adenilato. Suplementando o meio de ensaio com P₃ ou com coenzima A, obtivemos, como prevíamos, a conversão total do anidrido em p₄A ou AMP, respectivamente (ver figura 2 do Artigo IV); os outros produtos formados em cada um dos casos terão sido, presumimos, desidroluciferina e desidroluciferil-CoA, respectivamente (ver equações 35 e 36).



Substituindo a desidroluciferina por luciferina observámos que, na presença de luciférase e de PPase, a mancha correspondente ao ATP também desaparecia mas que, neste caso, se formavam duas manchas radioactivas que migravam como o AMP e como o desidroluciferil-adenilato (ver figura 2 do Artigo IV). A formação de AMP correspondia, seguramente, à conversão do luciferil-adenilato em oxiluciferina mas, a identidade da mancha “a” era, neste caso, mais difícil de assegurar. Admitíamos que poderia corresponder a luciferil-adenilato ou a desidroluciferil-adenilato, mas o seu desaparecimento e conversão em AMP quando o meio de ensaio foi suplementado com coenzima A apontou no sentido de se tratar de desidroluciferil-adenilato resultante da oxidação do luciferil-adenilato. A sua conversão em p₄A quando o meio de ensaio foi suplementado com P₃ indicava que era um intermediário na síntese de p₄A e, presumivelmente, na síntese de outros mono e dinucleosídeos polifosfatados.

O estudo descrito na figura 1 do Artigo IV mostrou que o composto correspondente à mancha “a” aumentava de concentração quando o PPi era, pela adição de PPase, eliminado do meio de ensaio, que a sua formação dependia da adição de luciferina ou desidroluciferina e que, independentemente de ser a luciferina ou a desidroluciferina o composto adicionado ou da presença ou ausência de PPase, a concentração variava pouco entre o 15º segundo e o 30º minuto de reacção [Artigo IV]. O efeito activador da PPase na síntese de Ap₄A catalisada pela luciférase quando o cofactor adicionado ao ensaio era a luciferina havia já sido observado no laboratório de Sillero e Sillero [363]. Confirmámos essa observação e, além disso, mostrámos que a intensidade da mancha “a” e a velocidade de síntese de Ap₄A estavam positivamente correlacionadas [Artigo IV]. Independente da presença ou da ausência de PPase, a velocidade de síntese de Ap₄A nos primeiros minutos de reacção assim como a concentração estacionária do composto correspondente à mancha “a” eram mais elevadas quando se havia adicionado ao

meio de ensaio desidroluciferina em vez de luciferina [Artigo IV]. Quando o cofactor adicionado era a desidroluciferina e a PPase estava ausente, a reacção parecia atingir nos primeiros 5 minutos de reacção um estado muito próximo do equilíbrio químico; pelo contrário, na presença de PPase, a síntese de Ap_4A continuava a uma velocidade praticamente constante durante a meia hora de incubação (ver figura 1 do Artigo IV). Estes dados apoiavam a ideia de que o composto correspondente à mancha “a” era um intermediário do processo de síntese de Ap_4A mas não permitiam esclarecer a sua identidade quando era a luciferina que era adicionada ao meio de ensaio [Artigo IV].

Claramente, o sistema de análise de TLC que havíamos desenvolvido tinha insuficiências que só poderiam ser ultrapassadas usando um outro sistema de análise complementar. No laboratório de Sillero e Sillero havia uma larga experiência de separação de nucleotídeos por HPLC e a reacção de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados catalisada pela luciférase [363-366] ou pela síntese de acil-CoA [Artigos I e II] havia sido estudada utilizando métodos baseados em HPLC. Contudo, menos atenção havia sido dedicada à reacção bioluminescente da luciférase e o HPLC não tinha sido utilizado nos estudos realizados no laboratório de Sillero e Sillero sobre esta reacção [605, Artigo III]. Estranhamente, apesar da extensa bibliografia produzida sobre o tema não fomos capazes de encontrar um único estudo sobre a reacção bioluminescente das luciférases de insectos coleópteros em que o HPLC tenha sido utilizado. Relacionados com esta temática, encontrámos dois trabalhos onde se usou HPLC; num deles descreve-se a síntese química de luciferil-adenilato [615] e no outro a purificação da luciferina a partir de extratos de um pirilampo asiático, o *Lampyrus turkestanicus* [576]. Tal como os autores destes trabalhos decidimos utilizar para o estudo das reacções catalisadas pela luciférase de *Photinus pyralis* um sistema cromatográfico de tipo fase reversa [576, 615, Artigo IV]. Como eluente, usámos uma mistura de metanol (32%) e amortecedor de fosfato de sódio a pH 7 [Artigo IV]. A concentração de fosfato escolhida para realizar os estudos preliminares foi 20 mM e muita informação foi obtida durante esses estudos. A separação dos variados produtos e substratos de interesse para o estudo era possível mas, por motivos que não foram investigados, a cada composto, identificado pelo seu espectro de absorção, correspondiam sistematicamente dois picos ou, melhor dito, um pico com dois máximos separados por cerca de 1 minuto. Quando se decidiu baixar a concentração de fosfato para 2 mM o problema foi resolvido (ver figuras 4 e 5 do Artigo IV). Para monitorizar a absorvância do eluído escolhemos quatro comprimentos de onda, concretamente os correspondentes aos máximos de absorvância, no pH escolhido para o eluente, da adenina (260 nm) [720], da luciferina (327 nm), da desidroluciferina (348 nm) [585, 650, 652] e um outro (385 nm) que, de acordo com a literatura consultada [626, 630, 724], podia corresponder ao máximo de absorvância para a oxiluciferina ou de um produto dela derivado, ou ainda a um máximo da mistura reactiva onde a reacção bioluminescente tinha tido lugar.

Usando este sistema para analisar o sobrenadante (centrifugação durante 1 a 2 minutos para precipitar a luciférase desnaturada) de reacções paradas pela adição aos meios de ensaio de uma mistura contendo metanol e EDTA foi possível comprovar que a partir de desidroluciferina sintetizada quimicamente e ATP se formava, na presença de luciférase, um composto com um espectro de absorção que, de acordo com o que pudemos comprovar na literatura [585, 604, 615], era idêntico ao do desidroluciferil-adenilato quimicamente sintetizado [Artigo IV]. Combinando características da desidroluciferina e da adenina este composto tem dois máximos de intensidade muito semelhante, um a 262 e outro a 354 nm de comprimento de onda (ver figura 3 do Artigo IV). Como previsto, tendo em conta os resultados obtidos em TLC em gel de sílica (ver figura 1 do Artigo IV), a quantidade de desidroluciferil-adenilato formada era maior quando o meio de ensaio continha PPase que quando esta enzima

estava ausente: a eliminação do PPi do meio de ensaio impedia a pirofosforólise do desidroluciferil-adenilato favorecendo a sua acumulação [Artigo IV].

Nos ensaios em que se usou luciferina em vez de desidroluciferina pudemos confirmar, de forma inequívoca, os nossos próprios resultados [Artigo III] e os obtidos pela equipa de McElroy na década de cinquenta [600, 643]: a luciférase catalisava, a partir de luciferina e ATP, a formação de desidroluciferina e desidroluciferil-adenilato [Artigo IV]. Concretamente, na presença de PPase o anidrido predominava largamente em relação à desidroluciferina e o inverso ocorria na ausência desta enzima [Artigo IV]. Gates e DeLuca [630] estudaram, na década de setenta, a radioactividade associada à luciférase purificada a partir de um meio de ensaio onde havia ocorrido a reacção bioluminescente. Nesses estudos estes autores usaram como substratos [^{14}C]ATP e luciferina e observaram que a radioactividade associada à luciférase era muito escassa quando o ensaio tinha decorrido na ausência de PPase e aumentava de forma muito marcada quando a PPase estava presente [630]. Gates e DeLuca interpretaram o resultado obtido como uma evidência de que a ligação do AMP à enzima dependia da presença de PPase [630]. Os nossos resultados experimentais (ver figuras 1 e 4 do Artigo IV) assim como o conhecimento das afinidades comparadas do AMP e do desidroluciferil-adenilato para a luciférase (ver capítulo 1.6.a.3) permitem-nos avançar uma interpretação diferente para os resultados obtidos por Gates e DeLuca: possivelmente a radioactividade associada à enzima correspondia a desidroluciferil-adenilato e não a AMP.

A luciferina, a desidroluciferina e o desidroluciferil-adenilato eluíam por esta ordem entre os minutos 3-4 e 5-9. Conhecíamos o espectro do luciferil-adenilato [615] mas, nos primeiros estudos (em que a reacção foi parada ao fim de cerca de meia hora de incubação) não foi possível identificar nenhum pico com um espectro de absorção compatível com a possibilidade de lhe corresponder [Artigo IV]. Contudo, não era de excluir que o luciferil-adenilato pudesse ser identificado analisando alíquotas correspondentes a tempos mais curtos de reacção e tomando precauções que minimizassem a possibilidade de sofrer hidrólise ainda que parcial. De acordo com um estudo anterior do laboratório de Sillero e Sillero (em que se usaram concentrações de enzima da mesma ordem de grandeza das que usámos no trabalho experimental descrito no Artigo IV mas métodos de análise distintos) o luciferil-adenilato atingia máximos de concentração, de cerca de 0,1 μM , ao fim de 10 minutos ou 1-2 minutos de reacção consoante a PPase estava ou não presente [605]. Decidimos, por isso, analisar alíquotas correspondentes a tempos de reacção tão curtos quanto possível (ver figura 4 do Artigo IV assim como as Tabelas I e II e a Figura III na página seguinte), parar a reacção injectando as alíquotas em tubos de ensaio mergulhados em gelo e contendo a mistura de paragem e, logo após a centrifugação, congelar o sobrenadante (-20°C) retirando-o do congelador imediatamente antes de ser injectado na coluna. Nos cromatogramas relativos aos ensaios realizados na presença de PPase e correspondentes a tempos de reacção iguais ou inferiores a 5 minutos não foi possível excluir a possibilidade de que, entre os picos 1 (luciferina) e 3 (desidroluciferil-adenilato; ver figura 4 do Artigo IV), pudesse eluir o luciferil-adenilato. Esse pico era mais facilmente observável nos cromatogramas relativos à absorvância registada a 327 e 348 nm de comprimento de onda que nos cromatogramas correspondentes ao registo a 385 nm (como os da figura 4 do Artigo IV). A sua pequena área, a coeluição com a desidroluciferina e a proximidade do pico correspondente à luciferina impediu uma identificação inequívoca. Num estudo preliminar em que o meio de ensaio continha ATP, luciferina, luciférase e coenzima A toda a desidroluciferina formada se combinou com a coenzima A e, nestas condições, com um tempo de retenção idêntico ao da desidroluciferina, sobrou um pequeno pico (com dois máximos de absorvância a cerca de 335 e 265 nm de comprimento de onda) que podia corresponder ao luciferil-adenilato; a sua concentração no meio de ensaio foi estimada em menos de 0,4 μM [Artigo IV]. Para calcular

Tabela I – Ensaios sem PPase. Concentrações de luciferina (LH₂), desidroluciferina (L) e desidroluciferil-adenilato (L-AMP) e áreas dos picos 4, 5 e 6 nos cromatogramas absorvância *versus* tempo de eluição registados nos comprimento de onda indicados. As condições de ensaio foram as indicadas na figura 4 do Artigo IV. Entre parêntesis indica-se a média de dois ensaios.

tempo de reacção	Concentração µM			Absorvância x s x 10 ³			% de LH ₂ convertida em L+L-AMP
	LH ₂	L	L-AMP	pico 4 (385 nm)	pico 5 (385 nm)	pico 6 (348 nm)	
controles	30	-	-	-	-	-	-
15 s	19,8-20,3 (20,1)	1,4-1,6 (1,5)	0,7-0,7 (0,7)	8-10 (9)	7-0 (3)	42-61 (51)	(22,2%)
1 min	15,0-15,1 (15,0)	3,6-3,3 (3,4)	1,0-0,7 (0,8)	11-5 (8)	5-5 (5)	62-56 (59)	(28,0%)
5 min	9,0-8,9 (8,9)	5,7-5,3 (5,5)	0,6-0,4 (0,5)	4-5 (4)	98-105 (102)	22-17 (20)	(28,4%)
30 min	3,2-2,7 (2,9)	7,5-6,7 (7,1)	0,5-0,3 (0,4)	2-1 (2)	129-135 (132)	9-6 (7)	(27,7%)

Tabela II – Ensaios com PPase. Concentrações de luciferina (LH₂), desidroluciferina ou luciferil-adenilato (L ou LH₂-AMP) e desidroluciferil-adenilato (L-AMP) e áreas dos picos 4, 5 e 6 nos cromatogramas absorvância *versus* tempo de eluição registados nos comprimento de onda indicados. As condições de ensaio foram as indicadas na figura 4 do Artigo IV. (*) Nos tempos iguais ou inferiores a 5 minutos não pudemos excluir a possibilidade de existir luciferil-adenilato. Entre parêntesis indica-se a média de dois ensaios.

tempo de reacção	Concentração µM			Absorvância x s x 10 ³			% de LH ₂ convertida em L+L-AMP
	LH ₂	L ou LH ₂ -AMP (*)	L-AMP	pico 4 (385 nm)	pico 5 (385 nm)	pico 6 (348 nm)	
controles	30	-	-	-	-	-	-
15 s	20,6-21,1 (20,8)	0,1-0,1 (0,1)	2,1-2,0 (2,1)	8-9 (8)	0-0 (0)	60-54 (57)	(23,9%)
1 min	16,7-13,1 (14,9)	0,1-0,1 (0,1)	3,0-3,2 (3,1)	8-7 (8)	6-45 (25)	58-33 (46)	(21,1%)
5 min	11,5-11,4 (11,5)	0,1-0,2 (0,2)	4,3-4,3 (4,3)	3-2 (3)	95-120 (107)	25-11 (18)	(24,3%)
30 min	5,7-6,4 (6,0)	0,3-0,3 (0,3)	5,7-5,5 (5,6)	1-0 (1)	115-108 (112)	8-6 (7)	(24,6%)

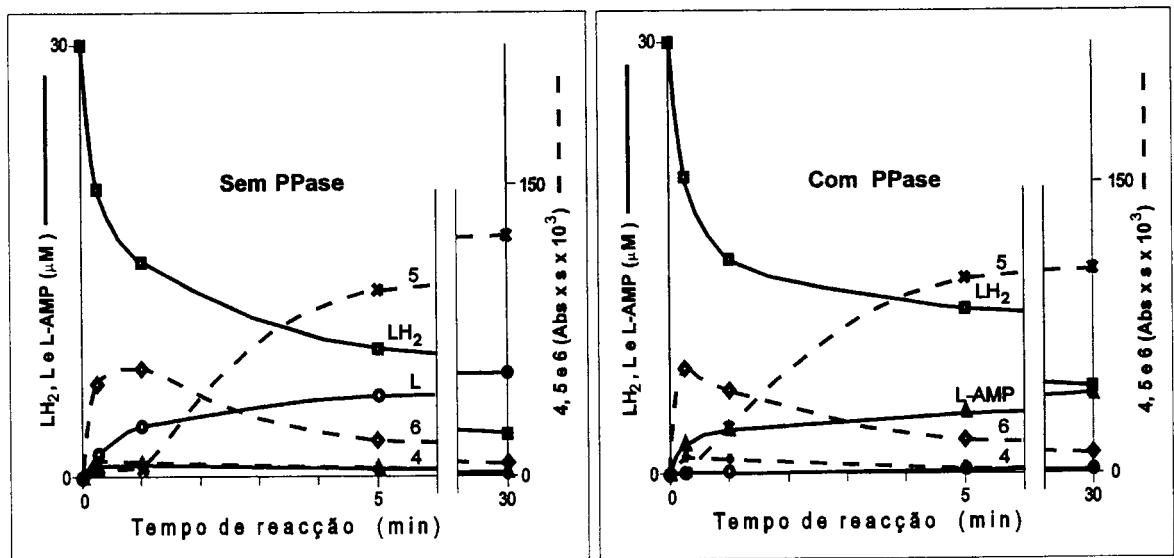


Figura III - Variação da concentração de reagentes e produtos ao longo do tempo na reacção catalisada pela luciférase na presença de luciferina e ATP.

Estes gráficos foram construídos com base nos resultados apresentados nas Tabelas I e II (a média de dois ensaios – entre parêntesis nas Tabelas) que resultaram da análise dos cromatogramas obtidos no estudo descrito na figura 4 do Artigo IV. As concentrações de LH₂, L e L-AMP foram calculadas como descrito no capítulo 2.2.1 do Artigo IV. No caso dos compostos 4, 5 e 6, está representada a área dos respectivos picos (integrados a 385 nm para 4 e 5 e a 348 nm para o 6).

as concentrações da luciferina, desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato, as áreas dos picos dos cromatogramas eram normalizadas tendo em conta a área dos picos correspondentes aos nucleotídeos de adenina (que eluíam antes do minuto 3), a razão entre os coeficientes de extinção molar da luciferina e desidroluciferina a, respectivamente, 327 e 348 nm de comprimento de onda [585] e a razão entre os coeficientes de extinção molar da desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato a 353 nm de comprimento de onda [604]. Os valores de concentração relativos ao pequeno pico que eluiu entre a luciferina e o desidroluciferil-adenilato nos ensaios com PPase inscritos na tabela II foram calculados admitindo que, em todos os tempos de reacção, correspondia a desidroluciferina. Tendo em conta o perfil do espectro do luciferil-adenilato [615] e que o coeficiente de extinção molar deste composto, mesmo no comprimento de onda em que tem um máximo (336 nm; $15100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) é inferior ao da desidroluciferina (348 nm; $20600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [585] podemos estimar que, na hipótese improvável de nos tempos de reacção inferiores ou iguais a 5 minutos todo o pico em discussão corresponder ao luciferil-adenilato, as suas concentrações no meio de ensaio seriam cerca do dobro das inscritas na Tabela II. Isso significaria valores de $0,2 \mu\text{M}$ em 5 das análises realizadas e $0,4 \mu\text{M}$ na restante.

A nossa incapacidade para decidir com clareza se, sim ou não, podemos detectar a presença de luciferil-adenilato nos meios de ensaio em que se adicionou luciferina e ATP, contrasta com a facilidade que tivemos, nos mesmos ensaios, em identificar e calcular a concentração do desidroluciferil-adenilato formado. A concentração deste composto (correspondente ao pico 3, na figura 4 do Artigo IV) variou neste estudo entre $5,6$ e $0,4 \mu\text{M}$, correspondendo, respectivamente, aos ensaios na presença e na ausência de PPase no minuto 30 de reacção (ver Tabelas I e II). Foi demonstrado por White e colaboradores [725] que as oxidações não enzimáticas dos ésteres etoxivinílico e metílico da luciferina a, respectivamente, desidroluciferina e éster metílico da desidroluciferina dependiam de oxigénio. Admitindo que, tal como nestas reacções, também na oxidação enzimática da luciferina a desidroluciferina o oxidante é o oxigénio teremos que aceitar que, na síntese de Ap_4A , observada pela equipa de Sillero e Sillero em anaerobiose [366], o intermediário era, muito provavelmente, o luciferil-adenilato. Também a interpretação que fazemos de uma experiência descrita por McElroy e Green [600] aponta no mesmo sentido (ver Introdução; capítulo 1.6.b); de acordo com estes autores, em anaerobiose, a luciférase catalisava (na presença de ATP, luciferina e PPase) a formação de PPi que se mantinha a velocidade constante durante horas. No entanto, ao contrário do que até ao momento era admitido [363-367], o nosso trabalho experimental mostrava que, na presença de oxigénio, o principal intermediário na síntese de Ap_4A , quando o cofactor adicionado ao ensaio era a luciferina, era o desidroluciferil-adenilato. A razão entre as concentrações do desidroluciferil-adenilato e do hipotético luciferil-adenilato seria, na presença de PPase, sempre superior a 10 (ver Tabela II) e era nestas condições que a actividade de síntese de Ap_4A era mais elevada; na ausência de PPase a actividade de síntese de Ap_4A era substancialmente mais baixa e a presença de altas concentrações de desidroluciferina impediam a observação da eventual presença de luciferil-adenilato (ver figura 4 do Artigo IV).

A actividade dos catalisadores em geral e das enzimas em particular é, em parte, explicada como resultando da sua capacidade para baixar a energia de activação das reacções, ou seja, da sua capacidade para diminuir a diferença entre a energia dos intermediários da reacção e a dos reagentes permitindo assim aumentar a concentração daqueles no sistema reactivo [560-562]. As enzimas em que o intermediário é um acil-adenilato assim como a reacção de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados constituem excelentes exemplos deste tipo de fenómeno. Na realidade, a presença da enzima permite a formação de um intermediário que não é rigorosamente o mesmo que o que pode existir na sua ausência; o intermediário, quando a enzima está presente, está ligado a esta formando um complexo

E•intermediário. As reacções enzimáticas de síntese de desidroluciferil-adenilato ou de luciferil-adenilato a partir de ATP e desidroluciferina ou luciferina, respectivamente, podem ser teoricamente encaradas como sendo o somatório de dois processos: a síntese dos anidridos e a sua ligação às enzimas:



De acordo com as estimativas de Rhodes e McElroy [604] que, medindo a luz produzida por um sistema contendo desidroluciferil-adenilato e luciférase quando se adicionava luciferil-adenilato, estudaram o processo de ligação do desidroluciferil-adenilato à luciférase, a constante de afinidade relativa ao processo de ligação do desidroluciferil-adenilato à enzima (ver equação 38) seria de $1,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ correspondendo a um valor de ΔG° de -52,7 KJ/mol. A constante de afinidade do luciferil-adenilato à luciférase foi estimada admitindo que podia corresponder ao inverso do K_m deste composto na reacção de produção de luz. Embora estes dois conceitos sejam distintos é frequente admitir-se que os valores que lhes correspondem possam ser semelhantes [726]. O valor da constante de afinidade do luciferil-adenilato à luciférase (ver equação 41) seria, neste pressuposto, elevado ($4,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), mas muito mais baixo que o da reacção equivalente em que está envolvido o desidroluciferil-adenilato [604], correspondendo a um valor de ΔG° de -37,7 KJ/mol. As afinidades aparentes entre a enzima e os anidridos desidroluciferil-adenilato ou luciferil-adenilato favorecem de modo desigual a síntese desses anidridos.

Admitindo uma massa molecular de 60,7 kDa [657], homogeneidade da preparação enzimática utilizada e apenas um sítio activo por molécula [664, 665] a luciférase estaria presente nos meio de ensaio das experiências descritas nas figuras 1 e 4 e no capítulo 3.2 do Artigo IV numa concentração de 14,8 μM , um valor mais elevado que o determinado para os anidridos formados em qualquer dos casos. A PPase favorecerá a formação do luciferil-adenilato e, comprovadamente (ver figura 4 do Artigo IV), favorece a de desidroluciferil-adenilato, mas a concentração do luciferil-adenilato acumulado na presença de PPase era, seguramente, sempre inferior à do desidroluciferil-adenilato acumulado na ausência desta enzima. A diferença de três ordens de grandeza entre as constantes de afinidade aparente da enzima para o desidroluciferil-adenilato e para o luciferil-adenilato poderá, pelo menos parcialmente, explicar a diferença entre as concentrações dos dois anidridos. Esta diferença estará também na base da grande potência inibidora da desidroluciferina (observada na presença de ATP e luciférase) na reacção de produção de luz [Artigo III].

Concluindo, os nossos resultados [Artigo IV] e os resultados anteriormente obtidos pela equipa de Sillero e Sillero [366] levam-nos a admitir que quer o complexo E•desidroluciferil-adenilato quer o complexo E•luciferil-adenilato podem transferir o resíduo adenilato para o ATP (ver equações 42 e 34) mas que, nas condições experimentais que escolhemos para realizar as experiências descritas no Artigo IV, concretamente, na presença de oxigénio, o intermediário dador de adenilato envolvido na síntese de Ap_4A é, independentemente do cofactor adicionado ao meio de ensaio (luciferina ou desidroluciferina), o complexo E•desidroluciferil-adenilato.



3.9 - A reacção bioluminescente e os seus produtos. A síntese enzimática de oxiluciferina estudada por HPLC.

Independentemente do tempo de reacção considerado a desidroluciferina, o desidroluciferil-adenilato, o AMP e o PPi não eram as únicas substâncias formadas nos meios de ensaio onde se havia adicionado luciferina, ATP e luciférase. No estudo descrito na figura 4 do Artigo IV, como mostrado nas Tabelas I e II, a percentagem de luciferina convertida em desidroluciferina ou desidroluciferil-adenilato variou entre 21,1% (PPase presente; 1 minuto de reacção) e 28,4% (PPase ausente; 5 minutos de reacção). Nesse estudo o clarão foi observado nos primeiros 3-5 segundos de reacção e quando a primeira alíquota foi adicionada ao reagente de paragem já não era possível, no nível de iluminação adequado para realizar a experiência, observar-se luz no tubo de ensaio. Na câmara escura era possível observar que, nas mesmas condições de ensaio, ainda era possível observar alguma luz ao fim 3-4 minutos de reacção e que, pela adição do reagente de paragem, esta se extinguia. Nos controlos em que todos os componentes da mistura reactiva, com excepção da luciférase, se misturavam com o reagente de paragem antes da adição da luciférase não se observava produção de luz nem a formação de produtos (ver figura 4 do Artigo IV). A análise das alíquotas relativas ao tempo mais curto de reacção estudado mostrou que durante os primeiros 15 segundos cerca de 77% da luciferina transformada se converteu em, pelo menos, dois produtos de natureza desconhecida correspondendo aos picos 4 e 6 (ver figura 4 do Artigo IV e Tabelas I e II). Os dados apresentados são, na nossa opinião, suficientes para concluir que um destes dois picos deverá corresponder à oxiluciferina (ver capítulos 1.6.a.1 e 1.6.a.2). O pico 6, nas condições em que foi estudado (metanol a 32%, pH 7, fosfato de sódio 2 mM), correspondia a um composto com um máximo de absorvância para a luz de 360 nm de comprimento de onda e um segundo máximo, de menor intensidade, a cerca de 270 nm (ver figura 3 do Artigo IV). A reduzida absorvância do pico 4 impediu a realização de um espectro de qualidade aceitável mas parecia ter um máximo a cerca de 400 nm de comprimento de onda [Artigo IV]. A oxiluciferina sintetizada quimicamente pela equipa de Goto [603, 626] ou por Brovko e colaboradores [724] tinha, quando dissolvida em metanol ou em meios aquosos com valores de pH entre 7 e 5, máximos de absorvância variando entre 371 nm e 382 nm de comprimento de onda; a pH 8,5 ou superior o comprimento de onda onde a absorvância era máxima era de valor mais elevado (cerca de 420 nm). A existência de um segundo máximo de menor intensidade para valores de comprimento de onda inferiores a 300 nm também está documentado [603]. A semelhança entre o espectro do pico 6 e os espectros da oxiluciferina sintetizada quimicamente que pudemos encontrar na literatura, assim como a coincidência temporal entre o máximo de velocidade para a sua formação (seguramente antes do segundo 15º de reacção) e a produção do clarão luminoso, constituem fortes evidências a favor da hipótese de que o pico 6 corresponde à oxiluciferina. A confirmar-se esta hipótese seria a primeira vez que a oxiluciferina de insectos coleópteros foi isolada a partir de meios de ensaios onde decorreu a reacção bioluminescente (ver capítulo 1.6.a.2).

