

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

“ I Z T A C A L A ”



ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL ORIGEN DE  
LAS AMINOACIL tRNA<sub>s</sub> SINTETASAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

JOSE ERVIN SILVA GONZALEZ

SAN JUAN IZTACALA, MEXICO

1986



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fué realizado en el Centro de Estudios Nucleares de la U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. F. Guillermo Mosqueira Pérez Salazar, a quien agradezco su inigualable tutoría y sincera amistad.

DEDICATORIA:

A mis padres, a quien todo debo.

A la memoria de mi abuelita Mati.

A la memoria de Ernesto Corona O. (la foca) y de su madre.

A David Z. y Cuper R. ó Cuper R. y David Z. (para que no se enojen) a quienes considero como parte de mi familia y que como tales no olvidan de felicitarme el día de San Marciano. A Enna P. quien en las aulas de clase me ahorró varias idas a la peluquería. A Gerardo H. quien espero dentro de 76 años me vuelva a invitar a ver el cometa Halley. Por supuesto que a Tzasna, de quien admiro su sinceridad y vitalidad, además de extrañar el humo de su cigarro. A René S. por sus consejos y a veces regaños que bien me merecía. A Chuy y sus sabrosísimos maicitos. A Hector P. y sus consejos en el manejo del cubo de Rubik. Al dúo dinámico (Rubén O. y Germán Y.). A Victor por su mal carácter y a Elisa por todo lo contrario. A Citláli, quien me ha acompañado desde la prepa y a Marco Antonio M. (motorcito).

A todos aquellos quienes por ahora escapan de mi mente, como por ejemplo Jorge Eduardo y Angel R., a quienes les doy disculpas por no mencionarlos y a la vez les agradezco el haber participado en mi formación humana.

AGRADECIMIENTOS:

Deseo hacer presente mi agradecimiento al Dr. Antonio Lazcano Araujo por sus valiosos consejos y sugerencias, así como por el entusiasmo mostrado en este trabajo.

Al M. en C. Ismael Ledezma M. por sus aportaciones, discusiones y por esa primera incursión en el área del origen de la vida.

A la Dra. Alicia Negrón M. y compañeros del C.E.N. por sus atinadas observaciones.

y por supuesto, a Enrique Salazar y a su computadora por haber dedicado algunos de sus fines de semana a la redacción e impresión del presente trabajo.

Rompo este huevo y nace la mujer y nace el hombre. Y juntos vivirán y morirán. Pero nacerán nuevamente. Nacerán y volverán a morir y otra vez nacerán. Y nunca dejarán de nacer, porque la muerte es mentira.

Mitología Makiritare.

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL ORIGEN DE LAS AMINOACIL-  
tRNAs SINTETASAS.

Indice.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	4

Capítulo 1

Aminoacil-tRNA sintetasas (codasas).....	13
Purificación.....	16
Distribución.....	26
Elucidación estructural.....	39
Función catalítica.....	45
Reconocimiento del tRNA por la codasa.....	53
a) Modificación química del tRNA.....	58
b) Aminoacilación de moléculas fragmentadas.....	60
c) Análisis de tRNAs mutantes.....	61
d) Formación de complejos covalentes fotoactivados.....	61
e) Aminoacilación heteróloga.....	64

Capítulo 2

Aspectos cinéticos y termodinámicos de la acilación por las codasas.....	67
a) Parámetros termodinámicos.....	67
b) Parámetros cinéticos.....	68
Reacción de unión y activación del aminoácido por la codasa.....	69
a) Unión del ATP con la codasa.....	70
b) Influencia de los cationes divalentes en la actividad de la codasa.....	71
c) Mecanismo de catálisis.....	71
Regulación genética de las codasas.....	73

Capítulo 3

Aspectos generales en el estudio del origen del código genético.....	76
a) Modelo estereoquímico.....	79
b) Modelo darwiniano.....	80
Algunas consideraciones sobre el origen de las codasas.....	81
Conclusiones.....	86
Referencias.....	97

## Resumen

La sorprendente complejidad del código genético y su importancia en la síntesis de proteínas hacen constituir al problema de su surgimiento como uno de los enigmas a resolver en el campo del origen de la vida. De entre las múltiples estructuras moleculares participantes en el mecanismo de la lectura de la información genética encontramos a las aminoacil-tRNA sintetetasas. Estas son moléculas de naturaleza enzimática cuya función consiste en catalizar la transferencia de los aminoácidos hacia su tRNA correspondiente. La ausencia de alguna de ellas llevaría a la pérdida de información en el proceso de traducción y en consecuencia en las proteínas sintetizadas.