Com a excepção de um dos ensaios, em que a intensidade do pico 6 aumentou durante todo o primeiro minuto de reacção (ver Tabela I), os picos 6 e 4 diminuíram de intensidade desde o 15º segundo até ao fim do ensaio (ver Tabelas I e II e Figura III). Acerca da identidade do composto correspondente ao pico 4 aventámos a possibilidade de poder corresponder a um intermediário no processo de formação da oxiluciferina, eventualmente o que contém um anel dioxetano e cuja existência foi postulada por vários autores (ver Figura II) [624, 625, 628, 629]. Paralelamente com a diminuição de intensidade dos picos 4 e 6, surgiu um novo pico (5)

que aumentou de intensidade no decurso da reacção (ver figura 4 do Artigo IV e Figura III). Admitimos poder corresponder a um produto de degradação da oxiluciferina (ver capítulo 1.6.a.2), eventualmente a dioxiluciferina (ver Figura II) [626, 627]. A dioxiluciferina tinha, quando dissolvida em metanol, um máximo de absorvância a 382 nm de comprimento de onda [627]; o pico 5 tinha, nas nossas condições de observação, um máximo a cerca de 400 nm (ver figura 3 do Artigo IV).

Os nossos resultados estão, aparentemente, em contradição com os observados por Seliger e McElroy quando estes autores estudaram, no final dos anos cinquenta, o rendimento quântico da reacção bioluminescente [606]. O elevado valor do rendimento quântico observado a pH 7 ou superior (em média 0,9; ver capítulo 1.6.a.2) esteve, presumimos nós, na base do desprezo a que mais tarde foi votada a reacção de síntese de desidroluciferina. O trabalho de Seliger e McElroy [606] foi o único que pudemos encontrar em que se estudou o rendimento quântico da reacção catalisada pela luciférase. Tal como a síntese enzimática de desidroluciferina, também o estudo do rendimento quântico, nomeadamente o efeito da variação das condições de ensaio neste parâmetro, foi, tanto quanto pudemos constatar, completamente ignorado nas últimas quatro décadas. É, na nossa opinião, provável que os efeitos da descida do pH, aumentando a velocidade de síntese de Ap_4A (observada em meios de ensaio onde o cofactor adicionado era a luciferina [364]) e diminuindo o rendimento quântico [606], estejam intimamente relacionados. É possível que, na base de ambos os fenómenos, esteja um efeito diferencial do pH nos dois tipos de oxidação do luciferil-adenilato: valores de pH inferiores a 7 poderiam, de acordo com esta hipótese, favorecer o processo oxidativo que dá origem à síntese de desidroluciferil-adenilato em detrimento do que leva à formação da oxiluciferina. Esta hipótese não exclui a possibilidade de que o efeito activador da descida do pH na síntese de Ap_4A possa ser também uma consequência da maior resistência à hidrólise do desidroluciferil-adenilato e do luciferil-adenilato a valores de pH menos alcalinos (ver capítulo 3.8) ou a de que um maior grau de relaxamento da enzima facilite a interacção do complexo $\text{E} \cdot \text{desidroluciferil-adenilato}$ com a molécula aceitadora de adenilato (ver capítulo 3.4).

3.10 - A inibição da produção de luz após o clarão: uma reflexão com novos dados.

Uma das ideias defendidas no Artigo III era que o papel inibidor na produção de luz da desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato formados durante a reacção bioluminescente não devia ser ignorado. Aceitando que a constante de dissociação do complexo $\text{E} \cdot \text{desidroluciferil-adenilato}$ é de cerca de 0,6 nM [604], o desidroluciferil-adenilato poderá ter efeitos inibidores muito marcados mesmo se produzido para concentrações desta ordem de grandeza. Para concentrações de enzima de ordem de grandeza substancialmente inferior, como é frequente nos estudos de bioluminescência, um valor de 0,6 nM, muito dificilmente detectável no sistema de ensaio, corresponderia a hemisaturação da enzima com o inibidor.

O trabalho experimental realizado posteriormente e que conduziu ao Artigo IV, não pondo em causa a ideia geral defendida no Artigo III, permite e motiva uma nova reflexão sobre o tema.

Foi observado por McElroy e Green na década de cinquenta [600] e foi recentemente confirmado [641] que a presença de PPase acentua o perfil tipo clarão da reacção de produção de luz (ver capítulo 1.6.a.3). Os resultados por nós obtidos na experiência descrita na figura 4 do Artigo IV estão, de facto, em concordância com uma descida mais abrupta e uma menor velocidade de síntese de oxiluciferina após o clarão quando a PPase estava presente. Em média, a intensidade do pico 6 aumentou entre o 15º segundo e o 1º minuto de reacção quando a PPase estava ausente e diminuiu, no mesmo intervalo de tempo, quando estava presente.

Num determinado tempo de reacção, o somatório das áreas dos picos 5 e 6 seria, de acordo com as evidências que temos vindo a analisar, uma medida da quantidade de luz produzida desde o início do processo reactivo. A simples observação da figura 4 do Artigo IV, ou a análise das Tabelas I e II mostra que a quantidade de luz produzida durante os 30 minutos de incubação deve ter sido menor quando a PPase estava presente. Esta diferença, ainda que escassa, deverá estar relacionada com a diferença entre as afinidades da desidroluciferina e do desidroluciferil-adenilato para a enzima, ou seja, com a maior acção inibidora deste último composto na produção de luz [Artigo III].

Por razões relacionadas com a acção “inibidora” da PPase na produção de luz, as várias equipas que se dedicam ao estudo da reacção bioluminescente não adicionam PPase ao sistema reactivo, como procedimento de rotina. Pelo contrário, os meios de ensaio preparados no laboratório de Sillero e Sillero, com o objectivo de estudar a síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados foram, em geral, suplementados com PPase [363-367]. Nos estudos descritos no Artigo III estudámos a reacção bioluminescente, a síntese de desidroluciferina e o processo de inibição da produção de luz pela desidroluciferina e todos os ensaios foram realizados na ausência de PPase.

As equações 39 e 42 (ver páginas 104 e 105) mostram que quando se aumenta a concentração de desidroluciferina num sistema de ensaio contendo ATP (ou Ap_4A) e luciférase as concentrações do complexo E•desidroluciferil-adenilato e de enzima livre tendem a aumentar e a diminuir, respectivamente. No estudo descrito na figura 3 do Artigo III pré-incubámos, durante 3 minutos e na ausência de PPase, um meio reactivo (50 μ l) contendo luciférase, ATP e desidroluciferina antes de lhe adicionarmos 100 μ l de uma solução contendo luciferina. A velocidade da produção de luz nos primeiros segundos de reacção seria uma medida da quantidade de enzima livre e, de facto, observámos que quanto maior era a concentração de desidroluciferina adicionada ao sistema menor era a quantidade de luz produzida (ver figura 3 do Artigo III) o que está de acordo com as equações 39 e 42. No entanto, à luz dos resultados obtidos no Artigo IV é improvável que, ao contrário do sugerido no Artigo III, o desidroluciferil-adenilato que se forma a partir de luciferina na ausência de PPase tenha, nestas condições experimentais, um papel decisivo na inibição da produção de luz. A comparação entre as concentrações de desidroluciferil-adenilato que podiam ser obtidas na ausência de PPase (sempre inferiores a 1 μ M; ver Tabela I e capítulo 3.2 do Artigo IV) e a concentração de enzima (14,8 μ M admitindo homogeneidade na preparação enzimática utilizada) enfraquece a hipótese formulada. No entanto, não deve ser ignorada a possibilidade, também sugerida no Artigo III, de a desidroluciferina formada nestas condições em maior quantidade poder ter também um papel inibidor. É de notar, no entanto, que quando nas experiências descritas nas figuras 3 e 4 do Artigo III se pré-incubou desidroluciferina sintetizada quimicamente com ATP e luciférase, antes da adição de luciferina, a situação era substancialmente distinta. Neste caso, mesmo na ausência de PPase, há, como pudemos confirmar mais tarde, formação de desidroluciferil-adenilato para concentrações mais elevadas (ver capítulo 3.2 do Artigo IV).

O facto de, no estudo descrito na figura 4 do Artigo IV, se ter observado que a velocidade de produção de luz se reduzia bruscamente após os primeiros 3-5 segundos de reacção quando as concentrações de desidroluciferil-adenilato e/ou desidroluciferina eram ainda modestas (ver Tabelas I e II e Figura III) leva-nos a admitir que outros produtos, como os directamente envolvidos na reacção bioluminescente, possam contribuir eficazmente para a inibição da produção de luz após o clarão.

O composto correspondente ao pico 5, que admitimos ser um produto da degradação da oxiluciferina, poderá ser o “produto” que, complexado com a luciférase, foi isolado por Gates e DeLuca [630] a partir de meios de ensaio onde havia decorrido a reacção

bioluminescente (ver capítulo 1.6.a.2). Este “produto” não era inibidor da reacção de produção de luz: de acordo com Gates e DeLuca o complexo “luciférase de *Photinus pyralis*-produto” tinha uma capacidade para catalisar a produção de luz que era semelhante à da luciférase não complexada [630]. Trabalhos experimentais da primeira metade dos anos cinquenta, sobre o papel do oxigénio no processo de produção de luz catalisada pela luciférase de *Photinus pyralis* apoiam a ideia de que a conversão da oxiluciferina noutra substância corresponde à conversão de um inibidor da produção de luz noutra substância não inibidora [599]. Após o clarão que se seguia à mistura dos reagentes adicionados em altas concentrações em meio aeróbio a velocidade de produção de luz baixava e quando, nessa fase, o oxigénio era retirado do sistema praticamente anulava-se [599]. A reintrodução de oxigénio no sistema provocava um novo clarão de menor intensidade a que se seguia uma nova descida na velocidade da produção de luz [599]. Este resultado parece-nos compatível com a formação de um inibidor durante o clarão que, em meio anaeróbio, não só deixa de se formar como de alguma maneira desaparece do sistema permitindo a acumulação de luciferil-adenilato no centro activo da enzima.

O nosso estudo mostrou que os processos oxidativos de formação de oxiluciferina e desidroluciferina/desidroluciferil-adenilato, mais rápidos no início da reacção, ocorriam em paralelo ao longo do tempo: a percentagem de luciferina que se converteu em desidroluciferina e desidroluciferil-adenilato não sofreu flutuações acentuadas ao longo do tempo de reacção (ver Tabelas I e II). Pelo contrário, a razão entre o somatório das concentrações destes dois compostos e a do composto correspondente ao pico 6, presumível inibidor, foi aumentando ao longo do tempo pelo que é de admitir que, para tempos de reacção mais alargados, o contributo da desidroluciferina e/ou do desidroluciferil-adenilato para o processo de inibição da produção de luz seja relativamente mais acentuado que no tempo imediatamente subsequente ao clarão (ver Tabelas I e II e Figura III). Hastings e colaboradores [599] observaram que, na ausência de PPase, quando um mesmo meio reactivo era submetido a repetidos ciclos de aerobiose/anaerobiose, deixavam de se produzir clarões ao fim de 10-20 minutos. Esta observação foi interpretada como sendo um resultado da desnaturação da enzima mas, na nossa opinião, não é de excluir a possibilidade de ter sido uma consequência da acumulação de desidroluciferina. A possibilidade de os substratos se terem esgotado é de excluir já que nas condições experimentais usadas por Hastings e colaboradores [599] o ATP e a luciferina sofriam, durante o processo, variações muito pequenas nas suas concentrações.

3.11- A coenzima A como inibidora da síntese de Ap₄A e estimuladora da reacção bioluminescente e o efeito de nucleotídeos não adenílicos na reacção bioluminescente.

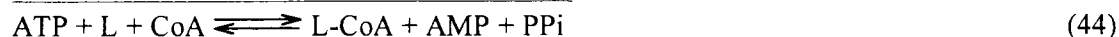
Como já referido (ver capítulos 3.7 e 3.8), a reacção de síntese de desidroluciferil-CoA catalisada pela luciférase foi estudada, em termos não quantitativos, em experiências descritas no Artigo III e, em condições muito particulares de ensaio, na experiência descrita na figura 2 do Artigo IV. Estes estudos foram aprofundados usando como sistema analítico o HPLC; em meios de ensaio onde se havia adicionado luciférase, ATP, desidroluciferina e coenzima A observou-se a formação de um pico que se demonstrou corresponder ao desidroluciferil-CoA (ver quadro inserido na figura 5 do Artigo IV) e cujo espectro de absorvância é mostrado na figura 3 do Artigo IV. Combinando características da adenina e da desidroluciferina o desidroluciferil-CoA tinha, como o desidroluciferil-adenilato, um espectro com dois máximos: um a 262 e outro a 354 nm de comprimento de onda. O facto de, no caso do desidroluciferil-CoA o máximo a 262 nm ser cerca de 15% mais elevado que o máximo a 354 nm e não de altura semelhante, como no caso do desidroluciferil-adenilato, permitia distinguir os dois compostos (ver figura 3 do Artigo IV). Nos estudos prévios que conduziram ao Artigo IV

usávamos, como já referido (ver capítulo 3.8), uma mistura eluente com uma concentração relativamente elevada de fosfato. Nessas condições de eluição o tempo de retenção do desidroluciferil-CoA era elevado e não coincidia com o da luciferina. Nesses estudos analisámos e comparámos misturas reactivas onde a coenzima A tinha sido incubada com luciférase, ATP e luciferina [Artigo IV] ou desidroluciferina. Em consonância com o efeito da coenzima A na produção de luz (ver capítulo 1.6.a.3 e Artigo III) não foi possível em nenhum momento observar qualquer pico cujo espectro de absorção e tempo de retenção sugerisse a possibilidade de poder corresponder a luciferil-CoA. O tempo de retenção e o espectro de absorção do composto que estava presente nos ensaios contendo luciferina e coenzima A e ausente nos controlos sem coenzima A eram idênticos ao do composto que se formava nos ensaios contendo desidroluciferina e coenzima A e que identificámos como desidroluciferil-CoA.

As evidências acumuladas mostravam que, o desidroluciferil-adenilato, era o intermediário comum nos processos de síntese de desidroluciferil-CoA e de mono e dinucleosídeos polifosfatados.

A experiência em que se usou TLC como método analítico, descrita na figura 5 do Artigo IV, confirmou os resultados obtidos pela equipa de Sillero e Sillero antes da nossa incorporação e que, como já referido (ver capítulo 3.6), colocaram em dúvida a natureza do intermediário no processo de síntese de Ap₄A: a coenzima A inibia a reacção de síntese de Ap₄A quando o cofactor adicionado ao ensaio era a luciferina e o efeito inibidor era mesmo mais potente quando o cofactor era a luciferina que quando era a desidroluciferina (ver figura 5 do Artigo IV). Na experiência descrita na figura 5 do Artigo IV (TLC) a desidroluciferina e a luciferina foram adicionadas a distintos meios de ensaio para igual concentração (35 μM) e, quando a concentração de coenzima A era, por exemplo, 25 μM, o grau de inibição foi de 21% no primeiro caso e de 87% no segundo. Tirando partido do método de TLC que havíamos desenvolvido pudemos observar, como era previsível, a existência de uma correlação quase perfeita entre a velocidade de síntese de Ap₄A e a concentração de desidroluciferil-adenilato (ver figura 5 do Artigo IV).

Os estudos de TLC e de HPLC descritos na figura 5 do Artigo IV mostraram que, quando o cofactor adicionado ao meio de ensaio era a desidroluciferina, o efeito da coenzima A na concentração de desidroluciferil-adenilato e na síntese de Ap₄A acentuava-se marcadamente quando era adicionada em excesso relativamente à desidroluciferina. De acordo com as evidências acumuladas, o mecanismo catalítico para o processo enzimático de síntese de desidroluciferil-CoA a partir de desidroluciferina, ATP e CoA será o seguinte [643, Artigos III e IV]:



Nos estudos descritos na figura 5 do Artigo IV a PPase estava presente facilitando o desenvolvimento da reacção expressa pela equação 39 no sentido da formação do desidroluciferil-adenilato. Quando a coenzima A reagia com este anidrido (equação 43) a desidroluciferina e o ATP podiam, quando presentes no sistema, reagir entre si (equação 39) repondo, pelo menos parcialmente, a concentração do intermediário (ver figura 5 do Artigo IV). Os estudos descritos na figura 4 e no capítulo 3.2 do Artigo IV haviam mostrado que a quantidade de desidroluciferina formada a partir de luciferina nos ensaios em que a PPase estava presente era extremamente escassa e que, portanto, não havia neste caso, uma “reserva” de desidroluciferina que pudesse sustentar a reposição do anidrido consumido na reacção com

a coenzima A. As quantidades de desidroluciferil-adenilato que se podiam formar a partir de ATP e luciferina e a partir de ATP e desidroluciferina quimicamente sintetizada eram muito distintas explicando a diferença entre as potências inibidoras da coenzima A em ambos os casos.

Os dados experimentais apresentados na figura 5 do Artigo IV, se bem que qualitativamente de acordo com o mecanismo que defendemos, apoiando a proposta de Airth, Rhodes e McElroy [643], para a acção da coenzima A na reacção bioluminescente (ver Artigo III e capítulos 1.6.a.3 e 3.7), parecem não concordar, numa análise quantitativa, com os resultados obtidos na experiência descrita na figura 4 do Artigo III. Nesta experiência a concentração de desidroluciferina era, durante a fase de pré-incubação, de $5,7 \mu\text{M}$ e o efeito inibidor na produção de luz, não foi completamente antagonizado, mesmo quando a concentração de coenzima A era, durante essa fase, de $750 \mu\text{M}$. Na nossa opinião, é possível que a diferença entre a eficácia da coenzima A como inibidora da síntese de Ap_4A e como antagonista da acção inibidora da desidroluciferina na produção de luz possa, simplesmente, ter resultado das distintas condições de ensaio numa e noutra das experiências. É possível, que a circunstância de na experiência descrita na figura 4 do Artigo III a PPase estar ausente e de estar presente nas experiências descritas na figura 5 do Artigo IV possa explicar a diferença entre as concentrações de coenzima A necessárias para antagonizar o efeito inibidor da desidroluciferina na produção de luz e para inibir a síntese de Ap_4A . Na ausência de PPase, era de esperar (e foi isso que foi observado) ser necessária uma maior concentração de coenzima A para que as reacções descritas pelas equações 39 e 43 pudessem ser forçadas a evoluir no sentido da formação de desidroluciferil-CoA com eliminação da desidroluciferina e do respectivo anidrido. Também não é de excluir a possibilidade de que o tempo de pré-incubação na experiência descrita na figura 4 do Artigo III (3 minutos) não tenha sido suficiente para que a reacção de eliminação da desidroluciferina se tenha completado.

Como referido na Introdução (ver capítulo 1.6.a.3) efeitos de tipo estimulador da produção de luz semelhantes aos da coenzima A foram também observados no caso do PPi , do P_3 , do P_4 e de variados mononucleotídeos com dois ou três resíduos fosfato. Os estudos sobre o efeito dos mononucleotídeos foram da responsabilidade da equipa de Leach e revelaram que, com potências variadas, o CTP, o UTP, o GTP, o CDP, o UDP, os respectivos derivados 2'-desoxi assim como outros derivados com modificações na base púrica ou pirimídica ou oxidados pelo periodato partilhavam o efeito estimulador da coenzima A [610, 632, 634-636, 638]. Os dinucleosídeos polifosfatados Ap_4A e Ap_5A [641], os nucleosídeos monofosfatados (NMP) e o ADP [632, 635] eram desprovidos de qualquer efeito. Com base nos estudos da equipa de Sillero e Sillero que havia, antes da nossa incorporação, observado que uma enorme variedade de nucleosídeos trifosfatados (NTP) eram substratos aceitadores na síntese de Ap_4N [364, 365] admitimos que, pelo menos no caso destes compostos, o efeito observado pela equipa de Leach podia ter como causa a diminuição da concentração do desidroluciferil-adenilato causada pela transferência do resíduo adenilato. A nossa hipótese inspirou-se nas interpretações e observações da equipa de McElroy em relação ao efeito do PPi na reacção de produção de luz (ver capítulo 1.6.a.3) [604].

Na mesma experiência em que testámos o efeito antagonista da coenzima A em relação à acção inibidora da desidroluciferina na produção de luz testámos também o efeito de dois nucleosídeos trifosfatados (CTP e UTP). Mesmo na concentração máxima utilizada (que era o dobro da máxima usada no caso da coenzima A) o efeito antagonista observado foi, como esperado, relativamente modesto mas não nulo (ver figura 4 do Artigo III). De acordo com a nossa hipótese, a potência daqueles nucleotídeos deveria, em virtude do diferente mecanismo de acção, ser menor que o da coenzima A: enquanto neste caso um potente inibidor, o desidroluciferil-adenilato, era eliminado do meio de ensaio dando origem a

compostos (ver equação 43) que, aparentemente, ou não eram inibidores ou eram inibidores muito pouco potentes, no caso dos nucleotídeos havia substituição do anidrido por um inibidor menos potente, a desidroluciferina (ver equação 45).



O resultado obtido no estudo mostrado na figura 5 do Artigo III (em que se usou TLC em placa revestida com celulose como método analítico) era compatível com os mecanismos propostos: só no caso da coenzima A foi possível observar diferenças claras relativamente ao controlo. Os estudos descritos no Artigo IV apoiam a especulação de que, quer no caso da coenzima A, quer no do CTP e UTP, os efeitos activadores na reacção bioluminescente teriam sido mais marcados se a experiência descrita na figura 4 do Artigo III tivesse sido realizada na presença de PPase.

3.12 - Considerações Finais.

Demonstrámos que o intermediário na reacção de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados catalisada pela luciférase de *Photinus pyralis* era, em aerobiose, não o luciferil-adenilato mas sim o desidroluciferil-adenilato que se formava a partir de luciferina e ATP [Artigos III e IV]. A hipótese de que a síntese de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* podia ser uma enzima capaz de catalisar a síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados foi comprovada mas não pudemos, neste caso, identificar o intermediário dador de adenilato [Artigos I e II]. É, na nossa opinião, muito provável que, para além destas enzimas e da síntese de acetil-CoA, todas as outras enzimas da superfamília da luciférase possam ter também estas actividades catalíticas.

A lista de enzimas comprovadamente capazes de catalisar, pelo menos *in vitro*, a síntese de dinucleosídeos polifosfatados inclui neste momento, para além das enzimas referidas no parágrafo anterior, variadas sínteses de aminoacil-tRNA, a fosforilase de dinucleosídeos tetrafosfatados, a transférase de guanilato do GTP, a transférase de guanilato do RNA mensageiro, as ligases de DNA e RNA de bacteriófago T4 e as transcríptases reversas de retrovírus (ver capítulos 1.4.c.1, 1.4.a.4, 1.4.d.1 e 1.4.d.2). Com a excepção da fosforilase de dinucleosídeos polifosfatados todas as outras enzimas têm um mecanismo catalítico em que um dos produtos é o PPI. Sem excepção é a formação comprovada ou presumida de um intermediário contendo um resíduo nucleotidato capaz de transferir este nucleotidato para um mononucleotídeo. Nos intermediários, o fosfato do resíduo nucleotidato transferido estará ligado directamente à enzima no caso da fosforilase dos dinucleosídeos tetrafosfatados, da transférase de guanilato do GTP, da transférase de guanilato do RNA mensageiro ou das ligases de DNA e RNA, a um ácido carboxílico no caso das sínteses de aminoacil-tRNA, da luciférase e da síntese de acetil-CoA e a um grupo hidroxilo (3') de uma cadeia de DNA no caso das transcríptases reversas.

Embora a síntese de mononucleosídeos polifosfatados não tenha sido comprovada de modo sistemático é de presumir que estes compostos também possam ser sintetizados, pelo menos *in vitro*, por acção catalítica destas mesmas enzimas. A ocorrência de polifosfatos, os aceitadores adequados nestes processos catalíticos, em muitos seres vivos incluindo mamíferos foi observada por vários investigadores [723, 727, 728], mas o significado fisiológico destes processos é ainda incerto. É possível que, no processo de síntese de mononucleosídeos polifosfatados, participem, *in vivo*, enzimas com mecanismos catalíticos distintos das envolvidas no processo de síntese dos dinucleosídeos polifosfatados. Como comprovado, *in vitro*, para o caso da cínase de adenilato e da cínase do 3-fosfoglicerato, a síntese de mononucleosídeos polifosfatados poderia ser também uma característica de enzimas que têm a

capacidade de formar intermediários contendo fosfato e de o transferir para substratos aceitadores.

A comprovada existência de mononucleosídeos polifosfatados nos seres vivos (ver capítulo 1.2) e a grande inespecificidade, no que se refere aos substratos aceitadores de nucleotidato, das enzimas referidas nos primeiros dois parágrafos deste subcapítulo poderia explicar a ocorrência de dinucleotídeos com um número de fosfatos internos superior a quatro [Artigo II]. O Ap_7A , recentemente descoberto nas plaquetas sanguíneas humanas [48], pode *in vitro* ser sintetizado por acção catalítica da luciférase [365] e é muito provável que outras enzimas da mesma superfamília, incluindo a síntese de acil-CoA de cadeia longa, tenham a mesma capacidade. Contudo, algo intrigante é a existência de Ap_2A em tecido miocárdico humano e porcino [59]. Apesar da grande inespecificidade (no que se refere ao substrato aceitador de nucleotidato) de todas as enzimas acima referidas até hoje nenhuma dessas enzimas se demonstrou capaz de aceitar como substrato o AMP ou qualquer outro NMP. Este é um novo desafio e atrevemo-nos a avançar a hipótese de que na síntese de Ap_2A participem enzimas em que já se demonstrou capacidade para sintetizar outros dinucleosídeos difosfatados; referimo-nos concretamente às pirofosforílasas do NAD^+ e do FAD (EC 2.7.7.1 e EC 2.7.7.2, respectivamente).

4— RESUMO E CONCLUSÕES

A crescente convicção de que os mono e os dinucleosídeos polifosfatados são moduladores intra e extracelulares de processos biológicos justifica o nosso interesse pela sua síntese.

Tendo sido formulada a hipótese de que a síntese dos dinucleosídeos polifosfatados poderia ser catalisada por enzimas capazes de formar acil-adenilatos com libertação concomitante de pirofosfato, estudámos esta possibilidade no caso concreto da síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* (EC 6.2.1.3). Demonstrámos que esta enzima catalisa a síntese de adenosina-5'-tetrafosfato (p_4A) e adenosina-5'-pentafofato (p_5A) a partir de ATP e tripolifosfato (P_3) ou tetrapolifosfato (P_4), respectivamente. O dATP, a adenosina-5'-O-[γ -tiotriofosfato] (ATP γ S), a adenosina(5')tetrafosfo(5')adenosina (Ap_4A) e a adenosina(5')pentafofo(5')adenosina (Ap_5A) também eram substratos da reacção, gerando, na presença de P_3 , p_4dA ou p_4A . O UTP, o CTP ou o AMP não eram dadores de nucleotídeo. Os valores de K_m para o ATP e o P_3 eram, nas condições de ensaio utilizadas, 0,015 e 1,3 mM, respectivamente. A actividade catalítica dependia da presença de catiões bivalentes e um máximo de velocidade foi obtida na presença de $MgCl_2$ ou $CoCl_2$ equimolecular com o somatório de ATP e P_3 . As velocidades relativas de síntese de p_4A com distintos catiões bivalentes foram: $Mg=Co>Mn=Zn>>Ca$. Um máximo e um mínimo de actividade foram medidos nos valores de pH de 5,5 e 8,2, respectivamente; o oposto foi observado no caso da actividade de síntese de palmitil-CoA, com um máximo a pH 8,2. A razão entre as actividades de síntese de palmitil-CoA e de p_4A era cerca de 10 (a pH 5,5) e cerca de 200 (a pH 8,2). A coenzima A inibia a síntese de p_4A e o seu efeito inibitório era antagonizado por ácidos gordos.

Com uma actividade muito mais baixa, a síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* também catalisava a síntese de Ap_4A (a partir de ATP), Ap_5A (a partir de p_4A) e adenosina(5')tetrafosfo(5')nucleosídeos (Ap_4N) a partir de dadores (ATP, ATP γ S ou octanoil-adenilato) e aceitadores de adenilato (NTP) adequados. A síntese de adenosina(5')hexafosfo(5')adenosina (Ap_6A) também foi obtida tirando partido da capacidade da enzima para catalisar a síntese do substrato aceitador necessário neste caso (p_5A a partir de ATP e P_4).

A aparente ausência de activação da reacção de síntese de p_4A pela adição de ácidos gordos por nós observada com a síntetase de acil-CoA de *Pseudomonas fragi* estava de acordo com observações semelhantes de outros autores que estudaram a reacção de troca ATP-pirofosfato catalisada pela síntetase de acil-CoA de fígado de rato. É, no entanto, intrigante que enzimas que presumida (caso da enzima de *Pseudomonas fragi*) ou comprovadamente (caso da enzima de rato) contêm os mesmos motivos estruturais que, noutras enzimas da mesma superfamília, estão envolvidos na formação de acil-adenilatos tenham estas características funcionais. É possível que o dador de adenilato seja um complexo E•acil-adenilato mas não excluimos a possibilidade de ser um complexo E-AMP. Em face das dúvidas que também existiam no caso do mecanismo de síntese de mono e dinucleosídeos polifosfatados por outra enzima da mesma superfamília — a luciférase de *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) — estudámos experimentalmente este mecanismo e esclarecemos a natureza do intermediário neste processo catalítico.

Demonstrámos, inequivocamente, que a luciférase catalisa a síntese de desidroluciferina e/ou desidroluciferil-adenilato usando ATP e luciferina como substratos. Esta reacção e a reacção de formação de oxiluciferina (com consequente emissão de luz) desenvolviam-se

simultaneamente. A presença de pirofosfatase favorecia a acumulação de desidroluciferil-adenilato porque prejudicava a sua pirofosforólise. O desidroluciferil-adenilato, que também se podia formar a partir de ATP e de desidroluciferina sintetizada quimicamente, era simultaneamente um potente inibidor da reacção de produção de luz e o principal intermediário na reacção de síntese de Ap_4A , mesmo quando o cofactor adicionado ao meio de ensaio era a luciferina. Em diferentes condições experimentais, a quantidade de desidroluciferil-adenilato sintetizado correlacionava-se positivamente com a síntese de Ap_4A .

A coenzima A, um conhecido estimulador da produção de luz, era um inibidor da síntese de Ap_4A . A coenzima A reagia com o complexo E-desidroluciferil-adenilato gerando desidroluciferil-CoA. Na presença de quantidades crescentes de coenzima A, a concentração estacionária de desidroluciferil-adenilato e a velocidade de síntese de Ap_4A diminuía paralelamente, quer quando o cofactor adicionado ao ensaio era a luciferina quer quando era a desidroluciferina sintetizada quimicamente. Porque a quantidade de desidroluciferil-adenilato formado a partir de luciferina era menor que a que se formava a partir de desidroluciferina sintetizada quimicamente, o efeito inibidor da coenzima A na síntese de Ap_4A era mais marcado quando o cofactor adicionado ao meio de ensaio era a luciferina.

O CTP e o UTP eram, como estimuladores da reacção de produção de luz, menos potentes que a coenzima A. Interpretamos este efeito como uma consequência da síntese de Ap_4C ou Ap_4U e formação concomitante de desidroluciferina, que é um inibidor menos potente que o desidroluciferil-adenilato consumido na reacção.

A análise por HPLC mostrou que a luciférase também catalisava a síntese de três compostos directamente relacionados com a reacção de produção de luz a partir de luciferina e ATP; um deles corresponderá à oxiluciferina e os outros dois são de natureza desconhecida.

5— SUMMARY AND CONCLUSIONS

The increasing conviction that mono and dinucleoside polyphosphates are intra and extracellular modulators of biological processes justify our interest in their synthesis.

Following the formulation of the hypothesis that the synthesis of dinucleoside polyphosphates could be catalyzed by enzymes that are able to form acyl-adenylates with concomitant release of pyrophosphate, we approached that possibility in the case of acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* (EC 6.2.1.3). As shown here this enzyme catalyzes the synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate (p₄A) and adenosine 5'-pentaphosphate (p₅A) from ATP and tripolyphosphate (P₃) or tetrapolyphosphate (P₄), respectively. dATP, adenosine-5'-O-[γ-thiotriphosphate] (ATPγS), adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (Ap₄A) and adenosine(5')pentaphospho(5')adenosine (Ap₅A) were also substrates of the reaction, yielding, in the presence of P₃, p₄dA or p₄A. UTP, CTP or AMP were not nucleotide donors. The K_m values for ATP and P₃ were, in the conditions of assay, 0.015 and 1.3 mM, respectively. The catalysis depended on the presence of divalent cations and maximum velocity was obtained in the presence of MgCl₂ or CoCl₂ equimolecular with the sum of ATP and P₃. The relative rates of synthesis of p₄A measured with other divalent cations were: Mg=Co>Mn=Zn>>Ca. Maximum and minimum activities were measured at pH values of 5.5 and 8.2, respectively; the opposite was observed for the synthesis of palmitoyl-CoA, with maximum activity at pH 8.2. The relative rate of synthesis of palmitoyl-CoA/p₄A was around 10 (at pH 5.5) and around 200 (at pH 8.2). Coenzyme A inhibited the synthesis of p₄A and its inhibitory effect was counteracted by fatty acids.

To a lesser extent, the acyl-CoA synthetase from *Pseudomonas fragi* also catalyzed the synthesis of Ap₄A (from ATP), Ap₅A (from p₄A) and adenosine(5')tetraphospho(5')nucleosides (Ap₄N) from adequate adenylyl donors (ATP, ATPγS or octanoyl-adenylate) and adequate adenylyl acceptors (NTP). The synthesis of adenosine(5')hexaphospho(5')adenosine (Ap₆A) was also obtained taking advantage of the capacity of the enzyme to catalyze the synthesis of the proper substrate acceptor needed (p₅A from ATP and P₄).

The apparent absence of activation of the reaction of synthesis of p₄A by added fatty acids that we observed using the acil-CoA synthetase of *Pseudomonas fragi* agreed with similar observations by other authors that studied the ATP-pyrophosphate exchange reaction catalyzed by rat liver acyl-CoA synthetase. Although, it is puzzling that enzymes that presumably (in the case of the *Pseudomonas fragi* enzyme) or undoubtedly (in the case of the rat enzyme) have the structural motives that, in other enzymes of the same superfamily, are involved in acyl-adenylates formation have these functional characteristics. The adenylylate donor could be an E•acyl-adenylate complex but we did not exclude the possibility of being an E-AMP complex. Facing the doubts that also existed in the case of the mechanism of synthesis of mono and dinucleoside polyphosphates by another enzyme of the same superfamily — the luciferase of *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) — we have studied experimentally this mechanism and clarified the nature of the intermediate in this catalytic process.

We have shown, unequivocally, that luciferase catalyses the synthesis of dehydroluciferin and/or dehydroluciferyl-adenylate using ATP and luciferin as substrates. This reaction and the reaction of formation of oxyluciferin (with consequent light emission) developed simultaneously. The presence of pyrophosphatase favored the accumulation of dehydroluciferyl-adenylate by impairing its pyrophosphorolysis. Dehydroluciferyl-adenylate,

which could also be formed from ATP and chemically synthesized dehydroluciferin, was both a potent inhibitor of the light producing reaction and the main intermediate in the reaction of synthesis of Ap₄A even when the cofactor added to the assay mixture was luciferin. In different experimental conditions the amount of dehydroluciferyl-adenylate synthesized was positively correlated with Ap₄A synthesis.

The coenzyme A, a known enhancer of light emission, was an inhibitor of the synthesis of Ap₄A. Coenzyme A reacted with the E•dehydroluciferyl-adenylate complex yielding dehydroluciferyl-CoA. In the presence of increasing amounts of coenzyme A, the steady-state concentration of dehydroluciferyl-adenylate and the velocity of synthesis of Ap₄A decreased in parallel, either when the cofactor added to the reaction mixture was luciferin or chemically synthesized dehydroluciferin. As the amount of dehydroluciferyl-adenylate formed from luciferin was less than that formed from chemically synthesized dehydroluciferin, the inhibitory effect of coenzyme A on the synthesis of Ap₄A was more pronounced when the cofactor added to the reaction mixture was luciferin.

CTP and UTP were, as enhancers of the light emission reaction, less potent than coenzyme A. We have interpreted this effect as a consequence of the synthesis of Ap₄C or Ap₄U and concomitant formation of dehydroluciferin, that is a less potent inhibitor than the dehydroluciferyl-adenylate consumed in the reaction.

As shown by HPLC, luciferase also catalysed the synthesis of three compounds directly related with the light production from luciferin and ATP; one of them could correspond to oxyluciferin and the other two are of unknown nature.

6— RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

La conviction croissante que les mono et les dinucléosides polyphosphatés sont des modulateurs intra et extracellulaires des processus biologiques justifie notre intérêt pour leur synthèse.

L'hypothèse que la synthèse des dinucléosides polyphosphatés pourrait être catalysée par des enzymes capables de former des acyl-adenylates avec libération concomitante de pyrophosphate ayant déjà été formulée, nous avons étudié cette possibilité dans le cas concret de la synthétase de l'acyl-CoA de *Pseudomonas fragi* (EC 6.2.1.3). Nous avons démontré que cette enzyme catalyse la synthèse de l'adénosine-5'-tétraphosphate (p_4A) et de l'adénosine-5'-pentaphosphate (p_5A) à partir d'ATP et de tripolyphosphate (P_3) ou tétrapolyphosphate (P_4), respectivement. Le dATP, l'adénosine-5'-O-[γ -thiotriphosphate] (ATP γ S), l'adénosine(5')tétraphospho-pho(5')adénosine (Ap_4A) et l'adénosine(5')pentaphospho(5')adénosine (Ap_5A) étaient aussi des substrats de la réaction, formant p_4dA ou p_4A , en présence de P_3 . L'UTP, le CTP ou l'AMP n'étaient pas donneurs de nucléotide. Les valeurs de K_m pour l'ATP et le P_3 étaient, dans les conditions d'essai utilisées, de 0,015 et de 1,3 mM, respectivement. L'activité catalytique dépendait de la présence de cations bivalents et un maximum de vitesse a été obtenue en présence de $MgCl_2$ ou de $CoCl_2$ équimoléculaire avec la somme d'ATP et de P_3 . Les vitesses relatives de synthèse de p_4A avec de différents cations bivalents ont été: $Mg=Co>Mn=Zn>>Ca$. Un maximum et un minimum d'activité ont été mesurés pour les valeurs de pH de 5,5 et de 8,2, respectivement; l'opposé a été observé dans le cas de l'activité de synthèse du palmitoyl-CoA, avec un maximum à pH 8,2. Le quotient entre les activités de synthèse de palmitoyl-CoA et de p_4A était d'environ 10 (à pH 5,5) et d'environ 200 (à pH 8,2). La coenzyme A inhibait la synthèse de p_4A et son effet inhibiteur était antagonisé par des acides gras.

Avec une activité beaucoup plus faible, la synthétase de l'acyl-CoA de *Pseudomonas fragi* catalysait aussi la synthèse de Ap_4A (à partir d'ATP), Ap_5A (à partir p_4A) et adénosine(5')tétraphospho(5')nucléosides (Ap_4N) à partir des donneurs (ATP, ATP γ S ou octanoyl-adenylate) et des accepteurs d'adenylate (NTP) adéquats. La synthèse de l'adénosine(5')hexaphospho(5')adénosine (Ap_6A) a aussi été obtenue en utilisant la capacité de l'enzyme pour catalyser la synthèse du substrat accepteur nécessaire dans ce cas (p_5A à partir d'ATP et de P_4).

L'apparente absence d'activation de la réaction de synthèse de p_4A par l'addition d'acides gras que nous avons observée était d'accord avec des observations similaires d'autres auteurs pour le cas de la réaction d'échange ATP-pyrophosphate catalysée par la synthétase d'acyl-CoA de foie de rat. Toutefois, il est énigmatique que des enzymes qui présumément (dans le cas de l'enzyme de *Pseudomonas fragi*) ou indubitablement (dans le cas de l'enzyme de rat) contiennent les motifs structurels qui, pour d'autres enzymes de la même superfamille, sont impliqués dans la formation d'acyl-adenylates aient ces caractéristiques fonctionnelles. Le donneur d'adenylate peut être un complexe E•acyl-adenylate mais nous n'excluons pas la possibilité que ce soit un complexe E-AMP. En ce qui concerne les doutes qui existaient aussi dans le cas du mécanisme de synthèse de mono et dinucléosides polyphosphatés par une autre enzyme de la même superfamille — la luciférase de *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) — nous avons étudié expérimentalement ce mécanisme et nous avons éclairci la nature de l'intermédiaire de ce processus catalytique.

Nous avons clairement démontré que la luciférase catalyse la synthèse de la déshydroluciférine et/ou déshydroluciféryl-adénylate en utilisant l'ATP et la luciférine comme substrats. Cette réaction et la réaction de formation de l'oxiluciférine (avec la conséquente émission de lumière) se développaient simultanément. La présence de pyrophosphatase favorisait l'accumulation de déshydroluciféryl-adénylate parce qu'elle empêchait sa pyrophospholyse. Le déshydroluciféryl-adénylate, qui pouvait aussi être formé à partir d'ATP et de déshydroluciférine synthétisée chimiquement, était simultanément un puissant inhibiteur de la réaction de production de lumière et le principal intermédiaire pour la réaction de synthèse de Ap_4A , même quand le cofacteur additionné au milieu d'essai était la luciférine. En différentes conditions expérimentales, la quantité de déshydroluciféryl-adénylate synthétisée montrait une corrélation positive avec la synthèse de Ap_4A .

La coenzyme A, un connu stimulateur de la production de lumière, était un inhibiteur de la synthèse de Ap_4A . La coenzyme A réagissait avec le complexe E-déshydroluciféryl-adénylate générant du déshydroluciféryl-CoA. En présence de quantités croissantes de coenzyme A, la concentration stationnaire de déshydroluciféryl-adénylate et la vitesse de synthèse de Ap_4A diminuaient parallèlement, aussi bien quand le cofacteur additionné à l'essai était la luciférine que quand c'était la déshydroluciférine synthétisée chimiquement. Parce que la quantité de déshydroluciféryl-adénylate formée à partir de luciférine était plus petite que celle qui se formait à partir de déshydroluciférine synthétisée chimiquement, l'effet inhibiteur du coenzyme A dans la synthèse de Ap_4A était plus marqué quand le cofacteur additionné au milieu d'essai était la luciférine.

Le CTP et l'UTP étaient, en tant que stimulateurs de la réaction de production de lumière, moins efficaces que le coenzyme A. Nous avons interprété cet effet comme une conséquence de la synthèse de Ap_4C ou de Ap_4U et la formation concomitante de déshydroluciférine, qui est un inhibiteur plus faible que le déshydroluciféryl-adénylate consommé dans la réaction.

L'analyse par HPLC a montré que la luciférase catalysait aussi la synthèse de trois substances directement liées à la réaction de production de lumière à partir de luciférine et d'ATP; l'une d'elles doit correspondre à l'oxiluciférine et les deux autres sont de nature inconnue.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- McLennan AG & Zamecnik PC. (1992) Dinucleoside polyphosphates - An introduction. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 1-7. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 2- Holler E. (1992) The chemistry of dinucleoside polyphosphates. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 9-28. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 3- Garrison PN & Barnes LD. (1992) Determination of dinucleoside polyphosphates. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 29-61. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 4- Plateau P & Blanquet S. (1992) Synthesis of NpnN' (n=3 or 4) *in vitro* and *in vivo*. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 63-79. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 5- Guranowski A & Sillero A. (1992) Enzymes cleaving dinucleoside polyphosphates. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 81-133. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 6- Kitzler JW, Farr SB & Ames BN. (1992) Intracellular functions of Ap_nN: prokaryotes. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 135-49. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 7- Remy P. (1992) Intracellular functions of Ap_nN: eukaryotes. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 151-204. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 8- Günther Sillero MA & Cameselle JC. (1992) Interactions of dinucleoside polyphosphates with enzymes and other proteins. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 205-28. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 9- Ogilvie A. (1992) Extracellular functions for Ap_nA. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 229-73. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 10- Warner AH. (1992) Diguanosine and related nonadenylated polyphosphates. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 275-303. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 11- Blackburn GM, Guo MJ & McLennan AG. (1992) Synthetic structural analogues of dinucleoside polyphosphates. In *Ap₄A and other Dinucleoside Polyphosphates*. Ed. por AG McLennan. Pág. 305-42. CRC Press. Boca Raton, Fl.
- 12- Sillero MAG, Villalba R, Moreno A, Quintanilla M, Lobatón CD & Sillero A. (1977) Dinucleosidetriphosphatase from rat liver. Purification and properties. *Eur J Biochem* **76**: 331-7.
- 13- Finamore FJ & Warner AH. (1963) The occurrence of P¹,P⁴-diguanosine 5'-tetraphosphate in the brine shrimp eggs. *J Biol Chem* **238**: 344-8.
- 14- Warner AH & Finamore FJ. (1965) Isolation, purification, and characterization of P¹, P³-diguanosine 5'-triphosphate from brine shrimp eggs. *Biochim Biophys Acta* **108**: 525-30.
- 15- Zamecnik PC & Stephenson ML. (1969) Nucleoside pyrophosphate compounds related to the first step in protein synthesis. In *Alfred Benzon Symposium*. Pág. 276-91. Elsevier Press. Amsterdam.
- 16- McLennan AG, Mayers E, Walker-Smith I & Chen H. (1995) Lanterns of the firefly *Photinus pyralis* contain abundant diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase activity. *J Biol Chem* **270**: 3706-9.
- 17- Jovanovic A, Jovanovic S, Mays DC, Lipsky JJ & Terzic A. (1998) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁵-pentaphosphate harbors the properties of a signaling molecule in the heart. *FEBS Lett* **423**: 314-8.
- 18- Vartanian A, Narovlyansky A, Amchenkova A, Turpaev K & Kisselev L. (1996) Interferons induce accumulation of diadenosine triphosphate (Ap₃A) in human cultured cells. *FEBS Lett* **381**: 32-4.
- 19- Ripoll C, Martín F, Rovira JM, Pintor J, Miras-Portugal MT & Soria B. (1996) Diadenosine polyphosphates. A novel class of glucose-induced intracellular messengers in the pancreatic β -cell. *Diabetes* **45**: 1431-4.
- 20- Rapaport E & Zamecnik PC. (1976) Presence of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) in mamalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible positive "pleiotypic activator". *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 3984-8.
- 21- Weinmann-Dorsch C, Hedl A, Grummt I, Albert W, Ferdinand FJ, Friis RR, Pierron G, Moll W & Grummt F. (1984) Drastic rise of intracellular adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine correlates with onset of DNA synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* **138**: 179-85.

- 22- Weinmann-Dorsch C, Pierron G, Wick R, Sauer H & Grummt F. (1984) High diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) level at initiation of S phase in the naturally synchronous mitotic cycle of *Physarum polycephalum*. *Exp Cell Res* **155**: 171-7.
- 23- Weinmann-Dorsch C & Grummt F. (1985) High diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) level in germ cells and embryos of sea urchin and *Xenopus* and its effect on DNA synthesis. *Exp Cell Res* **160**: 47-53.
- 24- Lee PC, Bochner BR & Ames BN. (1983) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate and related adenylylated nucleotides in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **258**: 6827-34.
- 25- Baltzinger M, Ebel JP & Remy P. (1986) Accumulation of dinucleoside polyphosphates in *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. High levels are associated with cell death. *Biochimie* **68**: 1231-6.
- 26- Baker JC & Jacobson MK. (1986) Alteration of adenylyl dinucleotide metabolism by environmental stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2350-2.
- 27- Lee PC, Bochner BR & Ames BN. (1983) AppppA, heat-shock stress, and cell oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 7496-500.
- 28- Plateau P, Fromant M & Blanquet S. (1987) Heat shock and hydrogen peroxide responses of *Escherichia coli* are not changed by dinucleoside tetraphosphate hydrolase overproduction. *J Bacteriol* **169**: 3817-20.
- 29- Coste H, Brevet A, Plateau P & Blanquet S. (1987) Non-adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates occur in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Escherichia coli* and accumulate upon temperature shift or exposure to cadmium. *J Biol Chem* **262**: 12096-103.
- 30- Guédon GF, Gilson GJP, Ebel JP, Befort NMT & Remy PM. (1986) Lack of correlation between extensive accumulation of bisnucleoside polyphosphates and the heat-shock response in eukaryotic cells. *J Biol Chem* **261**: 16459-65.
- 31- Bonaventura C, Cashion R, Colacino JM & Hilderman RH. (1992) Alteration of hemoglobin function by diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate and other alarmones. *J Biol Chem* **267**: 4652-7.
- 32- Garrison PN, Mathis SA & Barnes LD. (1989) Changes in diadenosine tetraphosphate levels in *Physarum polycephalum* with different oxygen concentrations. *J Bacteriol* **171**: 1506-12.
- 33- Meyer D, Moris G, Wolff CM, Befort N & Remy P. (1990) Significance of dinucleoside tetraphosphate production by cultured tumor cells exposed to the presence of ethanol. *Biochimie* **72**: 57-64.
- 34- Bochner BR, Lee PC, Wilson SW, Cutler CW & Ames BN. (1984) AppppA and related adenylylated nucleotides are synthesized as a consequence of oxidation stress. *Cell* **37**: 225-32.
- 35- Brevet A, Plateau P, Best-Belpomme M & Blanquet S. (1985) Variation of Ap₄A and other dinucleoside polyphosphates in stressed *Drosophila* cells. *J Biol Chem* **260**: 15566-70.
- 36- Martín F, Pintor J, Rovira JM, Ripoll C, Miras-Portugal MT & Soria B. (1998) Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel second messenger in stimulus-secretion coupling. *FASEB J* **12**: 1499-505.
- 37- Marrian DH. (1954) A new adenine nucleotide. *Biochim Biophys Acta* **13**: 278-81.
- 38- Sacks J. (1955) Adenosine pentaphosphate from commercial ATP. *Biochim Biophys Acta* **16**: 436.
- 39- Lieberman I. (1955) Identification of adenosine tetraphosphate from horse muscle. *J Am Chem Soc* **77**: 3373-5.
- 40- Small GD & Cooper C. (1966) Studies on the occurrence and biosynthesis of adenosine tetraphosphate. *Biochemistry* **5**: 26-33.
- 41- Jakubowski H. (1986) Sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by synthesis of adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2378-82.
- 42- Flodgaard H & Klenow H. (1982) Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *Biochem J* **208**: 737-42.
- 43- Lütjhe J & Ogilvie A. (1983) The presence of diadenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate (Ap₃A) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 253-60.
- 44- Kim BK, Chao FC, Leavitt R, Fauci AS, Meyers KM & Zamecnik PC. (1985) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate deficiency in blood platelets of the Chédiak-Higashi syndrome. *Blood* **66**: 735-7.
- 45- Günther Sillero MAG, Del Valle M, Zaera E, Michelena P, García AG & Sillero A. (1994) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells. *Biochimie* **76**: 404-9.
- 46- Schlüter H, Groß I, Bachmann J, Kaufmann R, van der Giet M, Tepel M, Nofer JR, Assmann G, Karas M, Jankowski J & Zidek W. (1998) Adenosine(5') oligophospho-(5') guanosines and guanosine(5') oligophospho-(5') guanosines in human platelets. *J Clin Invest* **101**: 682-8.

- 47- Jankowski J, Potthoff W, van der Giet M, Tepel M, Zidek W & Schlüter H. (1999) High-performance liquid chromatographic assay of the diadenosine polyphosphates in human platelets. *Anal Biochem* **269**: 72-8.
- 48- Jankowski J, Tepel M, van der Giet M, Tente IM, Henning L, Junker R, Zidek W & Schlüter H. (1999) Identification and characterization of P^1, P^7 -di(adenosine-5')-heptaphosphate from human platelets. *J Biol Chem* **274**: 23926-31.
- 49- Flodgaard H, Zamecnik PC, Meyers K & Klenow H. (1986) Diagnosis of storage pool deficiency by determination of diadenosine 5', 5''- P^1, P^4 -tetraphosphate in whole blood. *Thromb Res* **41**: 345-51.
- 50- Garrison PN & Barnes LD. (1984) Assay of adenosine 5'- P^1 -tetraphospho- P^4 -5'''-adenosine and adenosine 5'- P^1 -tetraphospho- P^4 -5'''-guanosine in *Physarum polycephalum* and other eukaryotes. An isocratic high-pressure liquid-chromatography method. *Biochem J* **217**: 805-11.
- 51- Schlüter H, Offers E, Brüggemann G, van der Giet M, Tepel M, Nordhoff E, Karas M, Spieker C, Witzel H & Zidek W. (1994) Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* **367**: 186-8.
- 52- Rodríguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG & Miras-Portugal MT. (1988) Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates - Ap_4A and Ap_5A - in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem* **51**: 1696-703.
- 53- Pintor J, Rotllán P, Torres M & Miras-Portugal MT. (1992) Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* **200**: 296-300.
- 54- Pintor J, Kowalewski HJ, Torres M, Miras-Portugal MT & Zimmermann H. (1992) Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the *Torpedo* electric organ. *Neurosci Res Commun* **10**: 9-15.
- 55- Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M & Miras-Portugal MT. (1992) Presence of diadenosine polyphosphates - Ap_4A and Ap_5A - in rat brain synaptic terminals. Ca^{2+} dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci Lett* **136**: 141-4.
- 56- van Dyke K, Robinson R, Urquilla P, Smith D, Taylor M, Trush M & Wilson M. (1977) An analysis of nucleotides and catecholamines in bovine medullary granules by anion exchange high pressure liquid chromatography and fluorescence. Evidence that most of the catecholamines in chromaffin granules are stored without associated ATP. *Pharmacology* **15**: 377-91.
- 57- Gualix J, Abal M, Pintor J & Miras-Portugal MT. (1996) Presence of ϵ -adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of ϵ -ATP. *FEBS Lett* **291**: 195-8.
- 58- Lee JW, Jeon SJ, Kong ID & Jeong SW. (1995) Identification of adenosine 5'-tetraphosphate in rabbit platelets and its metabolism in blood. *Kor J Physiol* **29**: 217-23.
- 59- Luo J, Jankowski J, Knobloch M, van der Giet M, Gardanis K, Russ T, Vahlensieck U, Neumann J, Schmitz W, Tepel M, Deng MC, Zidek W & Schlüter H. (1999) Identification and characterization of diadenosine 5', 5''- P^1, P^2 -diphosphate and diadenosine 5', 5''- P^1, P^3 -triphosphate in human myocardial tissue. *FASEB J* **13**: 695-705.
- 60- Sillero A & Günther Sillero MA. (1989) Purine nucleotide metabolism in *Artemia*. In Biochemistry and Cell Biology of *Artemia*. Ed por TH MacRae, JC Bagshaw & AH Warner. Pág. 95-111. CCR Press. Boca Raton, FL.
- 61- Hoyle CHV. (1990) Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function. *Gen Pharmacol* **21**: 827-31.
- 62- Kisselev LL, Justesen J, Wolfson AD & Frolova LY. (1998) Diadenosine oligophosphates (Ap_nA), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett* **427**: 157-63.
- 63- Baxi MD & Vishwanatha JK. (1995) Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance. *J Pharmacol Toxicol Methods* **33**: 121-8.
- 64- Miras-Portugal MT, Castro E, Mateo J & Pintor J. (1996) The diadenosine polyphosphate receptors: $P2D$ purinoceptors. In $P2$ purinoceptors: localization, function and transduction mechanisms. Ciba Foundation Symposium. Vol: 198. Pág. 35-52. Wiley. Chichester.
- 65- Miras-Portugal MT, Gualix J & Pintor J. (1998) The neurotransmitter role of diadenosine polyphosphates. *FEBS Lett* **430**: 78-82.
- 66- Ogilvie A, Bläsius R, Schulze-Lohoff E & Sterzel RB. (1996) Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules. *J Auton Pharmacol* **16**: 325-8.
- 67- Pintor J & Miras-Portugal MT. (1993) Diadenosine polyphosphates (Ap_xA) as new neurotransmitters. *Drug Dev Res* **28**: 259-62.