En el presente trabajo se da una visión general de conocimiento hasta hoy acumulado sobre las aminoacil-tRNA sintetetasas y las implicaciones que dichos conocimientos tienen para dilucidar el origen de los sistemas vivos, así mismo, se presentan observaciones y sugerencias que nos permitirán conocer más sobre la formación de las aminoacil-tRNA sintetetasas.

La información aquí reportada de sus características arroja los siguientes resultados:

Las características presentes en las aminoacil-tRNA sintetetasas, muestra que son enzimas formadas en un estadio



posterior a la evolución química, durante los procesos de origen de la vida.

La similitud entre la glutamil-, glutaminil y arginil-tRNA sintetetasas, así como la existencia de homologías en todas las aminoacil-tRNA sintetetasas estudiadas, nos permite considerarlas como un grupo de enzimas primitivas asociadas a los sistemas vivos más arcaicos y que posiblemente surgieron a partir de un ancestro común.

Las observaciones anteriores respaldan el modelo biopoyetico propuesto en orden filetico de Replicación, Traducción (con la participación de las aminoacil-tRNA sintetasa) y Transcripción, lo cual no excluye la formación abiótica de moléculas de otra naturaleza que pudieran realizar las funciones de las aminoacil-tRNA sintetetasas.

## INTRODUCCION

(1) A través de su historia el hombre ha presenciado un sinnúmero de sucesos y acontecimientos que inevitablemente lo han llevado a cuestionarse acerca del origen y naturaleza de las cosas, incluyendo, las causas de su propia existencia y de los demás seres animados.

La respuesta a esta última interrogante ha dado lugar a las múltiples concepciones teóricas elaboradas en biología [1], en su mayoría infructuosas, que pretenden esclarecer un problema poco explorado.

Entre las diversas concepciones empleadas a través de la historia de la biología para explicar el origen de la vida, destacan enfoques tan importantes como el vitalismo, el mecanicismo, el materialismo dialéctico y el de la panspermia entre otros. Todas estas acepciones siguen constituyendo, aunque con pequeñas modificaciones, tema de debate en el ámbito de la investigación biológica. (Un análisis más amplio a este respecto se encontrará en las referencias 1, 2 y 3).

Hacia la segunda década de este siglo Oparin y Haldane propusieron, independientemente, las probables condiciones químicas que propiciaron la síntesis de compuestos orgánicos en la Tierra primitiva. Idea que 30 años más tarde se vio consolidada con los trabajos experimentales de Miller.

2

El desarrollo de este tipo de trabajos generó un área de intensa investigación científica: la química prebiótica, misma que se ha conformado desde 1950 hasta nuestros días y cuyo fin consiste en reproducir los fenómenos químicos que dieron origen a los monómeros fundamentales de los seres vivos, los cuales debieron formar la base para constituir los primeros organismos vivos, evento acontecido probablemente hace aproximadamente tres mil quinientos millones de años [4].

Actualmente todos los investigadores que trabajan en este campo están de acuerdo en que la formación abiótica de los compuestos orgánicos precedió al origen de la vida. Sin embargo, no existe un acuerdo general sobre la constitución de la atmósfera primitiva ni sobre los mecanismos detallados de síntesis de los compuestos orgánicos. De ahí que un gran número de ellos continúen elaborando métodos y técnicas nuevas que permitan esclarecer y extrapolar el alcance de los experimentos de simulación con los eventos químicos previos al origen de la vida.

En la tabla I se presentan algunos de los trabajos de simulación más sobresalientes que se han desarrollado en la química prebiótica.

En dicha tabla se hace mención a la mezcla de reacción, la fuente de energía y las condiciones físico-químicas empleadas en cada uno de los experimentos.