- 68- Pintor J & Miras-Portugal MT. (1995) P₂ purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *Gen Pharmacol* **26**: 229-35.
- 69- Pintor J, Hoyle CHV, Gualix J & Miras-Portugal MT. (1997) Diadenosine polyphosphates in central nervous system. *Neurosci Res Commun* **20**: 69-78.
- 70- Schlüter H, Tepel M & Zidek W. (1996) Vascular actions of diadenosine phosphates. *J Auton Pharmacol* **16**: 357-62.
- 71- Ralevic V & Burnstock G. (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Review* **50**: 413-92.
- 72- Jovanovic A, Alekseev AE & Terzic A. (1997) Intracellular diadenosine polyphosphates: a novel family of inhibitory ligands of the ATP-sensitive K⁺ channel. *Biochem Pharmacol* **54**: 219-25.
- 73- Flores NA, Stavrou BM, Sheridan DJ. (1999) The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* **42**: 15-26.
- 74- Renart MF, Renart J, Sillero MAG & Sillero A. (1976) Guanosine monophosphate reductase from *Artemia salina*: Inhibition by xanthosine monophosphate and activation by diguanosine tetraphosphate. *Biochemistry* **15**: 4962-6.
- 75- Spector T, Jones TE & Miller RL. (1979) Reaction mechanism and specificity of human GMP reductase. Substrates, inhibitors, activators, and inactivators. *J Biol Chem* **254**: 2308-15.
- 76- Fernández A, Costas MJ, Günther Sillero MA & Sillero A. (1984) Diadenosine tetraphosphate activates AMP deaminase from rat muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **121**: 155-61.
- 77- Delaney SM, Blackburn GM & Geiger JD. (1997) Diadenosine polyphosphates inhibit adenosine kinase activity but decrease levels of endogenous adenosine in rat brain. *Eur J Pharmacol* **332**: 35-42.
- 78- Worku Y & Newby AC. (1982) Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. *Biochem J* **205**: 503-10.
- 79- Pesi R, Turriani M, Allegrini S, Scolozzi C, Camici M, Ipata PL & Tozzi MG. (1994) The bifunctional cytosolic 5'-nucleotidase: regulation of the phosphotransferase and nucleotidase activities. *Arch Biochem Biophys* **312**: 75-80.
- 80- Pinto RM, Canales J, Günther Sillero MA & Sillero A. (1986) Diadenosine tetraphosphate activates cytosol 5'-nucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun* **138**: 261-7.
- 81- Itoh R & Yamada K. (1990) Pig lung 5'-nucleotidase: effect of diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate and its related compounds. *Int J Biochem* **22**: 231-8.
- 82- Marques AFP, Teixeira NA, Gambaretto C, Sillero A & Günther Sillero MA. (1998) IMP-GMP 5'-nucleotidase from rat brain: activation by polyphosphates. *J Neurochem* **71**: 1241-50.
- 83- Johnson MA & Fridland A. (1989) Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. *Mol Pharmacol* **36**: 291-5.
- 84- Pinto RM, Canales J, Faraldo A, Sillero A & Günther Sillero MA. (1987) Cytosol 5'-nucleotidase from *Artemia* embryos. Purification and properties. *Comp Biochem Physiol* **86B**: 49-53.
- 85- Faraldo A, Pinto RM, Canales J, Fernández A, Sillero A & Günther Sillero MA. (1983) Presence of two isozymes of adenylosuccinate synthetase in *Artemia salina* embryos. Purification and properties. *Comp Biochem Physiol* **75B**: 221-6.
- 86- Canales J, Fernández A, Faraldo A, Pinto RM, Sillero A & Günther Sillero MA. (1985) IMP dehydrogenase from *Artemia* embryos: molecular forms, purification and properties. *Comp Biochem Physiol* **81B**: 837-44.
- 87- Gu JG & Geiger JD. (1994) Effects of diadenosine polyphosphates on sodium nitroprusside-induced soluble guanylate cyclase activity in rat cerebellum. *Neurosci Lett* **169**: 185-7.
- 88- Turpaev K, Hartmann R, Kisselev L & Justesen J. (1997) Ap₃A and Ap₄A are primers for oligoadenylate synthesis catalyzed by interferon-inducible 2-5A synthetase. *FEBS Lett* **408**: 177-81.
- 89- Rapaport E, Zamecnik PC & Baril EF. (1981) Association of diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate binding protein with HeLa cell DNA polymerase α . *J Biol Chem* **256**: 12148-51.
- 90- Purich DL & Fromm HJ. (1972) Inhibition of rabbit skeletal muscle adenylate kinase by the transition state analogue, P¹,P⁴-di(adenosine-5')tetraphosphate. *Biochim Biophys Acta* **276**: 563-7.
- 91- Lienhard GE & Secemski IL. (1973) P¹,P⁵-di(adenosine-5')pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J Biol Chem* **248**: 1121-3.
- 92- Feldhaus P, Fröhlich T, Goody RS, Isakov M & Schirmer RH. (1975) Synthetic inhibitors of adenylate kinases in the assays for ATPases and phosphokinases. *Eur J Biochem* **57**: 197-204.

- 93- Bone R, Cheng YC & Wolfenden R. (1986) Inhibition of adenosine and thymidylate kinases by bisubstrate analogs. *J Biol Chem* **261**: 16410-3.
- 94- Orr RM, Davies LC, Stock JA, Taylor GA, Powles RL & Harrap KR. (1988) Inhibition of human leukaemic thymidylate kinase and L1210 ribonucleotide reductase by dinucleotides of adenosine and thymidine and their phosphonate analogues. *Biochem Pharmacol* **37**: 673-7.
- 95- Rotllán P & Miras-Portugal MT. (1985) Adenosine kinase from bovine adrenal medulla. *Eur J Biochem* **151**: 365-71.
- 96- Bone R, Cheng YC & Wolfenden R. (1986) Inhibition of thymidine kinase by P¹-(adenosine-5')-P⁵-(thymidine-5')-pentaphosphate. *J Biol Chem* **261**: 5731-5.
- 97- Ikeda S & Ives DH. (1985) Multisubstrate analogs for deoxynucleoside kinases. Use in novel affinity media applied to resolution of *Lactobacillus* enzymes. *J Biol Chem* **260**: 12659-64.
- 98- Ikeda S, Chakravarty R & Ives DH. (1986) Multisubstrate analogs for deoxynucleoside kinases. Triphosphate end products and synthetic bisubstrate analogs exhibit identical modes of binding and are useful probes for distinguishing kinetic mechanisms. *J Biol Chem* **261**: 15836-43.
- 99- Berry MB & Phillips GN Jr. (1998) Crystal structures of *Bacillus stearothermophilus* adenylate kinase with bound Ap₅A, Mg²⁺ Ap₅A, and Mn²⁺ Ap₅A reveal an intermediate lid position and six coordinate octahedral geometry for bound Mg²⁺ and Mn²⁺. *Proteins* **32**: 276-88.
- 100- Abele U & Schulz GE. (1995) High-resolution structures of adenylate kinase from yeast ligated with inhibitor Ap₅A, showing the pathway of phosphoryl transfer. *Protein Sci* **4**: 1262-71.
- 101- Müller CW & Schulz GE. (1992) Structure of the complex between adenylate kinase from *Escherichia coli* and the inhibitor Ap₅A refined at 1.9 Å resolution. A model for a catalytic transition state. *J Mol Biol* **224**: 159-77.
- 102- Berry MB, Meador B, Bilderback T, Liang P, Glaser M & Phillips GN Jr. (1994) The closed conformation of a highly flexible protein: the structure of *E. coli* adenylate kinase with bound AMP and AMPPNP. *Proteins* **19**: 183-98.
- 103- Lavie A, Konrad M, Brundiers R, Goody RS, Schlichting I & Reinstein J. (1998) Crystal structure of yeast thymidylate kinase complexed with the bisubstrate inhibitor P¹-(5'-adenosyl) P⁵-(5'-thymidyl) pentaphosphate (TP₅A) at 2.0 Å resolution: implications for catalysis and AZT activation. *Biochemistry* **37**: 3677-86.
- 104- Nealon DA. (1985) Relative inhibition of human adenylate kinase and creatine kinase isoenzymes by adenosine 5'-monophosphate and diadenosine pentaphosphate. *Clin Chem* **31**: 333-4.
- 105- Calbreath DF. (1992) Clinical chemistry: A fundamental text book. W. B. Saunders Company. Philadelphia.
- 106- Mörikofer-Zwey S & Walter P. (1989) Binding of ADP to rat liver cytosolic proteins and its influence on the ratio of free ATP/free ADP. *Biochem J* **259**: 117-24.
- 107- Tepel M, Bachmann J, Schlüter H & Zidek W. (1995) Diadenosine polyphosphate-induced increase in cytosolic free calcium in vascular smooth muscle cells. *J Hypertension* **13**: 1686-8.
- 108- Tepel M, Bachmann J, Schlüter H & Zidek W. (1996) Diadenosine polyphosphates increase cytosolic calcium and attenuate angiotensin-II-induced changes of calcium in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* **33**: 132-8.
- 109- Tepel M, Jankowski J, Schlüter H, Bachmann J, van der Giet M, Ruess C, Terliesner J & Zidek W. (1997) Diadenosine polyphosphates' action on calcium and vessel contraction. *Am J Hypertens* **10**: 1404-10.
- 110- Tepel M, Heidenreich S, Schlüter H, Beinlich A, Nofer JR, Walter M, Assmann G & Zidek W. (1996) Diadenosine polyphosphates induce transplasma membrane calcium influx in cultured glomerular mesangial cells. *Eur J Clin Invest* **26**: 1077-84.
- 111- Schlatter E, Ankorina I, Haxelmans S & Kleta R. (1995) Effects of diadenosine polyphosphates, ATP and angiotensin II on cytosolic Ca²⁺ activity and contraction of rat mesangial cells. *Pflügers Arch* **430**: 721-8.
- 112- Castro E, Pintor J & Miras-Portugal MT. (1992) Ca²⁺-stores mobilization by diadenosine tetraphosphate, Ap₄A, through a putative P_{2Y} purinoceptor in adrenal chromaffin cells. *Br J Pharmacol* **106**: 833-7.
- 113- Pintor J & Miras-Portugal MT. (1995) A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br J Pharmacol* **115**: 895-902.
- 114- Pivorun EB & Nordone A. (1996) Brain synaptosomes display a diadenosine tetraphosphate (Ap₄A)-mediated Ca²⁺ influx distinct from ATP-mediated influx. *J Neurosci Res* **44**: 478-89.

- 115- Usune S, Katsuragi T & Furukawa T. (1996) Effects of PPADS and suramin on contractions and cytoplasmic Ca^{2+} changes evoked by Ap_4A , ATP and α , β -methylene ATP in guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol* **117**: 698-702.
- 116- Green AK, Dixon CJ, McLennan AG, Cobbold PH & Fisher MJ. (1993) Adenine dinucleotide-mediated cytosolic free Ca^{2+} oscillations in single hepatocytes. *FEBS Lett* **322**: 197-200.
- 117- Stachon A, Stegemann H, Hohage H, Rahn KH & Schlatter E. (1998) Effects of diadenosine polyphosphates on the intracellular Ca^{2+} concentration in endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* **8**: 175-84.
- 118- Jiménez AI, Castro E, Delicado EG & Miras-Portugal MT. (1998) Potentiation of adenosine 5'-triphosphate calcium responses by diadenosine pentaphosphate in individual rat cerebellar astrocytes. *Neurosci Lett* **246**: 109-11.
- 119- Missiaen L, Parys JB, De Smedt H, Sienaert I, Sipma H, Vanlingen S, Maes K & Casteels R. (1997) Effect of adenine nucleotides on *myo*-inositol-1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Biochem J* **325**: 661-6.
- 120- Morii H & Makinose M. (1992) Adenosine(5')hexaphospho(5')adenosine stimulation of a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* **205**: 979-84.
- 121- Jankowski J, Schlüter H, Tepel M, Spieker C & Zidek W. (1997) Effect of diadenosine polyphosphates on Ca^{2+} ATPase activity. *J Mol Med* **75**: 674-7.
- 122- Jovanovic A & Terzic A. (1995) Diadenosine-hexaphosphate is an inhibitory ligand of myocardial ATP-sensitive K^+ channels. *Eur J Pharmacol* **286**: R1-2.
- 123- Jovanovic A, Alekseev AE & Terzic A. (1996) Cardiac ATP-sensitive K^+ channel: a target for diadenosine 5',5''- P^1 , P^5 -pentaphosphate. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **353**: 241-4.
- 124- Jovanovic A & Terzic A. (1996) Diadenosine tetraphosphate-induced inhibition of ATP-sensitive K^+ channels in patches excised from ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **117**: 233-5.
- 125- Winkler H & Westhead E. (1980) The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **5**: 1803-23.
- 126- Castillo CJF, Moro MA, Del Valle M, Sillero A, García AG & Sillero MAG. (1992) Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla. *J Neurochem* **59**: 723-32.
- 127- Gualix J, Fideu MD, Pintor J, Rotllán P, García-Carmona F & Miras-Portugal MT. (1997) Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *FASEB J* **11**: 981-90.
- 128- Pintor J, Porras A, Mora F & Miras-Portugal MT. (1993) Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates - Ap_4A and Ap_5A - from caudate putamen of conscious rat. *Neurosci Lett* **150**: 13-6.
- 129- Pintor J, Porras A, Mora F & Miras-Portugal MT. (1995) Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat. *J Neurochem* **64**: 670-6.
- 130- Busshardt E, Gerok W & Häussinger D. (1989) Regulation of hepatic parenchymal and non-parenchymal cell function by the diadenine nucleotides Ap_3A and Ap_4A . *Biochim Biophys Acta* **1010**: 151-9.
- 131- Lühje J & Ogilvie A. (1987) Catabolism of Ap_4A and Ap_3A in human serum. Identification of isoenzymes and their partial characterization. *Eur J Biochem* **169**: 385-8.
- 132- Lühje J & Ogilvie A. (1988) Catabolism of Ap_4A and Ap_3A in whole blood. The dinucleotides are long-lived signal molecules in the blood ending up as intracellular ATP in the erythrocytes. *Eur J Biochem* **173**: 241-5.
- 133- Torres M, Pintor J & Miras-Portugal MT. (1990) Presence of ectonucleotidases in cultured chromaffin cells: hydrolysis of extracellular adenine nucleotides. *Arch Biochem Biophys* **279**: 37-44.
- 134- Rodríguez-Pascual F, Torres M, Rotllán P & Miras-Portugal MT. (1992) Extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates, Ap_nA , by bovine chromaffin cells in culture. *Arch Biochem Biophys* **297**: 176-83.
- 135- Busse R, Ogilvie A & Pohl U. (1988) Vasomotor activity of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate in isolated arteries. *Am J Physiol* **254**: H828-32.
- 136- Pohl U, Ogilvie A, Lamontagne D & Busse R. (1991) Potent effects of Ap_3A and Ap_4A on coronary resistance and autacoid release of intact rabbit hearts. *Am J Physiol* **260**: H1692-7.
- 137- Hoyle CHV, Ziganshin AU, Pintor J & Burnstock G. (1996) The activation of P_1 - and P_2 -purinoceptors in the guinea-pig left atrium by diadenosine polyphosphates. *Br J Pharmacol* **118**: 1294-300.

- 138- Hourani SMO, Bailey SJ, Johnson CR & Tennant JP. (1998) Effects of adenosine 5'-triphosphate, uridine 5'-triphosphate, adenosine 5'-tetraphosphate and diadenosine polyphosphates in guinea-pig *taenia caeci* and rat colon *muscularis mucosae*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**: 464-73.
- 139- Ogilvie A, Lühje J, Pohl U & Busse R. (1989) Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. *Biochem J* **259**: 97-103.
- 140- Hilderman RH & Christensen EF. (1998) P¹,P⁴-diadenosine 5' tetraphosphate induces nitric oxide release from bovine aortic endothelial cells. *FEBS Lett* **427**: 320-4.
- 141- Craik KM, McLennan AG & Fisher MJ. (1993) Adenine dinucleotide-mediated activation of glycogen phosphorylase in isolated liver cells. *Cell Signal* **5**: 89-96.
- 142- Edgecombe M, McLennan AG & Fisher MJ. (1996) Characterization of the binding of diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) to rat liver cell membranes. *Biochem J* **314**: 687-93.
- 143- Blouse GE, Liu G & Hilderman RH. (1998) Characterization of ATP and P₂ agonists binding to the cardiac plasma membrane P¹,P⁴-diadenosine 5'-tetraphosphate receptor. *Biochim Biophys Acta* **1375**: 61-72.
- 144- Goldman SJ, Gordon EL & Slakey LL. (1986) Hydrolysis of diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-triphosphate (Ap₃A) by porcine aortic endothelial cells. *Circ Res* **59**: 362-6.
- 145- Harrison MJ & Brossmer R. (1975) Inhibition of platelet aggregation and the platelet release reaction by α . ω diadenosine polyphosphates. *FEBS Lett* **54**: 57-60.
- 146- Lühje J & Ogilvie A. (1984) Diadenosine triphosphate (Ap₃A) mediates human platelet aggregation by liberation of ADP. *Biochem Biophys Res Commun* **118**: 704-9.
- 147- Chao FC & Zamecnik P. (1984) Inhibition of platelet aggregation by Ap₄A. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **365**: 610.
- 148- Lühje J, Baringer J & Ogilvie A. (1985) Highly efficient induction of human platelet aggregation in heparinized platelet-rich plasma by diadenosine triphosphate (Ap₃A). *Thromb Haemost* **54**: 469-71.
- 149- Castro E, Torres M, Miras-Portugal MT & Gonzalez MP. (1990) Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells. *Br J Pharmacol* **100**: 360-4.
- 150- Chern Y, Herrera M, Kao LS & Westhead EW. (1987) Inhibition of catecholamine secretion from bovine chromaffin cells by adenine nucleotides and adenosine. *J Neurochem* **48**: 1573-6.
- 151- Stone TW & Perkins MN. (1981) Adenine dinucleotide effects on rat cortical neurones. *Brain Res* **229**: 241-5.
- 152- Pintor J, Puche JA, Gualix J, Hoyle CHV & Miras-Portugal MT. (1997) Diadenosine polyphosphates evoke Ca²⁺ transients in guinea-pig brain via receptors distinct from those for ATP. *J Physiol* **504**: 327-35.
- 153- Pintor J, Díaz-Hernández M, Bustamante C, Gualix J, de Terreros FJG & Miras-Portugal MT. (1999) Presence of dinucleotide and ATP receptors in human cerebrocortical synaptic terminals. *Eur J Pharmacol* **366**: 159-65.
- 154- Pintor J, Gualix J & Miras-Portugal MT. (1997) Diinosine polyphosphates, a group of dinucleotides with antagonistic effects on diadenosine polyphosphate receptor. *Mol Pharmacol* **51**: 277-84.
- 155- Guranowski A, Starzynska E, Günther-Sillero MA & Sillero A. (1995) Conversion of adenosine(5') oligophospho(5') adenosines into inosine(5') oligophospho(5') inosines by non-specific adenylyate deaminase from the snail *Helix pomatia*. *Biochim Biophys Acta* **1243**: 78-84.
- 156- Rubino A & Burnstock G. (1996) Possible role of diadenosine polyphosphates as modulators of cardiac sensory-motor neurotransmission in guinea-pigs. *J Physiol* **495**: 515-23.
- 157- Ziganshin AU, Hoyle CHV, Ziganshina LE & Burnstock G. (1995) Prejunctional inhibition of cholinergic neuromuscular transmission in the guinea-pig ileum by diadenosine polyphosphates. *Br J Pharmacol* **114**: 440P.
- 158- Hoyle CHV, Postorino A & Burnstock G. (1995) Pre- and postjunctional effects of diadenosine polyphosphates in the guinea-pig vas deferens. *J Pharm Pharmacol* **47**: 926-31.
- 159- Davies G, MacAllister RJ, Bogle RG & Vallance P. (1995) Effect of diadenosine phosphates on human umbilical vessels: novel platelet-derived vasoconstrictors. *Br J Clin Pharmacol* **40**: 170-2.
- 160- Ralevic V, Hoyle CHV & Burnstock G. (1995) Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. *J Physiol* **483**: 703-13.
- 161- van der Giet M, Khattab M, Börgel J, Schlüter H & Zidek W. (1997) Differential effects of diadenosine phosphates on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. *Br J Pharmacol* **120**: 1453-60.

- 162- van der Giet M, Jankowski J, Schlüter H, Zidek W & Tepel M. (1998) Mediation of the vasoactive properties of diadenosine tetraphosphate via various purinoceptors. *J Hypertension* **16**: 1939-43.
- 163- Kikuta Y, Sekine A, Tezuka S, Okada K, Yamaura T & Nakajima H. (1994) Intravenous diadenosine tetraphosphate in dogs. Cardiovascular effects and influence on blood gases. *Acta Anaesthesiol Scand* **38**: 284-8.
- 164- Kitakaze M, Sekine A, Yamaura T, Nakajima H & Hori M. (1995) A novel endogenous vasoactive substance, diadenosine tetraphosphate (Ap₄A), produced in the ischemic heart as a new vasodilatory mediator. *Circulation* **92**: I238.
- 165- Node K, Funaya H, Sekine A, Yamaura T & Nakajima H. (1995) A novel endogenous adenine nucleotide, diadenosine tetraphosphate (Ap₄A), mediates cardioprotection against ischemia and reperfusion injury in the canine heart. *Circulation* **92**: I524-5.
- 166- Nakae I, Takahashi M, Takaoka A, Liu Q, Matsumoto T, Amano M, Sekine A, Nakajima H & Kinoshita M. (1996) Coronary effects of diadenosine tetraphosphate resemble those of adenosine in anesthetized pigs: involvement of ATP-sensitive potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* **28**: 124-33.
- 167- Hilderman RH, Wiest DB, Blackwell B, Hodgson EE & Swindle MM. (1997) The role of P¹,P⁴-diadenosine 5'-tetraphosphosphate as a vasodilator. *Am J Hypertens* **10**: 94A.
- 168- Gardiner SM, Kemp PA, March JE & Bennett T. (1994) Regional haemodynamic effects of diadenosine phosphates in conscious rats. *Br J Pharmacol* **113**: 90P.
- 169- Kikuta Y, Ohiwa E, Okada K, Watanabe A & Haruki S. (1999) Clinical application of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A:F-1500) for controlled hypotension. *Acta Anaesthesiol Scand* **43**: 82-6.
- 170- Stone TW. (1981) Actions of adenine dinucleotides on the vas deferens, guinea-pig *taenia caeci* and bladder. *Eur J Pharmacol* **75**: 93-102.
- 171- MacKenzie I, Kirkpatrick KA & Burnstock G. (1988) Comparative study of the actions of Ap₅A and α , β -methylene ATP on nonadrenergic, noncholinergic neurogenic excitation in the guinea-pig vas deferens. *Br J Pharmacol* **94**: 699-706.
- 172- Bailey SJ & Hourani SMO. (1995) Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol* **114**: 1125-32.
- 173- Westfall TD, McIntyre CA, Obeid S, Bowes J, Kennedy C & Sneddon P. (1997) The interaction of diadenosine polyphosphates with P_{2X}-receptors in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol* **121**: 57-62.
- 174- Hoyle CHV, Pintor J, Gualix J & Miras-Portugal MT. (1997) Antagonism of P_{2X} receptors in guinea-pig vas deferens by diinosine pentaphosphate. *Eur J Pharmacol* **333**: R1-2.
- 175- Hoyle CHV, Chapple C & Burnstock G. (1989) Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P_{2X}-purinoceptors and for purinergic transmission. *Eur J Pharmacol* **174**: 115-8.
- 176- Heidenreich S, Tepel M, Schlüter H, Harrach B & Zidek W. (1995) Regulation of rat mesangial cell growth by diadenosine phosphates. *J Clin Invest* **95**: 2862-7.
- 177- Schulze-Lohoff E, Zanner S, Ogilvie A & Sterzel RB. (1995) Vasoactive diadenosine polyphosphates promote growth of cultured renal mesangial cells. *Hypertension* **26**: 899-904.
- 178- Vahlensieck U, Bokník P, Gombosová I, Huke S, Knapp J, Linck B, Lüß H, Müller FU, Neumann J, Deng MC, Scheld HH, Jankowski H, Schlüter H, Zidek W, Zimmermann N & Schmitz W. (1999) Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) in human and animal cardiac preparations. *J Pharmacol Exp Ther* **288**: 805-13.
- 179- Vahlensieck U, Bokník P, Knapp J, Linck B, Müller FU, Neumann J, Herzig S, Schlüter H, Zidek W, Deng MC, Scheld HH & Schmitz W. (1996) Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (Ap₆A) via A₁-adenosine receptors. *Br J Pharmacol* **119**: 835-44.
- 180- Neumann J, Meissner A, Bokník P, Gombosová I, Knapp J, Lüss H, Müller FU, Schlüter H, Zidek W, Rolf N, Van Aken H, Vahlensieck U & Schmitz W. (1999) Inotropic effects of diadenosine tetraphosphate in isolated canine cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol* **33**: 151-6.
- 181- Keppens S. (1996) Effects of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate on rat liver cells. Differences and similarities with ADP and ATP. *Biochem Pharmacol* **52**: 441-5.
- 182- Edgecombe M, Craddock HS, Smith DC, McLennan AG & Fisher MJ. (1997) Diadenosine polyphosphate-stimulated gluconeogenesis in isolated rat proximal tubules. *Biochem J* **323**: 451-6.
- 183- Schlatter E, Haxelmans S, Ankorina I & Kleta R. (1995) Regulation of Na⁺/H⁺ exchange by diadenosine polyphosphates, angiotensin II, and vasopressin in rat cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* **6**: 1223-9.

- 184- Gasmi L, McLennan AG & Edwards SW. (1994) Priming of the respiratory burst of human neutrophils by the diadenosine polyphosphates, Ap₄A and Ap₃A: role of intracellular calcium. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 218-24.
- 185- Gasmi L, McLennan AG & Edwards SW. (1996) The diadenosine polyphosphates Ap₃A and Ap₄A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil:platelet interactions during inflammation. *Blood* **87**: 3442-9.
- 186- Gasmi L, McLennan AG & Edwards SW. (1996) Neutrophil apoptosis is delayed by the diadenosine polyphosphates, Ap₃A and Ap₆A: synergism with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br J Haematol* **95**: 637-9.
- 187- Pintor J, King BF, Miras-Portugal MT & Burnstock G. (1996) Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X₂ and P2Y₁ purinoceptors. *Br J Pharmacol* **119**: 1006-12.
- 188- Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF & Burnstock G. (1998) Molecular cloning and characterization of rat P2Y₄ nucleotide receptor. *Br J Pharmacol* **124**: 428-30.
- 189- Wildman SS, Brown SG, King BF & Burnstock G. (1999) Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits. *Eur J Pharmacol* **367**: 119-23.
- 190- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC & Harden TK. (1995) Pharmacological selectivity of the cloned human P_{2U}-purinoceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br J Pharmacol* **116**: 1619-27.
- 191- Boyer JL, Waldo GL, Harden TK. (1997) Molecular cloning and expression of an avian G protein-coupled P2Y receptor. *Mol Pharmacol* **52**: 928-34.
- 192- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA & Surprenant A. (1995) Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P_{2X} purinoceptors). *Mol Pharmacol* **48**: 178-83.
- 193- Pintor J, Torres M, Castro E & Miras-Portugal MT. (1991) Characterization of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) binding sites in cultured chromaffin cells: evidence for a P_{2y} site. *Br J Pharmacol* **103**: 1980-4.
- 194- Klishin A, Lozovaya N, Pintor J, Miras-Portugal MT & Krishtal O. (1994) Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus. *Neuroscience* **58**: 235-6.
- 195- Gasmi L, McLennan AG & Edwards SW. (1997) Diadenosine polyphosphates induce intracellular Ca²⁺ mobilization in human neutrophils via a pertussis toxin sensitive G-protein. *Immunology* **90**: 154-9.
- 196- Pintor J, Díaz-Rey MA & Miras-Portugal MT. (1993) Ap₄A and ADP-β-S binding to P₂ purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br J Pharmacol* **108**: 1094-9.
- 197- Burnstock G. (1990) Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* **603**: 1-18.
- 198- Dalziel HH & Westfall DP. (1994) Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Review* **46**: 449-66.
- 199- Abbracchio MP & Burnstock G. (1994) Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **64**: 445-75.
- 200- Linden J. (1998) Purinergic systems. In *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. Ed. por GJ Siegel, BW Agranoff, RW Albers, SK Fisher & MD Uhler. Pág. 348-62. Raven Press. New York.
- 201- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Dubyak GR, Harden TK, Jacobson KA, Schwabe U & Williams M. (1997) Towards a revised nomenclature for P1 and P2 receptors. *Trends Pharmacol Sci* **18**: 79-82.
- 202- Burnstock G. (1997) The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* **36**: 1127-39.
- 203- Panchenko VA, Pintor J, Tsyndrenko AY, Miras-Portugal MT & Krishtal OA. (1996) Diadenosine polyphosphates selectively potentiate N-type Ca²⁺ channels in rat central neurons. *Neuroscience* **70**: 353-60.
- 204- Rodríguez-Pascual F, Cortes R, Torres M, Palacios JM & Miras-Portugal MT. (1997) Distribution of [³H]diadenosine tetraphosphate binding sites in rat brain. *Neuroscience* **77**: 247-55.
- 205- Hilderman RH, Martin M, Zimmerman JK & Pivorun EB. (1991) Identification of a unique membrane receptor for adenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate. *J Biol Chem* **266**: 6915-8.
- 206- Walker J, Bossman P, Lackey BR, Zimmerman JK, Dimmick MA & Hilderman RH. (1993) The adenosine 5', 5'', P₁,P₄ - tetraphosphate receptor is at the cell surface of heart cells. *Biochemistry* **32**: 14009-14.

- 207- Walker J & Hilderman RH. (1993) Identification of a serine protease which activates the mouse heart adenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate receptor. *Biochemistry* **32**: 3119-23.
- 208- Walker J, Lewis TE, Pivorun EP & Hilderman RH. (1993) Activation of the mouse heart adenosine 5',5''',P₁-P₄-tetraphosphate receptor. *Biochemistry* **32**: 1264-9.
- 209- Hilderman RH, Lilien JE, Zimmerman JK, Tate DH, Dimmick MA & Jones GB. (1994) Adenylated dinucleotide binding to the adenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate mouse heart receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **200**: 749-55.
- 210- Sen RP, Delicado EG, Castro E & Miras-Portugal MT. (1993) Effect of P_{2Y} agonists on adenosine transport in cultured chromaffin cells. *J Neurochem* **60**: 613-9.
- 211- Shinozuka K, Bjur RA & Westfall DP. (1988) Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **338**: 221-7.
- 212- Schlüter H, Jankowski J, Tepel M, van der Giet & Zidek W. (1997) The role of diadenosine polyphosphates in the pathogenesis of hypertension. *J Hypertension* **15**: S9.
- 213- Louie S, Kim BK & Zamecnik P. (1988) Diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate, a potential antithrombotic agent. *Thromb Res* **49**: 557-65.
- 214- Guranowski A, Biryukov A, Tarusova NB, Khomutov RM & Jakubowski H. (1987) Phosphonate analogues of diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate as substrates or inhibitors of procaryotic and eucaryotic enzymes degrading dinucleoside tetraphosphates. *Biochemistry* **26**: 3425-9.
- 215- Guranowski A, Starzynska E, Taylor GE & Blackburn GM. (1989) Studies on some specific Ap₄A-degrading enzymes with the use of various methylene analogues of P₁,P₄-bis-(5',5'''-adenosyl) tetraphosphate. *Biochem J* **262**: 241-4.
- 216- McLennan AG, Taylor GE, Prescott M & Blackburn GM. (1989) Recognition of β β'-substituted and αβ,αβ'-disubstituted phosphonate analogues of bis(5'-adenosyl) tetraphosphate by the bis(5'-nucleosidyl)-tetraphosphate pyrophosphohydrolases from *Artemia* embryos and *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**: 3868-75.
- 217- Blackburn GM, Taylor GE, Thatcher GRJ, Prescott M & McLennan AG. (1987) Synthesis and resistance to enzymic hydrolysis of stereochemically-defined phosphonate and thiophosphate analogues of P₁,P₄-bis(5'-adenosyl) tetraphosphate. *Nucleic Acids Res* **15**: 6991-7004.
- 218- Kim BK, Zamecnik P, Taylor G, Guo MJ & Blackburn GM. (1992) Antithrombotic effect of β,β'-monochloromethylene diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 11056-8.
- 219- Chan SW, Gallo SJ, Kim BK, Guo MJ, Blackburn GM & Zamecnik PC. (1997) P₁,P₄-dithio-P₂,P₃-monochloromethylene diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate: a novel antiplatelet agent. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4034-9.
- 220- Zamecnik PC, Kim B, Gao MJ, Taylor G & Blackburn GM. (1992) Analogues of diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate (Ap₄A) as potential anti-platelet-aggregation agents. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2370-3.
- 221- Grummt F. (1978) Diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate triggers initiation of *in vitro* DNA replication in baby hamster kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 371-5.
- 222- Grummt F, Walzl G, Jantzen HM, Hamprecht K, Huebscher U & Kuenzle CC. (1979) Diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate, a ligand of the 57-kilodalton subunit of DNA polymerase α. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 6081-5.
- 223- Rapaport E, Zamecnik PC & Baril EF. (1981) HeLa cell DNA polymerase α is tightly associated with tryptophanyl-tRNA synthetase and diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate binding activities. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 838-42.
- 224- Zamecnik P. (1983) Diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate (Ap₄A): its role in cellular metabolism. *Anal Biochem* **134**: 1-10.
- 225- Rapaport E & Feldman L. (1984) Adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine-binding protein of calf thymus. *Eur J Biochem* **138**: 111-5.
- 226- Edwards MJ & Kaufmann WK. (1982) Replicative DNA synthesis in permeable fibroblasts from normal individuals and ataxia-telangiectasia patients. *Biochim Biophys Acta* **721**: 223-5.
- 227- Ono K, Iwata Y, Nakamura H & Matsukage A. (1980) Selective inhibition of terminal deoxynucleotidyl transferase by diadenosine 5',5''',P₁,P₄-tetraphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **95**: 34-40.
- 228- Andersson M & Lewan L. (1988) Early increase in diadenosine tetraphosphate in regenerating rat liver. *Exp Cell Res* **175**: 414-8.

- 229- Andersson M. (1989) Diadenosine tetraphosphate (Ap₄A): its presence and functions in biological systems. *Int J Biochem* **21**: 707-14.
- 230- Chen J, Brevet A, Blanquet S & Plateau P. (1998) Control of 5',5'-dinucleoside triphosphate catabolism by APH1, a *Saccharomyces cerevisiae* analog of human FHIT. *J Bacteriol* **180**: 2345-9.
- 231- Morioka M & Shimada H. (1985) Change in the cellular level of Ap₄A is correlated with the initiation of DNA replication in sea urchin embryos. *Dev Biol* **112**: 261-3.
- 232- McLennan AG & Prescott M. (1984) Diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate in developing embryos of *Artemia*. *Nucleic Acids Res* **12**: 1609-19.
- 233- Garrison PN, Mathis SA & Barnes LD. (1986) *In vivo* levels of diadenosine tetraphosphate and adenosine tetraphospho-guanosine in *Physarum polycephalum* during the cell cycle and oxidative stress. *Mol Cell Biol* **6**: 1179-86.
- 234- Moris G, Meyer D, Orfanoudakis G, Befort N, Ebel JP & Remy P. (1987) Dinucleoside tetraphosphate variations in cultured tumor cells during their cell cycle and growth. *Biochimie* **69**: 1217-25.
- 235- Cohen AJ, Li FP, Berg S, Marchetto DJ, Tsai S, Jacobs SC & Brown RS. (1979) Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med* **301**: 592-5.
- 236- Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Siprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM & Huebner K. (1996) The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* **84**: 587-97.
- 237- Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K & Croce CM. (1996) The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* **85**: 17-26.
- 238- Druck T, Hadaczek P, Fu TB, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue H, Croce CM & Huebner K. (1997) Structure and expression of human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res* **57**: 504-12.
- 239- Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K & Croce CM. (1996) FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9770-5.
- 240- Negrini M, Monaco C, Vorechovsky I, Ohta M, Druck T, Baffa R, Huebner K & Croce CM. (1996) The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res* **56**: 3173-79.
- 241- Hendricks DT, Taylor R, Reed M & Birrer MJ. (1997) FHIT gene expression in human ovarian, endometrial, and cervical cancer cell lines. *Cancer Res* **57**: 2112-5.
- 242- Gemma A, Hagiwara K, Ke Y, Burke LM, Khan MA, Nagashima M, Bennett WP & Harris CC. (1997) FHIT mutations in human primary gastric cancer. *Cancer Res* **57**: 1435-7.
- 243- Huebner K, Hadaczek P, Siprashvili Z, Druck T & Croce CM. (1997) The FHIT gene, a multiple tumor suppressor gene encompassing the carcinogen sensitive chromosome fragile site, FRA3B. *Biochim Biophys Acta* **1332**: M65-70.
- 244- Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M & Huebner K. (1996) Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5''-P¹,P³-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* **35**: 11529-35.
- 245- Lobatón CD, Sillero MAG & Sillero A. (1975) Diadenosine triphosphate splitting by rat liver extracts. *Biochem Biophys Res Commun* **67**: 279-86.
- 246- Siprashvili Z, Sozzi G, Barnes LD, McCue P, Robinson AK, Eryomin V, Sard L, Tagliabue E, Greco A, Fusetti L, Schwartz G, Pierotti MA, Croce CM & Huebner K. (1997) Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 13771-6.
- 247- Pace HC, Garrison PN, Robinson AK, Barnes LD, Draganescu A, Rösler A, Blackburn GM, Siprashvili Z, Croce CM, Huebner K & Brenner C. (1998) Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of Fhit-substrat complexes as the active signaling form of Fhit. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5484-9.
- 248- Guedon G, Sovia D, Ebel JP, Befort N & Remy P. (1985) Effect of diadenosine tetraphosphate microinjection on heat shock protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J* **4**: 3743-9.
- 249- Miller D & McLennan AG. (1986) Changes in intracellular levels of Ap₃A and Ap₄A in cysts and larvae of *Artemia* do not correlate with changes in protein synthesis after heat-shock. *Nucleic Acids Res* **14**: 6031-40.
- 250- Farr SB, Arnosti DN, Chamberlin MJ & Ames BN. (1989) An *apaH* mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5010-4.

- 251- Vallejo CG, Sillero MAG & Sillero A. (1974) Diguanosinetetraphosphate guanylohydrolase in *Artemia salina*. *Biochim Biophys Acta* **358**: 117-25.
- 252- Lobatón CD, Vallejo CG, Sillero A & Sillero MAG. (1975) Diguanosinetetraphosphatase from rat liver: activity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. *Eur J Biochem* **50**: 495-501.
- 253- Cameselle JC, Costas MJ, Sillero MAG & Sillero A. (1982) Bis-(5'-guanosyl) tetraphosphatase in rat tissues. *Biochem J* **201**: 405-10.
- 254- Moreno A, Lobatón CD, Sillero MAG & Sillero A. (1982) Dinucleosidetetraphosphatase from Ehrlich ascites tumour cells: inhibition by adenosine, guanosine and uridine 5'-tetraphosphates. *Int J Biochem* **14**: 629-34.
- 255- Höhn M, Albert W & Grummt F. (1982) Diadenosine tetraphosphate hydrolase from mouse liver. Purification to homogeneity and partial characterization. *J Biol Chem* **257**: 3003-6.
- 256- Costas MJ, Pinto RM, Fernández A, Canales J, García-Agúndez JA & Cameselle JC. (1990) Purification to homogeneity of rat liver dinucleoside tetraphosphatase by affinity elution with adenosine 5'-tetraphosphate. *J Biochem Biophys Methods* **21**: 25-33.
- 257- Pinto RM, Costas MJ, Fernández A, Canales J, García-Agúndez JA & Cameselle JC. (1991) Dinucleoside tetraphosphatase from human blood cells. Purification and characterization as a high specific activity enzyme recognized by an anti-rat tetraphosphatase antibody. *FEBS Lett* **287**: 85-8.
- 258- Lazewska D, Starzynska E & Guranowski A. (1993) Human placental (asymmetrical) diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolase: purification to homogeneity and some properties. *Protein Expr Purif* **4**: 45-51.
- 259- Ramos A & Rotllán P. (1995) Specific dinucleoside polyphosphate cleaving enzymes from chromaffin cells: a fluorimetric study. *Biochim Biophys Acta* **1253**: 103-11.
- 260- Hankin S, Wintero AK & McLennan AG. (1997) Molecular cloning of diadenosine tetraphosphatase from pig small intestinal mucosa and identification of sequence blocks common to diadenosine polyphosphate hydrolases and phosphorylases. *Int J Biochem Cell Biol* **29**: 317-23.
- 261- Günther Sillero MA, Madrid O, Zaera E & Sillero A. (1997) 2',3'-dideoxynucleoside triphosphates (ddNTP) and di-2',3'-dideoxynucleoside tetraphosphates (ddNp₄ddN) behave differently to the corresponding NTP and Np₄N counterparts as substrates of firefly luciferase, dinucleoside tetraphosphatase and phosphodiesterases. *Biochim Biophys Acta* **1334**: 191-9.
- 262- Cameselle JC, Costas MJ, Günther Sillero MA & Sillero A. (1984) Two low *K_m* hydrolytic activities on dinucleoside 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphates in rat liver. Characterization as the specific dinucleoside tetraphosphatase and a phosphodiesterase I-like enzyme. *J Biol Chem* **259**: 2879-85.
- 263- Ignarro LJ, Gross RA & Gross DM. (1976) Inhibition of mammalian soluble guanylate cyclase activity by adenosine 5'-tetraphosphate, guanosine 5'-tetraphosphate and other nucleotides. *J Cyclic Nucleotide Res* **2**: 337-46.
- 264- Ignarro LJ & Gross RA. (1978) Stimulation of mammalian adenylate cyclase activity with guanosine 5'-tetraphosphate and other guanine nucleotides. *Biochim Biophys Acta* **541**: 170-80.
- 265- Lee JW, Kong ID, Park KS & Jeong SW. (1995) Effects of adenosine tetraphosphate (ATPP) on vascular tone in the isolated rat aorta. *Yonsei Med J* **36**: 487-96.
- 266- Orre M, Pennefather JN, Story ME & Haynes JM. (1996) The effects of P₂ purinoceptor agonists on the isolated portal vein of the guinea pig. *Eur J Pharmacol* **316**: 229-36.
- 267- Moreno A, Vallejo CG, Sillero A & Sillero MAG. (1975) Wide occurrence of guanosine 5'-tetraphosphate in commercial preparations of GTP. *Anal Biochem* **68**: 648-50.
- 268- Costas MJ, Cameselle JC, Günther Sillero MA & Sillero A. (1983) Presence of cytidine 5'-tetraphosphate in commercial samples of cytidine 5'-triphosphate. *Anal Biochem* **134**: 455-8.
- 269- Hankin S, Matthew N, Thorne H & McLennan AG. (1995) Diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolase is present in human erythrocytes, leukocytes and platelets. *Int J Biochem Cell Biol* **27**: 201-6.
- 270- Rotllán P, Rodríguez-Ferrer CR, Asensio AC & Oaknin S. (1998) Potent inhibition of specific diadenosine polyphosphate hydrolases by suramin. *FEBS Lett* **429**: 143-6.
- 271- Maksel D, Guranowski A, Ilgoutz SC, Moir A, Blackburn MG & Gayler KR. (1998) Cloning and expression of diadenosine 5',5''-P¹,P⁴-tetraphosphate hydrolase from *Lupinus angustifolius* L. *Biochem J* **329**: 313-9.

- 272- McLennan AG, Mayers E, Hankin S, Thorne NM, Prescott M & Powls R. (1994) The green alga *Scenedesmus obliquus* contains both diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (asymmetrical) pyrophosphohydrolase and phosphorylase activities. *Biochem J* **300**: 183-9.
- 273- Costas MJ, Cameselle JC & Sillero A. (1986) Mitochondrial location of rat liver dinucleoside triphosphatase. *J Biol Chem* **261**: 2064-7.
- 274- Vallejo CG, Lobatón CD, Quintanilla M, Sillero A & Sillero MAG. (1976) Dinucleosidasetetraphosphatase in rat liver and *Artemia salina*. *Biochim Biophys Acta* **438**: 304-9.
- 275- Prescott M, Milne AD & McLennan AG. (1989) Characterization of the bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphate pyrophosphohydrolase from encysted embryos of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem J* **259**: 831-8.
- 276- Jakubowski H & Guranowski A. (1983) Enzymes hydrolyzing ApppA and/or AppppA in higher plants. Purification and some properties of diadenosine triphosphatase, diadenosine tetraphosphatase, and phosphodiesterase from yellow lupin (*Lupinus luteus*) seeds. *J Biol Chem* **258**: 9982-9.
- 277- Warner AH & Finamore FJ. (1965) Isolation, purification, and characterization of P¹,P⁴-diguanosine 5'-tetraphosphate *asymmetrical*-pyrophosphohydrolase from brine shrimp eggs. *Biochemistry* **4**: 1568-75.
- 278- Ogilvie A & Antl W. (1983) Diadenosine tetraphosphatase from human leukemia cells. Purification to homogeneity and partial characterization. *J Biol Chem* **258**: 4105-9.
- 279- Guranowski A, Brown P, Ashton PA & Blackburn GM. (1994) Regiospecificity of the hydrolysis of diadenosine polyphosphates catalyzed by three specific pyrophosphohydrolases. *Biochemistry* **33**: 235-40.
- 280- Ogilvie A. (1981) Determination of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) levels in subpicomole quantities by a phosphodiesterase luciferin-luciferase coupled assay: application as a specific assay for diadenosine tetraphosphatase. *Anal Biochem* **115**: 302-7.
- 281- Thorne NM, Hankin S, Wilkinson MC, Nuñez C, Barraclough R & McLennan AG. (1995) Human diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase is a member of the MutT family of nucleotide pyrophosphatases. *Biochem J* **311**: 717-21.
- 282- Huang Y, Garrison PN & Barnes LD. (1995) Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. *Biochem J* **312**: 925-32.
- 283- Bernet D, Pinto RM, Sillero A & Cameselle JC. (1991) Location of dinucleoside triphosphatase in the matrix space of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* **283**: 286-8.
- 284- Brevet A, Chen J, Fromant M, Blanquet S & Plateau P. (1991) Isolation and characterization of a dinucleoside triphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 5275-9.
- 285- Prescott M, Thorne NM, Milne AD & McLennan AG. (1992) Characterisation of a bis(5'-nucleosidyl) triphosphate pyrophosphohydrolase from encysted embryos of the brine shrimp *Artemia*. *Int J Biochem* **24**: 565-71.
- 286- Costas MJ, Montero JM, Cameselle JC, Günther Sillero MA & Sillero A. (1984) Dinucleosidetriphosphatase from rat brain. *Int J Biochem* **16**: 757-62.
- 287- Costas MJ, Cameselle JC, Günther Sillero MA & Sillero A. (1985) Occurrence of dinucleosidetriphosphatase in the cytosol and particulate fractions from rat liver. *Int J Biochem* **17**: 903-9.
- 288- García-Agúndez JA, Cameselle JC, Costas MJ, Günther Sillero MA & Sillero A. (1991) Particulate diadenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate hydrolases in rat brain: two specific dinucleoside triphosphatases and two phosphodiesterase I-like hydrolases. *Biochim Biophys Acta* **1073**: 402-9.
- 289- Hurtado C, Ruíz A, Sillero A & Günther Sillero MA. (1987) Specific magnesium-dependent diadenosine 5',5'''-P¹,P³-triphosphate pyrophosphohydrolase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 1718-23.
- 290- O'Handley SF, Frick DN, Dunn CA & Bessman MJ. (1998) Orf186 represents a new member of the Nudix hydrolases, active on adenosine(5')triphospho(5')adenosine, ADP-ribose, and NADH. *J Biol Chem* **273**: 3192-7.
- 291- Barnes LD & Culver CA. (1982) Isolation and characterization of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase from *Physarum polycephalum*. *Biochemistry* **21**: 6123-8.
- 292- Garrison PN, Roberson GM, Culver CA & Barnes LD. (1982) Diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase from *Physarum polycephalum*. Substrate specificity. *Biochemistry* **21**: 6129-33.
- 293- Guranowski A, Jakubowski H & Holler E. (1983) Catabolism of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate in procaryotes. Purification and properties of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate (*symmetrical*) pyrophosphohydrolase from *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* **258**: 14784-9.

- 294- Plateau P, Fromant M, Brevet A, Gesquière A & Blanquet S. (1985) Catabolism of bis(5'-nucleosidyl) oligophosphates in *Escherichia coli*: metal requirements and substrate specificity of homogeneous diadenosine-5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase. *Biochemistry* **24**: 914-22.
- 295- Mechulam Y, Fromant M, Mellot P, Plateau P, Blanchin-Roland S, Fayat G & Blanquet S. (1985) Molecular cloning of the *Escherichia coli* gene for diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate pyrophosphohydrolase. *J Bacteriol* **164**: 63-9.
- 296- Lévêque F, Blanchin-Roland S, Fayat G, Plateau P & Blanquet S. (1990) Design and characterization of *Escherichia coli* mutants devoid of Ap₄N-hydrolase activity. *J Mol Biol* **212**: 319-29.
- 297- Guranowski A & Blanquet S. (1985) Phosphorolytic cleavage of diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate. Properties of homogeneous diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate α , β -phosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **260**: 3542-7.
- 298- McLennan AG, Mayers E & Adams DG. (1996) *Anabaena flos-aquae* and other cyanobacteria possess diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) phosphorylase activity. *Biochem J* **320**: 795-800.
- 299- Wasternack C, Hess S, Löffler A, Guranowski A. (1989) Intracellular localization of dinucleosideoligophosphate phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Int J Biochem* **21**: 1089-95.
- 300- Guranowski A, Starzynska E & Wasternack C. (1988) Specific phosphorylase from *Euglena gracilis* splits diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) and diadenosine 5',5"-P¹,P³-triphosphate (Ap₃A). *Int J Biochem* **20**: 449-55.
- 301- Plateau P, Fromant M, Schmitter JM, Buhler JM & Blanquet S. (1989) Isolation, characterization, and inactivation of the *APAI* gene encoding yeast diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate phosphorylase. *J Bacteriol* **171**: 6437-45.
- 302- Plateau P, Fromant M, Schmitter JM & Blanquet S. (1990) Catabolism of bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**: 6892-9.
- 303- Brevet A, Coste H, Fromant M, Plateau P & Blanquet S. (1987) Yeast diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate α , β -phosphorylase behaves as a dinucleoside tetraphosphate synthetase. *Biochemistry* **26**: 4763-8.
- 304- Booth JW & Guidotti G. (1995) An alleged yeast polyphosphate kinase is actually diadenosine-5', 5"-P¹,P⁴-tetraphosphate α , β -phosphorylase. *J Biol Chem* **270**: 19377-82.
- 305- Guranowski A & Blanquet S. (1986) Diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate α , β -phosphorylase from yeast supports nucleoside diphosphate-phosphate exchange. *J Biol Chem* **261**: 5943-6.
- 306- Guranowski A, Just G, Holler E & Jakubowski H. (1988) Synthesis of diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate (AppppA) from adenosine 5'-phosphosulfate and adenosine 5'-triphosphate catalyzed by yeast AppppA phosphorylase. *Biochemistry* **27**: 2959-64.
- 307- Kaushal V, Avila DM, Hardies SC & Barnes LD. (1990) Sequencing and enhanced expression of the gene encoding diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) phosphorylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **95**: 79-84.
- 308- Avila DM, Robinson AK, Kaushal V & Barnes LD. (1991) A paradoxical increase of a metabolite upon increased expression of its catabolic enzyme: the case of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and Ap₄A phosphorylase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **173**: 7875-80.
- 309- Kimura T, Hatano N, Wada M, Iwata K, Kurosaki Y, Nakayama T, Yamaura T & Nakajima H. (1995) Disposition of diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate (Ap₄A) in rats. *Biol Pharm Bull* **18**: 1556-9.
- 310- Mateo J, Miras-Portugal MT & Rotllán P. (1997) Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells. *Am J Physiol* **273**: C918-27.
- 311- Miras-Portugal MT, Pintor J, Rotllán P & Torres M. (1990) Characterization of ectonucleotidases in chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci* **603**: 523-6.
- 312- Gasmi L, Cartwright JL & McLennan AG. (1998) The hydrolytic activity of bovine adrenal medullary plasma membranes towards diadenosine polyphosphates is due to alkaline phosphodiesterase-I. *Biochim Biophys Acta* **1405**: 121-7.
- 313- Mateo J, Rotllán P & Miras-Portugal MT. (1996) Suramin - a powerful inhibitor of neural ecto-diadenosine polyphosphate hydrolase. *Br J Pharmacol* **119**: 1-2.
- 314- Mateo J, Rotllán P, Marti E, Gomez de Aranda I, Solsona C & Miras-Portugal MT. (1997) Diadenosine polyphosphate hydrolase from presynaptic plasma membranes of *Torpedo* electric organ. *Biochem J* **323**: 677-84.
- 315- Iwata K, Nakajima H & Kimura T. (1995) Ca²⁺ dependency of diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate degradation in dog plasma. *Biol Pharm Bull* **18**: 788-90.