Tabla 1  
 DETECCIÓN DE MONÓMEROS Y POLÍMEROS DE IMPORTANCIA BIOLÓGICA (5)

A U T O R	AÑO	MEZCLA DE REACCIÓN	FUENTE DE ENERGÍA	PRODUCTOS DE LA REACCIÓN
<b>AMINOÁCIDOS Y PRECURSORES</b>				
MILLER	1953	$CH_4, NH_3, H_2, H_2O$	DESCARGA ELÉCTRICA	
BAHADUR	1954	FORMOL, KNO <sub>3</sub>	SOLAR	
FDZ	1955	FUMARATO Y MALATO NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CALOR	
ABELSON	1956	$CO, H_2, \delta NH_3, N_2, H_2O$	DESCARGA ELÉCTRICA	LOS TRABAJOS CITADOS REPORTAN LA DETECCIÓN DE AMINOÁCIDOS; EL ORDEN DE FRECUENCIAS ES EL SIGUIENTE: ALANINA, AC. ASPARTICO, AC. GLUTAMICO, GLICINA, ALANINA, LISINA, SERINA, VALINA, ARGININA, HISTIDINA, PROLINA, ORNITINA, ISOLEUCINA, LEUCINA, TRONINA; LOS SIGUIENTES AMINOÁCIDOS POSEEN FRECUENCIAS SEMEJANTES: FENIL-ALANINA, TRONINA, CITOCINA, METIONINA, TRIPTOFANO. EN ALGUNOS CASOS LOS AMINOÁCIDOS NO SE FORMARON EN ESTADO LIBRE SINO QUE SE OBTUVIERON POR HIDROLISIS DE POLÍMEROS. TAMBIÉN SE FORMÓ UN GRAN NÚMERO DE INTERMEDIARIOS DE AMINOÁCIDOS
HYNS	1957	$CO_2, CH_4, NH_3, H_2O, H_2, H_2S, N_2$	U.V	
DOSE	1957	$CH_4, NH_3, H_2O, N_2$	X y Y	
ORO	1961	HCN, NH <sub>3</sub>	CALOR	
SANCHEZ	1966	CIANOACETILENO, HCN, H <sub>2</sub> O	CALOR	
STEINMAN et al	1968	TIOCIANATO DE AMONIO	U.V	
FRIEDMAN Y MILLER	1969	FENILACETILENO	CALOR	
BAR-NUN	1974	$CH_4, C_2H_6, NH_3, H_2O$	ONDAS DE CHOQUE	
YUASA Y ORO	1974	$HCN, H_2O, MgO \text{ o } Mg_2CO_3$	CALOR	
VENTILLA Y EGAMI	1977	FORMOL, HIDROXILAMINA, Fe <sup>++</sup> , Mo <sup>++</sup> , Zn <sup>++</sup> , Cu <sup>++</sup> , Mn <sup>++</sup> , Co <sup>++</sup>	CALOR	
IVANOV Y SLAVCHEVA	1977	GLICINA, MnCO <sub>3</sub> , Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CALOR	
SCHWARTZ Y CHITTENDEN	1977	MALA, UREA, MIN. ARCILLOSOS (MONTMORILLONITA) + ACETATO	U.V	
<b>PURINAS, PIRIMIDINAS, NUCLEOTIDOS Y DERIVADOS</b>				
LOWE	1963	HCN, NH <sub>3</sub>	CALOR	ALGUNOS AMINOÁCIDOS, UREA, PURINAS, PEPTIDOS Y AC. GRASOS.
ORO		ACRILONITRILLO, H <sub>2</sub> O, UREA	CALOR	GUANINA, XANTINA, URACILO
PONNAMPERUMA		HCN, H <sub>2</sub> O	U.V	ADENINA, GUANINA y UREA
PONNAMPERUMA	1966	$CH_4, NH_3, H_2O \text{ o } HCN$		ADENINA GUANINA
SANCHEZ et al	1968	4-AMINOIMIDAZOL-5-CARBONITRILLO + HCN	CALOR	PURINAS
FANG Y ORO	1971	$CO, NH_3, H_2$	CALOR	ADENINA, GUANINA, CITOCINA, UREA, BIURET, GUANIL UREA, MELANINA
YUASA Y ORO	1974	$HCN, H_2O, \text{ o } MgCO_3$	CALOR	DIAMINOMALEODINITRILLO, GLI, ALA, ASP, ADENINA, 4-AMINOIMIDAZOL 5-CARBOXIAMIDIN
CHADHA et al	1974	$CH_4, NH_3$	EFLUVIO Y ARCO ELÉCTRICO	DERIVADOS DE PIRIDINA Y PIRIMIDINAS, ALQUILPROPIONITRILLO, AMINOCETONITRILLO, N-METILAMINOCETONITRILLO.
SCHWARTZ Y CHITTENDEN	1977	ALANINA, UREA, MINERALES ARCILLOSOS (MONTMORILLONITA) + ACETATO	U.V	URACILO, TIMINA