- 316- L  thje J & Ogilvie A. (1985) Catabolism of Ap₃A and Ap₄A in human plasma. Purification and characterization of a glycoprotein complex with 5'-nucleotide phosphodiesterase activity. *Eur J Biochem* **149**: 119-27.
- 317- L  thje J & Ogilvie A. (1987) 5'-Nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in human serum: quantitative measurement and some biochemical properties. *Clin Chim Acta* **164**: 275-84.
- 318- L  thje J & Ogilvie A. (1987) Ap₄A degrading isoenzymes in human serum and their relation to the isoenzymes of the 5'-nucleotide phosphodiesterase (5'-NPD). *Biol Chem Hoppe - Seyler* **368**: 1076.
- 319- L  thje J, Holler A, Ogilvie A, Siegfried W, Waldherr A & Domschke W. (1987) Catalytic activity concentrations of diadenosine tetraphosphate hydrolase in normal and pathological sera. *J Clin Chem Clin Biochem* **25**: 493-8.
- 320- Razzell WE. (1963) Phosphodiesterases. *Methods Enzymol* **6**: 236-58.
- 321- Khorana HG. (1961) Phosphodiesterases. *The Enzymes* **5**: 79-94.
- 322- Razzell WE & Khorana HG. (1959) Studies on polynucleotides. III. Enzymic degradation. Substrate specificity and properties of snake venom phosphodiesterase. *J Biol Chem* **234**: 2105-13.
- 323- Razzell WE & Khorana HG. (1959) Studies on polynucleotides. IV. Enzymic degradation. The stepwise action of venom phosphodiesterase on deoxyribo-oligonucleotides. *J Biol Chem* **234**: 2114-7.
- 324- Small GD & Cooper C. (1966) Purification and properties of nucleoside tetraphosphate hydrolase from rabbit muscle. *Biochemistry* **5**: 14-26.
- 325- Guranowski A, Starzynska E, Brown P & Blackburn GM. (1997) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase from yellow lupin seeds: purification to homogeneity and some properties. *Biochem J* **328**: 257-62.
- 326- Guranowski A, Starzynska E, Barnes LD, Robinson AK & Liu S. (1998) Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase activity is an inherent property of soluble exopolyphosphatase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1380**: 232-8.
- 327- Fernley HN. (1971) Mammalian alkaline phosphatases. *The Enzymes* **4**: 417-47.
- 328- Hollander VP. (1971) Acid phosphatases. *The Enzymes* **4**: 449.
- 329- Hoagland MB. (1955) An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim Biophys Acta* **16**: 288-9.
- 330- DeMoss JA, Genuth SM & Novelli GD. (1956) The enzymatic activation of amino acids via their acyl-adenylate derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* **42**: 325-32.
- 331- Karasek M, Caltelfranco P, Krishnaswamy PR & Meister A. (1958) Enzymatic synthesis and reactions of tryptophan-adenylic acid anhydride. *J Am Chem Soc* **80**: 2335-6.
- 332- Stulberg MP & Novelli GD. (1962) Amino acid activation. *The Enzymes* **6**: 401-32.
- 333- Kisselev LL & Favorova OO. (1974) Aminoacyl-tRNA synthetases: some recent results and achievements. *Adv Enzymol* **40**: 141-255.
- 334- Zamecnik PC, Stephenson ML, Janeway CM & Randerath K. (1966) Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* **24**: 91-7.
- 335- Plateau P, Mayaux JF & Blanquet S. (1981) Zinc(II)-dependent synthesis of diadenosine 5',5'''-P¹,P⁴-tetraphosphate by *Escherichia coli* and yeast phenylalanyl transfer ribonucleic acid synthetases. *Biochemistry* **20**: 4654-62.
- 336- Goerlich O, Foeckler R & Holler E. (1982) Mechanism of synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (AppppA) by aminoacyl-tRNA synthetases. *Eur J Biochem* **126**: 135-42.
- 337- Plateau P & Blanquet S. (1994) Dinucleoside oligophosphates in micro-organisms. *Adv Microb Physiol* **36**: 81-109.
- 338- Brevet A, Plateau P, Cirakoglu B, Pailliez JP & Blanquet S. (1982) Zinc-dependent synthesis of 5'.5'-diadenosine tetraphosphate by sheep liver lysyl- and phenylalanyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* **257**: 14613-5.
- 339- Wahab SZ & Yang DCH. (1985) Synthesis of diadenosine 5',5'''-P₁,P₄-tetraphosphate by lysyl-tRNA synthetase and a multienzyme complex of aminoacyl-tRNA synthetases from rat liver. *J Biol Chem* **260**: 5286-9.

- 340- Hilderman RH. (1983) Characterization of a homogeneous complex of arginyl- and lysyl-tRNA synthetase: zinc and adenosine 5'-phosphate dependent synthesis of diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate. *Biochemistry* **22**: 4353-7.
- 341- Dang CV & Traugh JA. (1989) Phosphorylation of threonyl- and seryl-tRNA synthetase by cAMP-dependent protein kinase. A possible role in the regulation of P¹,P⁴-bis(5'-adenosyl)-tetraphosphate (Ap₄A) synthesis. *J Biol Chem* **264**: 5861-5.
- 342- Zamecnik PC, Janeway CM, Randerath K & Stephenson ML. (1967) A new family of dinucleotides whose formation is catalyzed by L-Lysine: sRNA ligase (AMP). In Regulation of Nucleic Acid and Protein Biosynthesis. Ed por Koningsberger VV & Bosch L. Pág. 169-76. Elsevier Press. Amsterdam.
- 343- Randerath K, Janeway CM, Stephenson ML & Zamecnik PC. (1966) Isolation and characterization of dinucleoside tetra- and triphosphates formed in the presence of lysyl-sRNA synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* **24**: 98-105.
- 344- Zamecnik PC & Stephenson, ML. (1968) A possible regulatory site located at the gateway to protein synthesis. In Regulatory Mechanism for Protein Synthesis in Mammalian Cells. Pág. 3-16. Academic Press. New York.
- 345- Blanquet S, Plateau P & Brevet A. (1983) The role of zinc in 5',5'-diadenosine tetraphosphate production by aminoacyl-transfer RNA synthetases. *Mol Cell Biochem* **52**: 3-11.
- 346- Belrhali H, Yaremchuk A, Tukalo M, Berthet-Colominas C, Rasmussen B, Bösecke P, Diat O & Cusack S. (1995) The structural basis for seryl-adenylate and Ap₄A synthesis by seryl-tRNA synthetase. *Structure* **3**: 341-52.
- 347- Traut TW. (1987) Synthesis of hybrid bisnucleoside 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphates by aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biochem* **75**: 15-21.
- 348- Plateau P & Blanquet S. (1982) Zinc-dependent synthesis of various dinucleoside 5', 5"-P¹,P³-tri- or 5', 5"-P¹,P⁴-tetraphosphates by *Escherichia coli* lysyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* **21**: 5273-9.
- 349- Plateau P, Gueron M & Blanquet S. (1981) Determination of dinucleoside 5', 5"-P¹,P⁴-tetraphosphates by ³¹P and ¹H NMR spectroscopy. *Biochimie* **63**: 827-30.
- 350- Led JJ, Switon WK & Jensen KF. (1983) Phosphorolytic activity of *Escherichia coli* glycyl-tRNA synthetase towards its cognate aminoacyl adenylate detected by ³¹P-NMR spectroscopy and thin-layer chromatography. *Eur J Biochem* **136**: 469-79.
- 351- Guédon G, Ebel JP & Remy P. (1987) Yeast phenylalanyl-tRNA synthetase: evidence for the formation of ADP by phosphorolysis of enzyme-bound aminoacyladenylate. *Biochimie* **69**: 1175-81.
- 352- Merkulova T, Kovaleva G & Kisselev L. (1994) P¹,P³-bis(5'-adenosyl)triphosphate (Ap₃A) as a substrate and a product of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetase. *FEBS Lett* **350**: 287-90.
- 353- Goerlich O & Holler E. (1984) Phenylalanyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* K10. Effects of zinc(II) on partial reactions of diadenosine 5',5"-P¹,P⁴-tetraphosphate synthesis, conformation, and protein aggregation. *Biochemistry* **23**: 182-90.
- 354- Brevet A, Chen J, Lévêque F, Plateau P & Blanquet S. (1989) *In vivo* synthesis of adenylylated bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates (Ap₄N) by *Escherichia coli* aminoacyl-tRNA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8275-9.
- 355- Warner AH, Beers PC & Huang FL. (1974) Biosynthesis of the diguanosine nucleotides. I. Purification and properties of an enzyme from yolk platelets of brine shrimp embryos. *Can J Biochem* **52**: 231-40.
- 356- Warner AH & Huang FL. (1974) Biosynthesis of the diguanosine nucleotides. II. Mechanism of action of GTP:GTP guanylyltransferase on nucleotide metabolism in brine shrimp embryos. *Can J Biochem* **52**: 241-51.
- 357- Liu JJ & McLennan AG. (1994) Purification and properties of GTP:GTP guanylyltransferase from encysted embryos of the brine sgrimp *Artemia*. *J Biol Chem* **269**: 11787-94.
- 358- Cartwright JL & McLennan AG. (1999) Formation of a covalent N^{e2}-guanylylhistidyl reaction intermediate by the GTP:GTP guanylyltransferase from the brine shrimp *Artemia*. *Arch Biochem Biophys* **361**: 101-5.
- 359- Smith RE & Furuichi Y. (1982) A unique class of compound, guanosine-nucleoside tetraphosphate G(5')pppp(5')N, synthesized during the *in vitro* transcription of cytoplasmic polyhedrosis virus of *Bombyx mori*. Structural determination and mechanism of formation. *J Biol Chem* **257**: 485-94.
- 360- Wang D & Shatkin AJ. (1984) Synthesis of Gp₄N and Gp₃N compounds by guanylyltransferase purified from yeast. *Nucleic Acids Res* **12**: 2303-15.

- 361- Toyama R, Mizumoto K, Nakahara Y, Tatsuno T & Kaziyo Y. (1983) Mechanism of the mRNA guanylyltransferase reaction: isolation of N⁶-phospholysine and GMP (5' → N⁶) lysine from the guanylyl-enzyme intermediate. *EMBO J* **2**: 2195-201.
- 362- Shuman S & Hurwitz J. (1982) Capping enzyme. *The Enzymes* **15**: 245-65.
- 363- Guranowski A, Günther Sillero MA & Sillero A. (1990) Firefly luciferase synthesizes Pⁱ,P⁴-bis(5'-adenosyl)tetraphosphate (Ap₄A) and other dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett* **271**: 215-8.
- 364- Günther Sillero MA, Guranowski A & Sillero A. (1991) Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalysed by firefly luciferase. *Eur J Biochem* **202**: 507-13.
- 365- Ortiz B, Sillero A & Günther Sillero MA. (1993) Specific synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine (*n* > 4) catalyzed by firefly luciferase. *Eur J Biochem* **212**: 263-70.
- 366- Ortiz B, Fernández VM, Günther Sillero MA & Sillero A. (1995) Influence of oxygen, dehydroluciferin, luciferin and 6'-ethyl-luciferin on the synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (Ap₄A) by firefly luciferase. *J Photochem Photobiol B-biol* **29**: 33-6.
- 367- Garrido S, Zaera E, Torrecilla A, Sillero A & Günther-Sillero MA. (1995) Labeled adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (Ap₄A) and adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside (Ap₄N). Synthesis with firefly luciferase. *J Biochem Biophys Methods* **30**: 191-8.
- 368- Guranowski A, Günther Sillero MA & Sillero A. (1994) Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. *J Bacteriol* **176**: 2986-90.
- 369- Madrid O, Martín D, Atencia EA, Sillero A & Günther Sillero MA. (1998) T4 DNA ligase synthesizes dinucleotide polyphosphates. *FEBS Lett* **433**: 283-6.
- 370- Atencia EA, Madrid O, Günther Sillero MA & Sillero A. (1999) T4 RNA ligase catalyses the synthesis of dinucleoside polyphosphates. *Eur J Biochem* **261**: 802-11.
- 371- Meyer PR, Matsuura SE, So AG & Scott WA. (1998) Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13471-6.
- 372- Lindahl T & Barnes DE. (1992) Mammalian DNA ligases. *Annu Rev Biochem* **61**: 251-81.
- 373- Lehman IR. (1974) DNA ligase: structure, mechanism, and function. The joining of DNA chains by DNA ligase is an essential component of DNA repair, replication, and recombination. *Science* **186**: 790-7.
- 374- Uhlenbeck OC & Gumpert RI. (1982) T4 RNA ligase. *The Enzymes* **153**: 31-58.
- 375- Cranston JW, Silber R, Malathi VG & Hurwitz J. (1974) Studies on ribonucleic acid ligase. Characterization of an adenosine triphosphate-inorganic pyrophosphate exchange reaction and demonstration of an enzyme-adenylate complex with T4 bacteriophage-induced enzyme. *J Biol Chem* **249**: 7447-56.
- 376- Götte M, Li X, Wainberg MA. (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* **365**: 199-210.
- 377- Verma IM. (1981) Reverse transcriptase. *The Enzymes* **14**: 87-103.
- 378- García-Díaz M, Canales J, Günther Sillero MA, Sillero A & Cameselle JC. (1989) Phosphoglycerate kinase from yeast synthesizes guanosine 5'-tetraphosphate. *Biochem Int* **19**: 1253-64.
- 379- Kupriyanov VV, Ferretti JA & Balaban RS. (1986) Muscle adenylate kinase catalyzes adenosine 5'-tetraphosphate synthesis from ATP and ADP. *Biochim Biophys Acta* **869**: 107-11.
- 380- Mahler HR, Wakil SJ & Bock RM. (1953) Studies of fatty acid oxidation. I. Enzymatic activation of fatty acids. *J Biol Chem* **204**: 453-68.
- 381- Hele P. (1954) The acetate activating enzyme of beef heart. *J Biol Chem* **206**: 671-6.
- 382- Bremer J & Osmundsen H. (1984) Fatty acid oxidation and its regulation. In Fatty acid metabolism and its regulation. Ed. por S Numa. Pág. 113-54. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.
- 383- Faergeman NJ & Knudsen J. (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* **323**: 1-12.
- 384- Chou TC & Lipmann F. (1952) Separation of acetyl transfer enzymes in pigeon liver extract. *J Biol Chem* **196**: 89-103.
- 385- Lipmann F, Jones ME, Black S & Flynn RM. (1952) Enzymatic pyrophosphorylation of coenzyme A by adenosine triphosphate. *J Am Chem Soc* **74**: 2384-5.

- 386- Jones ME, Black S, Flynn RM & Lipmann F. (1953) Acetyl coenzyme A synthesis through pyrophosphoryl split of adenosine triphosphate. *Biochim Biophys Acta* **12**: 141-9.
- 387- Kornberg A & Pricer WE. (1953) Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids. *J Biol Chem* **204**: 329-43.
- 388- Groot PHE. (1975) The activation of short-chain fatty acids by the soluble fraction of guinea-pig heart and liver mitochondria. The search for a distinct propionyl-CoA synthetase. *Biochim Biophys Acta* **380**: 12-20.
- 389- Webster LT Jr, Gerowin LD & Rakita L. (1965) Purification and characteristics of a butyryl coenzyme A synthetase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* **240**: 29-33.
- 390- Jencks WP. (1962) Acyl activation. *The Enzymes* **6**: 373-85.
- 391- Jencks WP. (1962) Activating enzymes for higher fatty acids. *Methods Enzymol* **5**: 467-72.
- 392- Londesborough JC & Webster LT. (1974) Fatty acyl-CoA synthetases. *The Enzymes* **10**: 469-88.
- 393- Bar-Tana J, Rose G & Shapiro B. (1975) Long-chain fatty acyl-CoA synthetase from rat liver microsomes. EC 6.2.1.3 fatty acyl-CoA ligase (ATP). *Methods Enzymol* **35**: 117-22.
- 394- Park MV. (1978) Acyl-coenzyme A synthetases. *Biochem Soc Trans* **6**: 70-2.
- 395- Groot PHE, Scholte HR & Hülsmann WC. (1976) Fatty acid activation: specificity, localization and function. *Adv Lipid Res* **14**: 75-126.
- 396- Tanaka T, Hosaka K & Numa S. (1981) Long-chain acyl-CoA synthetase from rat liver. *Methods Enzymol* **71**: 334-41.
- 397- Knights KM. (1998) Role of hepatic fatty acid:coenzyme A ligases in the metabolism of xenobiotic carboxylic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **25**: 776-82.
- 398- Beinert H, Green DE, Hele P, Hift H, von Korff RW & Ramakrishnan CV. (1953) The acetate activating enzyme system of heart muscle. *J Biol Chem* **203**: 35-45.
- 399- Reijniere GLA, Veldstra H & van den Berg CJ. (1975) Short-chain fatty acid synthases in brain. Subcellular localization and changes during development. *Biochem J* **152**: 477-84.
- 400- Woodnutt G & Parker DS. (1978) Rabbit liver acetyl-CoA synthetase. *Biochem J* **175**: 757-9.
- 401- Smith RM & Russell GR. (1967) Activation of short-chain fatty acids by sheep-liver mitochondria. *Biochem J* **102**: 39c-41c.
- 402- Scholte HR & Groot PHE. (1975) Organ and intracellular localization of short-chain acyl-CoA synthetases in rat and guinea-pig. *Biochim Biophys Acta* **409**: 283-96.
- 403- Ricks CA & Cook RM. (1981) Regulation of volatile fatty acid uptake by mitochondrial acyl CoA synthetases of bovine heart. *J Dairy Sci* **64**: 2336-43.
- 404- Groot PHE, Scholte HR & Hülsmann WC. (1974) The subcellular localization of acetyl- (EC 6.2.1.1), propionyl- and butyryl-CoA synthetase (EC 6.2.1.2) in rat and guinea-pig organs. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **355**: 1199.
- 405- Satyanarayana T & Klein HP. (1976) Studies on the "aerobic" acetyl-coenzyme A synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*: purification, crystallization, and physical properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* **174**: 480-90.
- 406- Frenkel EP & Kitchens RL. (1977) Purification and properties of acetyl coenzyme A synthetase from bakers' yeast. *J Biol Chem* **252**: 504-7.
- 407- Young OA & Anderson JW. (1974) Properties and substrate specificity of some reactions catalyzed by a short-chain fatty acyl-coenzyme A synthetase from seeds of *Pinus radiata*. *Biochem J* **137**: 423-33.
- 408- Young OA & Anderson JW. (1974) The enzymology of short-chain fatty acyl-coenzyme A synthetase from seeds of *Pinus radiata*. *Biochem J* **137**: 435-42.
- 409- Huang KP & Stumpf PK. (1970) Fat metabolism in higher plants. XLI. Properties of potato acetyl coenzyme A synthetase. *Arch Biochem Biophys* **140**: 158-73.
- 410- Martínez-Blanco H, Reglero A, Fernández-Valverde M, Ferrero MA, Moreno MA, Peñalva MA & Luengo JM. (1992) Isolation and characterization of the acetyl-CoA synthetase from *Penicillium chrysogenum*. Involvement of this enzyme in the biosynthesis of penicillins. *J Biol Chem* **267**: 5474-81.
- 411- Preston GG, Wall JD & Emerich DW. (1990) Purification and properties of acetyl-CoA synthetase from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Biochem J* **267**: 179-83.
- 412- Jetten MSM, Stams AJM & Zehnder AJB. (1989) Isolation and characterization of acetyl-coenzyme A synthetase from *Methanothrix soehngenii*. *J Bacteriol* **171**: 5430-5.

- 413- Berg P. (1956) Acyl adenylates: an enzymatic mechanism of acetate activation. *J Biol Chem* **222**: 991-1013.
- 414- Campagnari F & Webster LT. (1963) Purification and properties of acetyl coenzyme A synthetase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* **238**: 1628-33.
- 415- Webster LT. (1965) Studies of the acetyl coenzyme A synthetase reaction. II. Crystalline acetyl coenzyme A synthetase. *J Biol Chem* **240**: 4158-63.
- 416- Londesborough JC, Yuan SL & Webster LT. (1973) The molecular weight and thiol residues of acetyl-coenzyme A synthetase from ox heart mitochondria. *Biochem J* **133**: 23-36.
- 417- Ishikawa M, Fujino T, Sakashita H, Morikawa K & Yamamoto T. (1995) Kinetic properties and structural characterization of highly purified acetyl-CoA synthetase from bovine heart and tissue distribution of the enzyme in rat tissues. *Tohoku J Exp Med* **175**: 55-67.
- 418- Connerton IF, Fincham JRS, Sandeman RA & Hynes MJ. (1990) Comparison and cross-species expression of the acetyl-CoA synthetase genes of the Ascomycete fungi, *Aspergillus nidulans* and *Neurospora Crassa*. *Mol Microbiol* **4**: 451-60.
- 419- Eggen RIL, Geerling ACM, Boshoven ABP & de Vos WM. (1991) Cloning, sequence analysis, and functional expression of the acetyl coenzyme A synthetase gene from *Methanotrix soehngenii* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 6383-9.
- 420- Martínez-Blanco H, Orejas M, Reglero A, Luengo JM & Peñalva MA. (1993) Characterisation of the gene encoding acetyl-CoA synthetase in *Penicillium chrysogenum*: conservation of intron position in plectomycetes. *Gene* **130**: 265-70.
- 421- Garre V, Murillo FJ & Torres-Martinez S. (1994) Isolation of the *facA* (acetyl-CoA synthetase) gene of *Phycomyces blakesleeanus*. *Mol Gen Genet* **244**: 278-86.
- 422- Maconochie MK, Connerton IF & Casselton LA. (1992) The *acu-1* gene of *Coprinus cinereus* is a regulatory gene required for induction of acetate utilisation enzymes. *Mol Gen Genet* **234**: 211-6.
- 423- De-Virgilio C, Bürckert N, Barth G, Neuhaus JM, Boller T & Wiemken A. (1992) Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **8**: 1043-51.
- 424- van den Berg MA & Steensma HY. (1995) *ACS2*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose. *Eur J Biochem* **231**: 704-13.
- 425- Priefert H & Steinbüchel A. (1992) Identification and molecular characterization of the acetyl coenzyme A synthetase gene (*acoE*) of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* **174**: 6590-9.
- 426- Grundy FJ, Waters DA, Takova TY & Henkin TM. (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **10**: 259-71.
- 427- Kumari S, Tishel R, Eisenbach M & Wolfe AJ. (1995) Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 2878-86.
- 428- van den Berg MA, Jong-Gubbels P, Kortland CJ, van Dijken JP, Pronk JT & Steensma HY. (1996) The two acetyl-coenzyme A synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* differ with respect to kinetic properties and transcriptional regulation. *J Biol Chem* **271**: 28953-9.
- 429- Satyanarayana T, Chervenka CH & Klein HP. (1980) Subunit specificity of the two acetyl-CoA synthetases of yeast as revealed by an immunological approach. *Biochim Biophys Acta* **614**: 601-6.
- 430- Berg P. (1959) Role of magnesium in acetyl coenzyme A formation by acetothiokinase. *Science* **129**: 895-6.
- 431- Webster LT & Campagnari F. (1962) The biosynthesis of acetyl and butyryl adenylates. *J Biol Chem* **237**: 1050-5.
- 432- Bar-Tana J, Rose G & Shapiro B. (1972) Microsomal palmitoyl coenzyme A synthetase from rat liver. Partial and exchange reactions. *Biochem J* **129**: 1101-7.
- 433- Bar-Tana J, Rose G, Brandes R & Shapiro B. (1973) Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Mechanism of reaction. *Biochem J* **131**: 199-209.
- 434- Bar-Tana J, Rose G & Shapiro B. (1973) Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Isolation of an enzyme-bound intermediate. *Biochem J* **135**: 411-6.
- 435- Rose G, Bar-Tana J & Shapiro B. (1979) Palmitoyl coenzyme A synthetase activation by uncomplexed ATP. *Biochim Biophys Acta* **573**: 126-35.
- 436- Maes E & Bar-Tana J. (1977) Rat liver microsomal palmitoyl-CoA synthetase: subunit structure. *Biochim Biophys Acta* **480**: 527-30.

- 437- Lippel K, Robinson J & Trams EG. (1970) Intracellular distribution of palmitoyl-CoA synthetase in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **206**: 173-7.
- 438- Bar-Tana J, Rose G & Shapiro B. (1971) The purification and properties of microsomal palmitoyl-coenzyme A synthetase. *Biochem J* **122**: 353-62.
- 439- Jong JW & Hülsmann WC. (1970) A comparative study of palmitoyl-CoA synthetase activity in rat-liver, heart and gut mitochondrial and microsomal preparation. *Biochim Biophys Acta* **197**: 127-35.
- 440- Singh I, Lazo O & Kremser K. (1993) Purification of peroxisomes and subcellular distribution of enzyme activities for activation and oxidation of very-long-chain fatty acids in rat brain. *Biochim Biophys Acta* **1170**: 44-52.
- 441- Lazo O, Contreras M & Singh I. (1990) Topographical location of peroxisomal acyl-CoA ligases: differential location of palmitoyl-CoA and lignoceroyl-CoA ligases. *Biochemistry* **29**: 3981-6.
- 442- Lazo O, Contreras M, Yoshida Y, Singh AK, Stanley W, Weise M & Singh I. (1990) Cellular oxidation of lignoceric acid is regulated by subcellular localization of lignoceroyl-CoA ligases. *J Lipid Res* **31**: 583-95.
- 443- Bhushan A, Singh RP & Singh I. (1986) Characterization of rat brain microsomal acyl-coenzyme A ligases: different enzymes for the synthesis of palmitoyl-coenzyme A and lignoceroyl-coenzyme A. *Arch Biochem Biophys* **246**: 374-80.
- 444- Ghosh B, Barbosa E & Singh I. (1995) Molecular cloning and sequencing of human palmitoyl-CoA ligase and its tissue specific expression. *Mol Cell Biochem* **151**: 77-81.
- 445- Lippel K, Llewellyn A & Jarett L. (1971) Palmitoyl-CoA synthetase activity in isolated rat epididymal fat cells in the absence and presence of various lipolytic and anti-lipolytic compounds. *Biochim Biophys Acta* **231**: 48-51.
- 446- Farstad M, Bremer J & Norum KR. (1967) Long-chain acyl-CoA synthetase in rat liver. A new assay procedure for the enzyme, and studies on its intracellular localization. *Biochim Biophys Acta* **132**: 492-502.
- 447- Pande SV & Mead JF. (1968) Long chain fatty acid activation in subcellular preparations from rat liver. *J Biol Chem* **243**: 352-61.
- 448- Marcel YL & Suzue G. (1972) Kinetic studies on the specificity of long chain acyl coenzyme A synthetase from rat liver microsomes. *J Biol Chem* **247**: 4433-6.
- 449- Suzue G & Marcel YL. (1972) Kinetic studies on the chain length specificity of long chain acyl coenzyme A synthetase from rat liver microsomes. *J Biol Chem* **247**: 6781-3.
- 450- Norum KR, Farstad M & Bremer J. (1966) The submitochondrial distribution of acid: CoA ligase (AMP) and palmitoyl-CoA: carnitine palmitoyltransferase in rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **24**: 797-804.
- 451- Normann PT, Thomassen MS, Christiansen EN & Flatmark T. (1981) Acyl-CoA synthetase activity of rat liver microsomes. Substrate specificity with special reference to very-long-chain and isomeric fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **664**: 416-27.
- 452- Miyazawa S, Hashimoto T & Yokota S. (1985) Identity of long-chain acyl-coenzyme A synthetase of microsomes, mitochondria, and peroxisomes in rat liver. *J Biochem* **98**: 723-33.
- 453- Tanaka T, Hosaka K, Hoshimaru M & Numa S. (1979) Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme A synthetase from rat liver. *Eur J Biochem* **98**: 165-72.
- 454- Philipp DP & Parsons P. (1979) Isolation and purification of long chain fatty acyl coenzyme A ligase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **254**: 10776-84.
- 455- Philipp DP & Parsons P. (1979) Kinetic characterization of long chain fatty acyl coenzyme A ligase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **254**: 10785-90.
- 456- Bronfman M, Inestrosa NC, Nervi FO & Leighton F. (1984) Acyl-CoA synthetase and the peroxisomal enzymes of β -oxidation in human liver. Quantitative analysis of their subcellular localization. *Biochem J* **224**: 709-20.
- 457- Krisans SK, Mortensen RM & Lazarow PB. (1980) Acyl-CoA synthetase in rat liver peroxisomes. Computer-assisted analysis of cell fractionation experiments. *J Biol Chem* **255**: 9599-607.
- 458- Shindo Y & Hashimoto T. (1978) Acyl-coenzyme A synthetase and fatty acid oxidation in rat liver peroxisomes. *J Biochem* **84**: 1177-81.
- 459- Mannaerts GP, Van Veldhoven P, Van Broekhoven A, Vandebroek G & Debeer LJ. (1982) Evidence that peroxisomal acyl-CoA synthetase is located at the cytoplasmic side of the peroxisomal membrane. *Biochem J* **204**: 17-23.

- 460- Pahan K & Singh I. (1995) Phytanic acid oxidation: topographical localization of phytanoyl-CoA ligase and transport of phytanic acid into human peroxisomes. *J Lipid Res* **36**: 986-97.
- 461- Wanders RJA, van Roermund CWT, van Wijland MJA, Schutgens RBH, Schram AW, van den Bosch H & Tager JM. (1987) Studies on the peroxisomal oxidation of palmitate and lignocerate in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **919**: 21-5.
- 462- Hesler CB, Olymbios C & Haldar D. (1990) Transverse-plane topography of long-chain acyl-CoA synthetase in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **265**: 6600-5.
- 463- Coleman R & Bell RM. (1978) Evidence that biosynthesis of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and triacylglycerol occurs on the cytoplasmic side of microsomal vesicles. *J Cell Biol* **76**: 245-53.
- 464- Aarsland A, Berge RK, Bremer J & Aarsaether N. (1990) The hypolipidemic peroxisome-proliferating drug, bis(carboxymethylthio)-1,10 decane, a dicarboxylic metabolite of tiadenol, is activated to an acylcoenzyme A thioester. *Biochim Biophys Acta* **1033**: 176-83.
- 465- Aarsland A & Berge RK. (1991) Peroxisome proliferating sulphur- and oxy-substituted fatty acid analogues are activated to acyl coenzyme A thioesters. *Biochem Pharmacol* **41**: 53-61.
- 466- Wu P & Bremer J. (1994) Activation of alkylthioacrylic acids in subcellular fractions of rat tissues: a new spectrophotometric method for assay of acyl-CoA synthetase. *Biochim Biophys Acta* **1215**: 87-92.
- 467- Lageweg W & Wanders RJA. (1993) Studies on the effect of fenoprofen on the activation and oxidation of long chain and very long chain fatty acids in hepatocytes and subcellular fractions from rat liver. *Biochem Pharmacol* **46**: 79-85.
- 468- Knihinicki RD, Williams KM & Day RO. (1989) Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs-1. *In vitro* studies of ibuprofen and flurbiprofen. *Biochem Pharmacol* **38**: 4389-95.
- 469- Brophy PJ & Vance DE. (1976) The synthesis and hydrolysis of long-chain fatty acyl-coenzyme A thioesters by soluble and microsomal fractions from the brain of the developing rat. *Biochem J* **160**: 247-51.
- 470- Reddy TS, Sprecher H & Bazan NG. (1984) Long-chain acyl-coenzyme A synthetase from rat brain microsomes. Kinetic studies using [1-¹⁴C]docosahexaenoic acid substrate. *Eur J Biochem* **145**: 21-9.
- 471- Murphy MG & Spence MW. (1980) Long-chain fatty acid:CoA ligase in rat brain *in vitro*: a comparison of activities with oleic and cis-vaccenic acids. *J Neurochem* **34**: 367-73.
- 472- Singh I, Bhushan A, Relan NK & Hashimoto T. (1988) Acyl-CoA ligases from rat brain microsomes: an immunochemical study. *Biochim Biophys Acta* **963**: 509-14.
- 473- Jones RE, Askew EW, Hecker AL & Hofeldt FD. (1981) Salicylic acid stimulation of palmitic acid oxidation by rat skeletal muscle mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **666**: 120-6.
- 474- Shimomura I, Tokunaga K, Kotani K, Keno Y, Yanase-Fujiwara M, Kanosue K, Jiao S, Funahashi T, Kobatake T, Yamamoto T & Matsuzawa Y. (1993) Marked reduction of acyl-CoA synthetase activity and mRNA in intra-abdominal visceral fat by physical exercise. *Am J Physiol* **265**: E44-50.
- 475- Aas M. (1971) Organ and subcellular distribution of fatty acid activating enzymes in the rat. *Biochim Biophys Acta* **231**: 32-47.
- 476- Normann PT, Norseth J & Flatmark T. (1983) Acyl-CoA synthetase activity of rat heart mitochondria. Substrate specificity with special reference to very-long-chain and isomeric fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **752**: 474-81.
- 477- Morisaki N, Kanzaki T, Saito Y & Yoshida S. (1986) Fatty acid specificity of acyl-CoA synthetase in rat glomeruli. *Biochim Biophys Acta* **875**: 311-5.
- 478- Hall M & Saggerson ED. (1985) Reversible inactivation by noradrenaline of long-chain fatty acyl-CoA synthetase in rat adipocytes. *Biochem J* **226**: 275-82.
- 479- Pedersen JI, Slinde E, Grynne B & Aas M. (1975) The intracellular localization of long-chain acyl-CoA synthetase in brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta* **398**: 191-203.
- 480- Jason CJ, Polokoff MA & Bell RM. (1976) Triacylglycerol synthesis in isolated fat cells. An effect of insulin on microsomal fatty acid coenzyme A ligase activity. *J Biol Chem* **251**: 1488-92.
- 481- Mandon EC, de Gómez Dumm INT & Brenner RR. (1988) Long-chain fatty acyl-CoA synthetase of rat adrenal microsomes. Effect of ACTH and epinephrine. *Mol Cell Endocrinol* **56**: 123-31.
- 482- Ohkubo Y, Mori S, Ishikawa Y, Shirai K, Saito Y & Yoshida S. (1992) Presence and properties of acyl coenzyme A synthetase for medium-chain fatty acids in rat intestinal mucosa. *Digestion* **51**: 42-50.

- 483- Ailhaud G, Samuel D & Desnuelle P. (1963) Localisation subcellulaire de l'acyl-CoA synthétase de la muqueuse intestinale. *Biochim Biophys Acta* **67**: 150-2.
- 484- Brindley DN & Hübscher G. (1966) The effect of chain length on the activation and subsequent incorporation of fatty acids into glycerides by the small intestine mucosa. *Biochim Biophys Acta* **125**: 92-105.
- 485- Rodgers JB, Tandon R & Fromm H. (1972) Acyl-CoA synthetase for long-chain fatty acids in rat small bowel and the influence of diets containing different compositions of fatty acids on intestinal lipid reesterifying enzyme activities. *Biochim Biophys Acta* **270**: 453-62.
- 486- Grogan WM & Huth EG. (1986) HPLC measurement of testicular long chain acyl-CoA synthetases with different substrate specificities. *Lipids* **21**: 11-6.
- 487- Morisaki N, Matsuoka N, Shirai K, Sato Y & Kumagai A. (1980) Studies on acyl-CoA synthetase in rat arterial wall. *Atherosclerosis* **37**: 439-47.
- 488- Farstad M, Aas M & Sander J. (1973) Long-chain acyl-CoA synthetase activity in blood platelets and some human tissues. *Scand J Clin Lab Invest* **31**: 205-11.
- 489- Lazo O, Contreras M, Bhushan A, Stanley W & Singh I. (1989) Adrenoleukodystrophy: impaired oxidation of fatty acids due to peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase deficiency. *Arch Biochem Biophys* **270**: 722-8.
- 490- Pahan K, Cofer J, Baliga P & Singh I. (1993) Identification of phytanoyl-CoA ligase as a distinct acyl-CoA ligase in peroxisomes from cultured human skin fibroblasts. *FEBS Lett* **322**: 101-4.
- 491- Lokesh BR, Rao AM & Murthy SK. (1977) Specific requirement of lysophosphatidylcholine for palmitoyl-CoA synthetase of chicken intestine. *Biochim Biophys Acta* **486**: 341-50.
- 492- Banis RJ & Tove SB. (1974) Solubilization of a long chain fatty acyl-CoA synthetase from chicken adipose tissue microsomes. *Biochim Biophys Acta* **348**: 210-20.
- 493- Duronio RJ, Knoll LJ & Gordon JL. (1992) Isolation of a *Saccharomyces cerevisiae* long chain fatty acyl-CoA synthetase gene (*FAA1*) and assessment of its role in protein N-myristoylation. *J Cell Biol* **117**: 515-29.
- 494- Hosaka K, Mishina M, Tanaka T, Kamiryo T & Numa S. (1979) Acyl-coenzyme A synthetase I from *Candida lipolytica*. Purification, properties and immunochemical studies. *Eur J Biochem* **93**: 197-203.
- 495- Overath P, Pauli G & Schairer HU. (1969) Fatty acid degradation in *Escherichia coli*. An inducible acyl-CoA synthetase, the mapping of old-mutations, and the isolation of regulatory mutants. *Eur J Biochem* **7**: 559-74.
- 496- Massaro EJ & Lennarz WJ. (1965) The partial purification and characterization of a bacterial fatty acyl coenzyme A synthetase. *Biochemistry* **4**: 85-90.
- 497- Shimizu S, Inoue K, Tani Y & Yamada H. (1979) Enzymatic microdetermination of serum free fatty acids. *Anal Biochem* **98**: 341-5.
- 498- Shimizu S, Tani Y, Yamada H, Tabata M & Murachi T. (1980) Enzymatic determination of serum-free fatty acids: a colorimetric method. *Anal Biochem* **107**: 193-8.
- 499- Kameda K & Nunn WD. (1981) Purification and characterization of acyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **256**: 5702-7.
- 500- Kameda K, Suzuki LK & Imai Y. (1985) Further purification, characterization and salt activation of acyl-CoA synthetase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **840**: 29-36.
- 501- Grayson NA & Westkaemper RB. (1988) Stable analogs of acyl adenylates. Inhibition of acetyl- and acyl-CoA synthetase by adenosine 5'-alkylphosphates. *Life Sci* **43**: 437-44.
- 502- Laposata M, Reich EL & Majerus PW. (1985) Arachidonoyl-CoA synthetase. Separation from nonspecific acyl-CoA synthetase and distribution in various cells and tissues. *J Biol Chem* **260**: 11016-20.
- 503- Sleeman MW, Donegan NP, Heller-Harrison R, Lane WS & Czech MP. (1998) Association of acyl-CoA synthetase-I with GLUT4-containing vesicles. *J Biol Chem* **273**: 3132-5.
- 504- Pande SV. (1973) Reversal by CoA of palmitoyl-CoA inhibition of long chain acyl-CoA synthetase activity. *Biochim Biophys Acta* **306**: 15-20.
- 505- Oram JF, Wenger JI & Neely JR. (1975) Regulation of long chain fatty acid activation in heart muscle. *J Biol Chem* **250**: 73-8.
- 506- Suzuki H, Kawarabayashi Y, Kondo J, Abe T, Nishikawa K, Kimura S, Hashimoto T & Yamamoto T. (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **265**: 8681-5.
- 507- Fujino T & Yamamoto T. (1992) Cloning and functional expression of a novel long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain. *J Biochem* **111**: 197-203.

- 508- Fujino T, Kang MJ, Suzuki H, Iijima H & Yamamoto T. (1996) Molecular characterization and expression of rat acyl-CoA synthetase 3. *J Biol Chem* **271**: 16748-52.
- 509- Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H & Yamamoto TT. (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2880-4.
- 510- Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, Sasano H, Sato H, Kamataki A, Nagura H, Kang MJ, Fujino T, Suzuki H & Yamamoto TT. (1998) A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem* **124**: 679-85.
- 511- Abe T, Fujino T, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Toh H, Suzuki H & Yamamoto T. (1992) Human long-chain acyl-CoA synthetase: structure and chromosomal location. *J Biochem* **111**: 123-8.
- 512- Minekura H, Fujino T, Kang MJ, Fujita T, Endo Y & Yamamoto TT. (1997) Human acyl-coenzyme A synthetase 3 cDNA and localization of its gene (*ACS3*) to chromosome band 2q34-q35. *Genomics* **42**: 180-1.
- 513- Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM & Prescott SM. (1998) Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (*FACL4*). *Genomics* **49**: 327-30.
- 514- Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, Villanova M, Zollo M, Borsani G, Ballabio A & Renieri A. (1998) *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics* **47**: 350-8.
- 515- Weiner FR, Smith PJ, Wertheimer S & Rubin CS. (1991) Regulation of gene expression by insulin and tumor necrosis factor α in 3T3-L1 cells. Modulation of the transcription of genes encoding acyl-CoA synthetase and stearoyl-CoA desaturase-1. *J Biol Chem* **266**: 23525-8.
- 516- Johnson DR, Knoll LJ, Levin DE & Gordon JL. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (*FAA*) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* **127**: 751-62.
- 517- Fulda M, Heinz E & Wolter FP. (1997) *Brassica napus* cDNAs encoding fatty acyl-CoA synthetase. *Plant Mol Biol* **33**: 911-22.
- 518- Black PN, DiRusso CC, Metzger AK & Heimert TL. (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *J Biol Chem* **267**: 25513-20.
- 519- Fulda M, Heinz E & Wolter FP. (1994) The *fadD* gene of *Escherichia coli* K12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. *Mol Gen Genet* **242**: 241-9.
- 520- van Beilen JB, Eggink G, Enequist H, Bos R & Witholt B. (1992) DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* **6**: 3121-36.
- 521- Fitzmaurice AM & Kolattukudy PE. (1997) Open reading frame 3, which is adjacent to the mycocerosic acid synthase gene, is expressed as an acyl coenzyme A synthase in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **179**: 2608-15.
- 522- Iijima H, Fujino T, Minekura H, Suzuki H, Kang MJ & Yamamoto T. (1996) Biochemical studies of two rat acyl-CoA synthetases, *ACS1* and *ACS2*. *Eur J Biochem* **242**: 186-90.
- 523- Wilson DB, Prescott SM & Majerus PW. (1982) Discovery of an arachidonoyl coenzyme A synthetase in human platelets. *J Biol Chem* **257**: 3510-5.
- 524- Neufeld EJ, Sprecher H, Evans RW & Majerus PW. (1984) Fatty acid structural requirements for activity of arachidonoyl-CoA synthetase. *J Lipid Res* **25**: 288-93.
- 525- Reddy TS & Bazan NG. (1983) Kinetic properties of arachidonoyl-coenzyme A synthetase in rat brain microsomes. *Arch Biochem Biophys* **226**: 125-33.
- 526- Cantú ES, Sprinkle TJ, Ghosh B & Singh I. (1995) The human palmitoyl-CoA ligase (*FACL2*) gene maps to the chromosome 4q34-q35 region by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and somatic cell hybrid panels. *Genomics* **28**: 600-2.
- 527- Wu P, Skrede S, Hvattum E & Bremer J. (1993) Substrate and hormone regulation of palmitoyl-CoA synthetase in 7800 C1 Morris hepatoma cells and cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1170**: 118-24.
- 528- Kansara MS, Mehra AK, Von Hagen J, Kabotyansky E & Smith PJ. (1996) Physiological concentrations of insulin and T₃ stimulate 3T3-L1 adipocyte acyl-CoA synthetase gene transcription. *Am J Physiol* **270**: E873-81.

- 529- Schoonjans K, Staels B, Grimaldi P & Auwerx J. (1993) Acyl-CoA synthetase mRNA expression is controlled by fibric-acid derivatives, feeding and liver proliferation. *Eur J Biochem* **216**: 615-22.
- 530- Suzuki H, Watanabe M, Fujino T & Yamamoto T. (1995) Multiple promoters in rat acyl-CoA synthetase gene mediate differential expression of multiple transcripts with 5'-end heterogeneity. *J Biol Chem* **270**: 9676-82.
- 531- Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T & Auwerx J. (1995) Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* **270**: 19269-76.
- 532- Groot PHE. (1976) Acyl-CoA synthetases in guinea-pig liver mitochondria. Purification and characterization of a distinct propionyl-CoA synthetase. *Biochim Biophys Acta* **441**: 260-7.
- 533- Ricks CA & Cook RM. (1981) Regulation of volatile fatty acid uptake by mitochondrial acyl CoA synthetases of bovine liver. *J Dairy Sci* **64**: 2324-35.
- 534- Vessey DA & Kelley M. (1997) Purification and partial sequencing of the XL-I form of xenobiotic-metabolizing medium chain fatty acid: CoA ligase from bovine liver mitochondria, and its homology with the essential hypertension protein. *Biochim Biophys Acta* **1346**: 231-6.
- 535- Kasuya F, Igarashi K, Fukui M & Nokihara K. (1996) Purification and characterization of a medium chain acyl-coenzyme A synthetase. *Drug Metab Dispos* **24**: 879-83.
- 536- Aas M & Bremer J. (1968) Short-chain fatty acid activation in rat liver. A new assay procedure for the enzymes and studies on their intracellular localization. *Biochim Biophys Acta* **164**: 157-66.
- 537- Killenberg PG, Davidson ED & Webster LT. (1971) Evidence for a medium-chain fatty acid: coenzyme A ligase (adenosine monophosphate) that activates salicylate. *Mol Pharmacol* **7**: 260-8.
- 538- Jencks WP & Lipmann F. (1957) Studies on the initial step of fatty acid activation. *J Biol Chem* **225**: 207-23.
- 539- Peng CHL. (1956) Butyryl adenylate and its possible function in the fatty acid activating system. *Biochim Biophys Acta* **22**: 42-8.
- 540- Whitehouse M, Moeksi H & Gurin S. (1957) The synthesis and biological properties of fatty acyl adenylates. *J Biol Chem* **226**: 813-9.
- 541- Shimizu S, Inoue K, Tani Y & Yamada H. (1981) Butyryl-CoA synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun* **103**: 1231-7.
- 542- Wanders RJA, van Roermund CWT, van Wijland MJA, Schutgens RBH, Heikoop J, van den Bosch H, Schram AW & Tager JM. (1987) Peroxisomal fatty acid β -oxidation in relation to the accumulation of very long chain fatty acids in cultured skin fibroblasts from patients with Zellweger syndrome and other peroxisomal disorders. *J Clin Invest* **80**: 1778-83.
- 543- Lageweg W, Wanders RJA & Tager JM. (1991) Long-chain-acyl-CoA synthetase and very-long-chain-acyl-CoA synthetase activities in peroxisomes and microsomes from rat liver. An enzymological study. *Eur J Biochem* **196**: 519-23.
- 544- Sandhir R, Khan M, Chahal A & Singh I. (1998) Localization of nervonic acid β -oxidation in human and rodent peroxisomes: impaired oxidation in Zellweger syndrome and X-linked adrenoleukodystrophy. *J Lipid Res* **39**: 2161-71.
- 545- Singh I, Lazo O, Dhaunsi GS & Contreras M. (1992) Transport of fatty acids into human and rat peroxisomes. Differential transport of palmitic and lignoceric acids and its implication to X-adrenoleukodystrophy. *J Biol Chem* **267**: 13306-13.
- 546- Lazo O, Contreras M, Hashmi M, Stanley W, Irazu C & Singh I. (1988) Peroxisomal lignoceroyl-CoA ligase deficiency in childhood adrenoleukodystrophy and adrenomyeloneuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7647-51.
- 547- Uchida Y, Kondo N, Orii T & Hashimoto T. (1996) Purification and properties of rat liver peroxisomal very-long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biochem* **119**: 565-71.
- 548- Uchiyama A, Aoyama T, Kamijo K, Uchida Y, Kondo N, Orii T & Hashimoto T. (1996) Molecular cloning of cDNA encoding rat very long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem* **271**: 30360-5.
- 549- Berger J, Truppe C, Neumann H & Forss-Petter S. (1998) cDNA cloning and mRNA distribution of a mouse very long-chain acyl-CoA synthetase. *FEBS Lett* **425**: 305-9.
- 550- Muralidharan FN & Muralidharan VB. (1986) Phytanoyl-CoA ligase activity in rat liver. *Biochem Int* **13**: 123-30.

- 551- Vamecq J, de Hoffmann E & Van Hoof F. (1985) The microsomal dicarboxyl-CoA synthetase. *Biochem J* **230**: 683-93.
- 552- Berg P. (1955) Participation of adenylyl-acetate in the acetate-activating system. *J Am Chem Soc* **77**: 3163-4.
- 553- Cleland WW. (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim Biophys Acta* **67**: 104-37.
- 554- Webster LT. (1967) Studies of the acetyl coenzyme A synthetase reaction. V. The requirement for monovalent and divalent cations in partial reactions involving enzyme-bound acetyl adenylyl. *J Biol Chem* **242**: 1232-40.
- 555- Boyer PD, Koeppe OJ & Luchsinger WW. (1956) Direct oxygen transfer in enzymic syntheses coupled to adenosine triphosphate degradation. *J Am Chem Soc* **78**: 356-7.
- 556- Jones ME & Lipmann F. (1953) On the enzymatic mechanism of coenzyme A acetylation with adenosine triphosphate and acetate. *J Am Chem Soc* **75**: 3285-6.
- 557- Webster LT (1963) Studies of the acetyl coenzyme A synthetase reaction. I. Isolation and characterization of enzyme-bound acetyl adenylyl. *J Biol Chem* **238**: 4010-5.
- 558- Mao LF, Millington DS & Schulz H. (1992) Formation of a free acyl adenylyl during the activation of 2-propylpentanoic acid. Valproyl-AMP: a novel cellular metabolite of valproic acid. *J Biol Chem* **267**: 3143-6.
- 559- Devlin TM. (1986) Textbook of biochemistry with clinical correlations. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. New York.
- 560- Stryer L. (1995) Biochemistry. 4th ed. Ed. por WH Freeman & Company. New York.
- 561- Rawn JD. (1983) Biochemistry. Ed. por Harper & Row, Publishers. New York.
- 562- Lehninger AL. (1970) Biochemistry. 2nd ed. Worth Publishers. New York.
- 563- Parsons P & Huang SY. (1977) Mechanism of action of long chain fatty acyl-CoA ligase from rat liver mitochondria. *J Cell Biol* **75**: 307a.
- 564- Vignais PV & Zabin I. (1958) Synthesis and properties of palmityl adenylyl, palmityl coenzyme A, and palmityl glutathione. *Biochim Biophys Acta* **29**: 263-9.
- 565- McElroy WD & Seliger HH. (1962) Mechanism of action of firefly luciferase. *Fed Proc* **21**: 1006-12.
- 566- DeLuca M. (1976) Firefly luciferase. *Adv Enzymol* **44**: 37-68.
- 567- Hastings JW. (1983) Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J Mol Evol* **19**: 309-21.
- 568- Mager HIX & Tu SC. (1995) Chemical aspects of bioluminescence. *Photochem Photobiol* **62**: 607-14.
- 569- Hastings JW. (1996) Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* **173**: 5-11.
- 570- Bitler B & McElroy WD. (1957) The preparation and properties of crystalline firefly luciferin. *Arch Biochem Biophys* **72**: 358-68.
- 571- Seliger HH, McElroy WD, White EH & Field GF. (1961) Stereospecificity and firefly bioluminescence, a comparison of natural and synthetic luciferins. *Proc Natl Acad Sci USA* **47**: 1129-34.
- 572- White EH, McCapra F, Field GF & McElroy WD. (1961) The structure and synthesis of firefly luciferin. *J Am Chem Soc* **83**: 2402-3.
- 573- White EH, McCapra F & Field GF. (1963) The structure and synthesis of firefly luciferin. *J Am Chem Soc* **85**: 337-43.
- 574- Seliger HH & McElroy WD. (1964) The colors of firefly bioluminescence: enzyme configuration and species specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **52**: 75-81.
- 575- Viviani VR & Bechara EJH. (1993) Biophysical and biochemical aspects of phengodid (railroad-worm) bioluminescence. *Photochem Photobiol* **58**: 615-22.
- 576- Hadji-Mohammadi MR & Chaichi MJ. (1996) Separation, identification and determination of luciferin in the iranian firefly, *Lampyrus turkestanicus* by HPLC and spectroscopic methods. *Photochem Photobiol* **64**: 821-2.
- 577- Kishi Y, Matsuura S, Inoue S, Shimomura O & Goto T. (1968) Luciferin and luciopterin isolated from the japanese firefly *Luciola cruciata*. *Tetrahedron Letters* **24**: 2847-50.
- 578- McElroy WD, Seliger HH & White EH. (1969) Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin. *Photochem Photobiol* **10**: 153-70.