CONTINUA TABLA I

A U T O R	AÑO	MEZCLA DE REACCION	FUENTE DE ENERGIA	PRODUCTOS DE LA REACCION
<b>CARBOHIDRATOS</b>				
ORD	1961	$\text{HCN}, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$ ,	CALOR	
ORD et al	1962	FORMALDEHIDO, ACETALDEHIDO GLICERALDEHIDO	CALOR	
STEINMAN et al	1964	GLUCOSA, AC. FOSFORICO, DICIANDIAMIDA	U.V. o EXPONTA- NEO	SE OBTUVIERON CASI TODOS LOS AZUCARES DE INTERES BIOLÓGICO.
PONNAMPERUMA GABEL Y	1966 1967	FORMALDEHIDO o $\text{HCN}, \text{H}_2\text{O}$ FORMOL, ALUMINA	U.V., V., $\phi$ .	SI LA MEZCLA CONTIENE FOSFATOS LOS AZU- CARES SE OBTIENEN EN LA FORMA ACTIVADA.
PONNAMPERUMA		ALUMINO-SILICATOS	ESPONTANEA	
<b>HIDROCARBUROS</b>				
ORD et al	1966	$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$ A TRAVES DE BEL DE SILICIO	CALOR	
PONNAMPERUMA	1966	$\text{CH}_4$ .	DESCARGA LUMINOSA	SE OBTUVIERON HIDROCARBUROS SATURADOS E INSATURADOS, ALIFATICOS Y AROMATICOS, TIPOLES
TOUPANCHE et al	1971	$\text{CH}_4$ , SOLAMENTE o $\text{CH}_4, \text{NH}_3,$ $\text{N}_2$ , o $\text{CH}_4, \text{H}_2\text{O}$ , o $\text{CH}_4, \text{H}_2\text{S}$ $\text{CS}_2$ .	EFLUVIO	
TOUPANCHE et al	1977	$\text{CH}_4$ , SOLAMENTE o $\text{CH}_4, \text{NH}_3$ .	U.V.	
<b>ACIDOS GRASOS</b>				
MILLER	1953	$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$ .	DESCARGA DE CHISPAS	
ORD et al	1959	$\text{CH}_2, \text{NH}_2\text{OH}, \text{H}_2\text{O}$	CALOR	SE OBTUVIERON TODOS LOS ACIDOS MONOCAR- BOXILICOS Y DICARBOXILICOS DE INTERES
FOX et al	1961	$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$ .	CALOR	BIOLÓGICO. CUANDO LA MEZCLA CONTIENE COM- PUESTOS CON NITROGENO SE OBTIENEN DERI- VADOS NITROGENADOS.
ALLEN et. al.	1966	$\text{CH}_4, \text{H}_2\text{O}$ .	DESCARGA LUMINOSA	
ZEITMAN et al	1974	$\text{CH}_4, \text{N}_2, \text{NH}_4\text{Cl}$	Y	
NEGRON. M Y PONNAMPERUMA	1976	ACIDO ACETICO		
<b>PORFIRINAS</b>				
HODGSON Y PONNAMPERUMA	1968	$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$ .	U.V. + DESCARGA ELECTRICA	PORFIRINAS DE INTERES BIOLÓGICO
<b>LIPIDOS</b>				
ORD et al	1978	PALMITATO DE ANHWIO, GLI- CEROL, CIANAMIDA, GLICERO- FOSFATO.	CALOR	LIPIDOS Y FOSFOLIPIDOS DEPENDIENDO DE LA ADICION O NO DE GLICEROFOSFATO