- 579- McElroy WD & DeLuca MA. (1983) Firefly and bacterial luminescence: basic science and applications. *J Appl Biochem* **5**: 197-209.
- 580- McElroy WD. (1962) Firefly luciferase. *The Enzymes* **6**: 433-42.
- 581- McElroy WD & Seliger HH. (1963) The chemistry of light emission. *Adv Enzymol* **25**: 119-66.
- 582- McElroy WD, DeLuca M & Travis J. (1967) Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared. *Science* **157**: 150-60.
- 583- Goto T & Kishi Y. (1968) Luciferins, bioluminescent substances. *Ang Chem* **7**: 407-14.
- 584- DeLuca M & McElroy WD. (1978) Purification and properties of firefly luciferase. *Methods Enzymol* **57**: 3-15.
- 585- Bowie LJ. (1978) Synthesis of firefly luciferin and structural analogs. *Methods Enzymol* **57**: 15-28.
- 586- Wulff K. (1983) Luminometry. In *Methods of enzymatic analysis*. Third Edition. Ed. por HU Bergmeyer. Pág. 340-68. Verlag Chemie, Fl.
- 587- Wood KV. (1995) The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence. *Photochem Photobiol* **62**: 662-73.
- 588- Baldwin TO. (1996) Firefly luciferase: the structure is known, but the mystery remains. *Structure* **4**: 223-8.
- 589- Wood KV, Lam YA & McElroy WD. (1989) Introduction to beetle luciferases and their applications. *J Biolumin Chemilumin* **4**: 289-301.
- 590- Thore A. (1979) Technical aspects of the bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. *Science Tools* **26**: 30-4.
- 591- Kricka LJ. (1988) Clinical and biochemical applications of luciferases and luciferins. *Anal Biochem* **175**: 14-21.
- 592- Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GSAB & Kricka LJ. (1994) Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assay. *Anal Biochem* **219**: 169-81.
- 593- Gould SJ & Subramani S. (1988) Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem* **175**: 5-13.
- 594- Lall AB, Seliger HH, Biggley WH & Lloyd JE. (1980) Ecology of colors of firefly bioluminescence. *Science* **210**: 560-2.
- 595- Wood KV, Lam YA, Seliger HH & McElroy WD. (1989) Complementary DNA coding for beetle luciferases can elicit bioluminescence of different colors. *Science* **244**: 700-2.
- 596- McCapra F, Gilfoyle DJ, Young DW, Church NJ & Spencer P. (1994) The chemical origin of colour differences in beetle bioluminescence. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: fundamentals and applied aspects*. Ed. por AK Campbell, LJ Kricka & PE Stanley. Pág. 387-91. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- 597- McElroy WD. (1947) The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proc Natl Acad Sci USA* **33**: 342-5.
- 598- McElroy WD & Strehler BL. (1949) Factors influencing the response of the bioluminescent reaction to adenosine triphosphate. *Arch Biochem* **22**: 420-33.
- 599- Hastings JW, McElroy WD & Coulombre J. (1953) The effect of oxygen upon the immobilization reaction in firefly luminescence. *J Cell and Comp Physiol* **42**: 137-50.
- 600- McElroy WD & Green A. (1956) Function of adenosine triphosphate in the activation of luciferin. *Arch Biochem Biophys* **64**: 257-71.
- 601- Plant PJ, White EH & McElroy WD. (1968) The decarboxylation of luciferin in firefly bioluminescence. *Biochem Biophys Res Commun* **31**: 98-103.
- 602- Suzuki N & Goto T. (1971) Firefly bioluminescence II. Identification of 2-(6'-hydroxybenzothiazol-2'-YL)-4-hydroxythiazole as a product in the bioluminescence of firefly lanterns and as a product in the chemiluminescence of firefly luciferin in DMSO. *Tetrahedron Letters* **22**: 2021-4.
- 603- Suzuki N & Goto T. (1972) Studies on firefly bioluminescence - II. Identification of oxyluciferin as a product in the bioluminescence of firefly lanterns and in the chemiluminescence of firefly luciferin. *Tetrahedron* **28**: 4075-82.
- 604- Rhodes WC & McElroy WD. (1958) The synthesis and function of luciferyl-adenylate and oxyluciferyl-adenylate. *J Biol Chem* **233**: 1528-37.
- 605- Dukhovich A, Sillero A & Günther Sillero MA. (1996) Time course of luciferyl adenylate synthesis in the firefly luciferase reaction. *FEBS Lett* **395**: 188-90.

- 606- Seliger HH & McElroy WD. (1960) Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch Biochem Biophys* **88**: 136-41.
- 607- Lee RT, Denburg JL & McElroy WD. (1970) Substrate-binding properties of firefly luciferase. II. ATP-binding site. *Arch Biochem Biophys* **141**: 38-52.
- 608- Moyer JD & Henderson JF. (1983) Nucleoside triphosphate specificity of firefly luciferase. *Anal Biochem* **131**: 187-9.
- 609- Momsen G. (1978) Firefly luciferase reacts with P^1, P^5 -di(adenosine-5')-pentaphosphate and adenosine-5'-tetraphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* **84**: 816-22.
- 610- Leach FR, Webster JJ, Hall MS, Savage LA, Hampton GJ, McCarthy J, VanDoren T & Hooper KD. (1986) Stimulation of firefly luciferase by ATP analogs. *Fed Proc* **45**: 1742.
- 611- White EH, Wörther H, Field GF & McElroy WD. (1965) Analogs of firefly luciferin. *J Org Chem* **30**: 2344-8.
- 612- White EH, Wörther H, Seliger HH & McElroy WD. (1966) Amino analogs of firefly luciferin and biological activity thereof. *J Am Chem Soc* **88**: 2015-9.
- 613- White EH & Roswell DF. (1991) Analogs and derivatives of firefly oxyluciferin, the light emitter in firefly bioluminescence. *Photochem Photobiol* **53**: 131-6.
- 614- Green AA & McElroy WD. (1956) Crystalline firefly luciferase. *Biochim Biophys Acta* **20**: 170-6.
- 615- Imai K & Goto T. (1988) Improved synthesis of firefly D-luciferyl-D-adenylate. A key intermediate of firefly bioluminescence. *Agric Biol Chem* **52**: 2803-9.
- 616- Lambert N. (1996) Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light. *Biochem J* **317**: 273-7.
- 617- Lambert N & Idahl LA. (1995) Regulatory effects of ATP and luciferin on firefly luciferase activity. *Biochem J* **305**: 929-33.
- 618- DeLuca M & McElroy WD. (1984) Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase. *Biochem Biophys Res Commun* **123**: 764-70.
- 619- Lundin A, Rickardsson A & Thore A. (1976) Continuous monitoring of ATP-converting reactions by purified firefly luciferase. *Anal Biochem* **75**: 611-20.
- 620- Karl DM & Holm-Hansen O. (1976) Effects of luciferin concentration on the quantitative assay of ATP using crude luciferase preparations. *Anal Biochem* **75**: 100-12.
- 621- Webster JJ, Chang JC, Manley ER, Spivey HO & Leach FR. (1980) Buffer effects on ATP analysis by firefly luciferase. *Anal Biochem* **106**: 7-11.
- 622- Denburg JL & McElroy WD. (1970) Anion inhibition of firefly luciferase. *Arch Biochem Biophys* **141**: 668-75.
- 623- Rosendahl MS, Leonard NJ & DeLuca M. (1982) Dimensional probing of the ATP binding site on firefly luciferase. *Photochem Photobiol* **35**: 857-61.
- 624- Hopkins TA, Seliger HH, White EH & Cass MW. (1967) The chemiluminescence of firefly luciferin. A model for the bioluminescent reaction and identification of the product excited state. *J Am Chem Soc* **89**: 7148-50.
- 625- McCapra F, Chang YC & Francois VP. (1968) The chemiluminescence of a firefly luciferin analogue. *Chem Commun* : 22-3.
- 626- Suzuki N, Sato M, Nishikawa K & Goto T. (1969) Synthesis and spectral properties of 2-(6'-hydroxybenzothiazol-2'-YL)-4-hydroxythiazole, a possible emitting species in the firefly bioluminescence. *Tetrahedron Letters* **53**: 4683-4.
- 627- Suzuki N, Sato M, Okada K & Goto T. (1972) Studies on firefly bioluminescence - I. Synthesis and spectral properties of firefly oxyluciferin. A possible emitting species in firefly bioluminescence. *Tetrahedron* **28**: 4065-74.
- 628- Shimomura O, Goto T & Johnson FH. (1977) Source of oxygen in the CO_2 produced in the bioluminescent oxidation of firefly luciferin. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 2799-802.
- 629- Wannlund J, DeLuca M, Stempel K & Boyer PD. (1978) Use of ^{14}C -carboxyl-luciferin in determining the mechanism of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochem Biophys Res Commun* **81**: 987-92.
- 630- Gates BJ & DeLuca M. (1975) The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction. *Arch Biochem Biophys* **169**: 616-21.
- 631- DeLuca M, Wannlund J & McElroy WD. (1979) Factors affecting the kinetics of light emission from crude and purified firefly luciferase. *Anal Biochem* **95**: 194-8.

- 632- Ford SR, Chenault KH, Bunton LS, Hampton GJ, McCarthy J, Hall MS, Pangburn SJ, Buck LM & Leach FR. (1996) Use of firefly luciferase for ATP measurement: other nucleotides enhance turnover. *J Biolumin Chemilumin* **11**: 149-67.
- 633- Ford SR, Buck LM & Leach FR. (1995) Does the sulfhydryl or the adenine moiety of CoA enhance firefly luciferase activity? *Biochim Biophys Acta* **1252**: 180-4.
- 634- Ford SR, Hall MS & Leach FR. (1992) Enhancement of firefly luciferase activity by cytidine nucleotides. *Anal Biochem* **204**: 283-91.
- 635- Ford SR, Chenault KD, Hall MS, Pangburn SJ & Leach FR. (1994) Effect of periodate-oxidized ATP and other nucleotides on firefly luciferase. *Arch Biochem Biophys* **314**: 261-7.
- 636- Ford SR & Leach FR. (1991) Firefly luciferase-luciferin-ATP mixtures respond to etheno-ATP with an increased and steady production of light: a partial explanation of the *Limulus* ventral photoreceptor controversy. *Am J Physiol* **261**: C1210-1.
- 637- Wood KV. (1990) Novel assay of firefly luciferase providing greater sensitivity and ease of use. *J Cell Biol* **111**: 380a.
- 638- Leach FR, Ford SR & Hall MS. (1991) Effect of cytidine nucleotides on firefly luciferase. *FASEB J* **5**: A785.
- 639- Kricka LJ & DeLuca M. (1982) Effect of solvents on the catalytic activity of firefly luciferase. *Arch Biochem Biophys* **217**: 674-81.
- 640- Wang CY & Andrade JD. (1996) Surfactants and coenzyme A as cooperative enhancers of the activity of firefly luciferase. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Mol Reporting with Photons*. Pág. 253-6. Ed. por JW Hastings, LJ Kricka & PE Stanley. Proceedings of 9th International Symposium, Wiley.
- 641- Gandelman O, Allue I, Bowers K & Cobbold P. (1994) Cytoplasmic factors that affect the intensity and stability of bioluminescence from firefly luciferase in living mammalian cells. *J Biolumin Chemilumin* **9**: 363-71.
- 642- Strehler BL & Totter JR. (1952) Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. I. Substrate and enzyme determination. *Arch Biochem Biophys* **40**: 28-41.
- 643- Airth RL, Rhodes WC & McElroy WD. (1958) The function of coenzyme A in luminescence. *Biochim Biophys Acta* **27**: 519-32.
- 644- Pazzagli M, Devine JH, Peterson DO & Baldwin TO. (1992) Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. *Anal Biochem* **204**: 315-23.
- 645- Steghens JP, Min KL & Bernengo JC. (1998) Firefly luciferase has two nucleotide binding sites: effect of nucleoside monophosphate and CoA on the light-emission spectra. *Biochem J* **336**: 109-13.
- 646- McElroy WD, Hastings JW, Coulombre J & Valerie S. (1953) The mechanism of action of pyrophosphate in firefly luminescence. *Arch Biochem Biophys* **46**: 399-416.
- 647- Rhodes WC & McElroy WD. (1958) Enzymatic synthesis of adenylyl-oxyluciferin. *Science* **128**: 253-4.
- 648- DeLuca M, Wirtz GW & McElroy WD. (1964) Role of sulfhydryl groups in firefly luciferase. *Biochemistry* **3**: 935-9.
- 649- Lemasters JJ & Hackenbrock CR. (1977) Kinetics of product inhibition during firefly luciferase luminescence. *Biochemistry* **16**: 445-7.
- 650- Denburg JL, Lee RT & McElroy WD. (1969) Substrate-binding properties of firefly luciferase. I. Luciferin-binding site. *Arch Biochem Biophys* **134**: 381-94.
- 651- DeLuca M & McElroy WD. (1974) Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry* **13**: 921-5.
- 652- Morton RA, Hopkins TA & Seliger HH. (1969) The spectroscopic properties of firefly luciferin and related compounds. An approach to product emission. *Biochemistry* **8**: 1598-607.
- 653- Lemasters JJ & Hackenbrock CR. (1973) Adenosine triphosphate: continuous measurement in mitochondrial suspensions by firefly luciferase luminescence. *Biochem Biophys Res Commun* **55**: 1262-70.
- 654- Goto T, Kubota I, Suzuki N & Kishi Y. (1973) Aspects of the mechanism of bioluminescence. In *Chemiluminescence and Bioluminescence*. Ed. por MJ Cormier, DM Hercules & J Lee. Pág. 325-35. Plenum Press. New York.
- 655- Lundin A & Thore A. (1975) Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP. *Anal Biochem* **66**: 47-63.
- 656- De Wet JR, Wood KV, Helinski DR & DeLuca M. (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 7870-3.

- 657- De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR & Subramani S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**: 725-37.
- 658- Masuda T, Tatsumi H & Nakano E. (1989) Cloning and sequence analysis of cDNA for luciferase of a Japanese firefly, *Luciola cruciata*. *Gene* **77**: 265-70.
- 659- Tatsumi H, Kajiyama N & Nakano E. (1992) Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a cDNA clone encoding luciferase of a firefly, *Luciola lateralis*. *Biochim Biophys Acta* **1131**: 161-5.
- 660- Ohmiya Y, Ohba N, Toh H & Tsuji F. (1995) Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the luciferases from the Japanese fireflies, *Pyrocoelia miyako* and *Hotaria parvula*. *Photochem Photobiol* **62**: 309-13.
- 661- Devine JH, Kutuzova GD, Green VA, Ugarova NN & Baldwin TO. (1993) Luciferase from the east European firefly *Luciola mingrelica*: cloning and nucleotide sequence of the cDNA, overexpression in *Escherichia coli* and purification of the enzyme. *Biochim Biophys Acta* **1173**: 121-32.
- 662- Sala-Newby GB, Thomson CM & Campbell AK. (1996) Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*. *Biochem J* **313**: 761-7.
- 663- Ye L, Buck LM, Schaeffer HJ & Leach FR. (1997) Cloning and sequencing of a cDNA for firefly luciferase from *Photuris pennsylvanica*. *Biochim Biophys Acta* **1339**: 39-52.
- 664- Conti E, Franks NP & Brick P. (1996) Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate forming-enzymes. *Structure* **4**: 287-98.
- 665- Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA & Brick P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* **16**: 4174-83.
- 666- Belinga HF, Steghens JP & Collombel C. (1995) Firefly luciferase purification using polyethylene glycol and Dymatex Orange A. *J Chromatog* **695**: 33-40.
- 667- Strehler BL & McElroy WD. (1957) Assay of adenosine triphosphate. *Methods Enzymol* **3**: 871-3.
- 668- Lust WD, Feussner GK, Barbehenn EK & Passonneau JV. (1981) The enzymatic measurement of adenine nucleotides and P-creatine in picomole amounts. *Anal Biochem* **110**: 258-66.
- 669- Idahl LA & Lembert N. (1995) Glycerol 3-phosphate-induced ATP production in intact mitochondria pancreatic B-cells. *Biochem J* **312**: 287-92.
- 670- Wibom R, Lundin A & Hultman E. (1990) A sensitive method for measuring ATP-formation in rat muscle mitochondria. *Scand J Clin Lab Invest* **50**: 143-52.
- 671- DiLella AG, Hope DA, Chen H, Trumbauer M, Schwartz RJ & Smith RG. (1988) Utility of firefly luciferase as a reporter gene for promoter activity in transgenic mice. *Nucleic Acids Res* **16**: 4159.
- 672- Chang KH, Xiang H & Dunaway-Mariano D. (1997) Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS3 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase. *Biochemistry* **36**: 15650-9.
- 673- Bairoch A. (1999) The enzyme data bank in 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 310-1.
- 674- Toh H. (1991) Sequence analysis of firefly luciferase family reveals a conservative sequence motive. *Protein Seq Data Anal* **4**: 111-7.
- 675- Babbitt PC, Kenyon GL, Martin BM, Charest H, Slyvestre M, Scholten JD, Chang KH, Liang PH & Dunaway-Mariano D. (1992) Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl: adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* **31**: 5594-604.
- 676- Lozoya E, Hoffmann H, Douglas C, Schulz W, Scheel D & Hahlbrock K. (1988) Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate: CoA ligase genes in parsley. *Eur J Biochem* **176**: 661-7.
- 677- Zhao Y, Kung SD, Dube SK. (1990) Nucleotide sequence of rice 4-coumarate:CoA ligase gene. *Nucleic Acids Res* **18**: 6144.
- 678- Becker-André M, Schulze-Lefert P & Hahlbrock K. (1991) Structural comparison, modes of expression, and putative cis-acting elements of the two 4-coumarate: CoA ligase genes in potato. *J Biol Chem* **266**: 8551-9.
- 679- Schmitz A, Gartemann KH, Fiedler J, Grund E & Eichenlaub R. (1992) Cloning and sequence analysis of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU. *Appl Environ Microbiol* **58**: 4068-71.

- 680- Mallonee DH, Adams JL & Hylemon PB. (1992) The bile acid-inducible *baiB* gene from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708 encodes a bile acid-coenzyme A ligase. *J Bacteriol* **174**: 2065-71.
- 681- Eichler K, Bourgis F, Buchet A, Kleber H-P & Mandrand-Berthelot MA. (1994) Molecular characterization of the *cai* operon necessary for carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **13**: 775-86.
- 682- Driscoll JR & Taber HW. (1992) Sequence organization and regulation of the *Bacillus subtilis* *menBE* operon. *J Bacteriol* **174**: 5063-71.
- 683- Hori K, Yamamoto Y, Minetoki T, Kurotsu T, Kanda M, Miura S, Okamura K, Furuyama J & Saito Y. (1989) Molecular cloning and nucleotide sequence of gramicidin S synthetase 1 gene. *J Biochem* **106**: 639-45.
- 684- Krätzschmar J, Krause M & Marahiel MA. (1989) Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *grsB* has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J Bacteriol* **171**: 5422-9.
- 685- Hori K, Yamamoto Y, Tokita K, Saito F, Kurotsu T, Kanda M, Okamura K, Furuyama J & Saito Y. (1991) The nucleotide sequence for a proline-activating domain of gramicidin S synthetase 2 gene from *Bacillus brevis*. *J Biochem* **110**: 111-9.
- 686- Turgay K, Krause M & Marahiel MA. (1992) Four homologous domains in the primary structure of *GrsB* are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol Microbiol* **6**: 529-46.
- 687- Weckermann R, Fürbaß R & Marahiel MA. (1988) Complete nucleotide sequence of the *tycA* gene coding the tyrocidine synthase I from *Bacillus brevis*. *Nucleic Acids Res* **16**: 11841.
- 688- Smith DJ, Earl AJ & Turner G. (1990) The multifunctional peptide synthetase performing the first step of penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum* is a 421 073 dalton protein similar to *Bacillus brevis* peptide antibiotic synthetases. *EMBO J* **9**: 2743-50.
- 689- Díez B, Gutiérrez S, Barredo JL, van Solingen P, van der Voort LHM & Martín JF. (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the *pcbAB* gene encoding the α -aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase and linkage to *pcbC* and *penDE* genes. *J Biol Chem* **265**: 16358-65.
- 690- Gutiérrez S, Díez B, Montenegro E & Martín JF. (1991) Characterization of the *Cephalosporium acremonium* *pcbAB* gene encoding α -aminoadipyl-cysteiny-valine synthetase, a large multidomain peptide synthetase: linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. *J Bacteriol* **173**: 2354-65.
- 691- MacCabe AP, van Liempt H, Palissa H, Unkles SE, Riach MBR, Pfeifer E, van Döhren H & Kinghorn JR. (1991) δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteiny-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. Molecular characterization of the *acvA* gene encoding the first enzyme of the penicillin biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **266**: 12646-54.
- 692- Staab JF, Elkins MF, Earhart CF. (1989) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *entE* gene. *FEMS Microbiol Lett* **50**: 15-19.
- 693- Rusnak F, Sakaitani M, Drueckhammer D, Reichert J & Walsh CT. (1991) Biosynthesis of the *Escherichia coli* siderophore enterobactin: sequence of the *EntF* gene, expression and purification of EntF, and analysis of covalent phosphopantetheine. *Biochemistry* **30**: 2916-27.
- 694- Morris ME & Jinks-Robertson S. (1991) Nucleotide sequence of the *LYS2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: homology to *Bacillus brevis* tyrocidine synthetase 1. *Gene* **98**: 141-5.
- 695- Roberto FF, Klee H, White F, Nordeen R & Kosuge T. (1990) Expression and fine structure of gene encoding N⁶-(indole-3-acetyl)-L-lysine synthetase from *Pseudomonas savastanoi*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5797-801.
- 696- Schaffer JE & Lodish HF. (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* **79**: 427-36.
- 697- Schaap FG, Hamers L, van der Vusse GJ & Glatz JFC. (1997) Molecular cloning of fatty acid-transport protein cDNA from rat. *Biochim Biophys Acta* **1354**: 29-34.
- 698- Black PN, Zhang Q, Weimar JD & DiRusso CC. (1997) Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *J Biol Chem* **272**: 4896-903.
- 699- Scholten JD, Chang KH, Babbitt PC, Charest H, Sylvestre M & Dunaway-Mariano D. (1991) Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science* **253**: 182-5.

- 700- Schröder J. (1989) Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase. *Nucleic Acids Res* **17**: 460.
- 701- Toh H. (1990) N-terminal halves of gramicidin S synthetase 1, and tyrocidine synthetase 1 as novel members of firefly luciferase family. *Protein Seq Data Anal* **3**: 517-21.
- 702- Pavela-Vrancic M, Pfeifer E, van Liempt H, Schäfer HJ, von Döhren H & Kleinkauf H. (1994) ATP binding in peptide synthetases: determination of contact sites of the adenine moiety by photoaffinity labeling of tyrocidine synthetase 1 with 2-azidoadenosine triphosphate. *Biochemistry* **33**: 6276-83.
- 703- Dieckmann R, Lee YO, van Liempt H, von Döhren H & Kleinkauf H. (1995) Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett* **357**: 212-6.
- 704- Kleinkauf H & von Döhren H. (1996) A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur J Biochem* **236**: 335-51.
- 705- Kleinkauf H & Döhren H. (1990) Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* **192**: 1-15.
- 706- Stein T, Vater J, Kruft V, Otto A, Wittmann-Liebold B, Franke P, Panico M, McDowell R & Morris HR. (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. *J Biol Chem* **271**: 15428-35.
- 707- van Liempt H, von Döhren H & Kleinkauf H. (1989) δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase from *Aspergillus nidulans*. The first enzyme in penicillin biosynthesis is a multifunctional peptide synthetase. *J Biol Chem* **264**: 3680-4.
- 708- Kleinkauf H, Roskoski R & Lipmann F. (1971) Pantetheine-linked peptide intermediates in gramicidin S and tyrocidine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 2069-72.
- 709- Knobloch KH & Hahlbrock K. (1977) 4-Coumarate:CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm. *Arch Biochem Biophys* **184**: 237-48.
- 710- Chang KH & Dunaway-Mariano D. (1996) Determination of the chemical pathway for 4-chlorobenzoate: coenzyme A ligase catalysis. *Biochemistry* **35**: 13478-84.
- 711- Rusnak F, Faraci WS & Walsh CT. (1989) Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product. *Biochemistry* **28**: 6827-35.
- 712- Sagisaka S & Shimura K. (1960) Mechanism of activation and reduction of α -aminoadipic acid by yeast enzyme. *Nature* **188**: 1189-90.
- 713- Sinha AK & Bhattacharjee JK. (1971) Lysine biosynthesis in *Saccharomyces*. Conversion of α -aminoadipate into α -aminoadipic δ -semialdehyde. *Biochem J* **125**: 743-9.
- 714- Kleinkauf H, Gevers W & Lipman F. (1969) Interrelation between activation and polymerization in gramicidin S biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **62**: 226-33.
- 715- Lee SG & Lipmann F. (1975) Tyrocidine synthetase system. *Methods Enzymol* **43**: 585-602.
- 716- Gocht M & Marahiel MA. (1994) Analysis of core sequences in the D-Phe activating domain of the multifunctional peptide synthetase *TycA* by site-directed mutagenesis. *J Bacteriol* **176**: 2654-62.
- 717- Vater J & Kleinkauf H. (1976) Gramicidin S-synthetase. A further characterization of phenylalanine racemase, the light enzyme of gramicidin S-synthetase. *Biochim Biophys Acta* **429**: 1062-72.
- 718- Pavela-Vrancic M, Liempt HV, Pfeifer E, Freist W & von Döhren H. (1994) Nucleotide binding by multienzyme peptide synthetases. *Eur J Biochem* **220**: 535-42.
- 719- Jakubowski H. (1998) Aminoacylation of coenzyme A and pantetheine by aminoacyl-tRNA synthetases: possible link between noncoded and coded peptide synthesis. *Biochemistry* **37**: 5147-53.
- 720- Beaven GH, Holiday ER & Johnson EA. (1955) Optical properties of nucleic acids and their components. In *The Nucleic Acids*. Vol. 1. Ed. por E Chargaff & JN Davidson. Pág. 493-553. Academic Press. New York.
- 721- Pecoraro VL, Hermes JD & Cleland WW. (1984) Stability constants of Mg^{2+} and Cd^{2+} complexes of adenine nucleotides and thionucleotides and rate constants for formation and dissociation of $MgATP$ and $MgADP$. *Biochemistry* **23**: 5262-71.
- 722- Dawson RM, Elliott DC, Elliott WH & Jones KM. (1989) Data for biochemical research. 3th ed. Clarendon Press. Oxford.
- 723- Kumble KD & Kornberg A. (1995) Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J Biol Chem* **270**: 5818-22.

- 724-** Brovko L, Gandelman O & Ugarova N. (1990) Firefly bioluminescence. Fluorescence studies of luciferase interactions with oxyluciferin and its analogs. In Biol. Lumin. Proc. Int. Sch., 1st ed. Pág. 292-308. World Sci. Singapura.
- 725-** White EH, Steinmetz MG, Miano JD, Wildes PD & Morland R. (1980) Chemi- and bioluminescence of firefly luciferin. *J Am Chem Soc* **102**: 3199-208.
- 726-** Engel PC. (1981) Enzyme kinetics. The steady-state approach. 2nd ed. Chapman and Hall Lda. London.
- 727-** Wood HG & Clark JE. (1988) Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Ann Rev Biochem* **57**: 235-60.
- 728-** Gabel NW & Thomas V. (1971) Evidence for the occurrence and distribution of inorganic polyphosphates in vertebrate tissues. *J Neurochem* **18**: 1229-42.