4

Como se puede apreciar, se han logrado sintetizar los monómeros básicos de la vida tales como aminoácidos, bases púricas (adenina y guanina) y pirimídicas (timina, citocina y uracilo), lípidos, azúcares de la clase oxi y desoxirribosa, así como gran número de agentes condensantes o activantes del grupo de las cianamidas o del propio ATP, moléculas que gracias a su naturaleza química actúan como agentes que facilitan la polimerización entre monómeros.

Uno de los factores esenciales que hace factible la producción de dichas moléculas (aminoácidos, carbohidratos, lípidos, hidrocarburos, ácidos grasos, porfirinas, etc.) es el de suponer en tales experimentos la existencia de una atmósfera de tipo reductor, sugerencia que para algunos autores [6,7] está en contradicción con las evidencias geológicas. Este es un aspecto crucial para dilucidarse.

En cuanto a los compuestos obtenidos utilizando un medio oxidante, podemos decir que los resultados han sido poco satisfactorios, ya que su producción y complejidad es de orden inferior a los sintetizados en condiciones reductoras [8,9,10].

Es así como el éxito obtenido con los trabajos de síntesis abiótica ha ido desarrollándose gradualmente y de manera paralela a los avances conseguidos en el campo de la biología molecular. Estos avances, han permitido que el área del origen de la vida diversifique sus fronteras de investigación y las encamine hacia nuevas perspectivas de estudio, tales como las

del origen del código genético, que es un problema tan importante como la misma química prebiótica.

Una de las interrogantes fundamentales que debe encontrar respuesta para poder dilucidar el problema del origen de la vida es, sin duda, el origen del código genético; esencial y fundamental para el mantenimiento de la vida misma.

En los organismos contemporáneos, la manifestación del código genético se realiza por medio de la transcripción y traducción, mecanismos en los que se involucran moléculas y estructuras tales como los tRNA, mRNAs y ribosomas así como enzimas específicas, entre las que sobresalen las aminoacil-tRNA sintetasas.

La importancia de estas últimas enzimas radica en su capacidad para activar no sólo los aminoácidos, haciendo así posible termodinámicamente la formación de enlaces peptídicos, sino que, además unen el aminoácido seleccionado al tRNA correspondiente; Mecanismo que de no existir implicaría la pérdida total del manejo de la información genética.

Así, resulta interesante estudiar más de cerca a las aminoacil-tRNA sintetasas (enzimas ordenadoras en el proceso de traducción) con lo cual se logrará una mayor comprensión de su grado de complejidad, lo que a su vez puede ayudar a formular tanto una posible hipótesis sobre su origen como de algún probable mecanismo primigenio capaz de cumplir de manera

semejante con la misma tarea.



## CAPITULO I

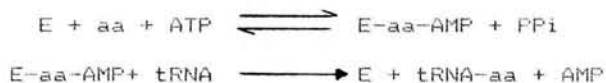
En las últimas décadas, la biología molecular ha podido demostrar que la información hereditaria que especifica la disposición de los aminoácidos en las proteínas de los organismos vivos se encuentra contenida en las moléculas de DNA y en el caso de algunos virus de RNA. Sin embargo, el mecanismo para llevar a cabo el flujo de información de un tipo de lenguaje constituido de cuatro bases a uno de veinte aminoácidos requiere de tres procesos fundamentales. Por medio de la replicación se produce la formación de moléculas idénticas a partir de una molécula original de DNA. Después, el mensaje genético del DNA es transcrito en forma de RNA mensajero, mediante el proceso conocido como transcripción. Finalmente, se da el mecanismo de traducción o síntesis ribosomal de proteínas, el cual está caracterizado por la intervención de moléculas complejas de la clase del tRNA, RNAm, ribosomas factores de iniciación y elongación así como de complejos enzimáticos cuya función conjunta es la de llevar a cabo en los ribosomas la traducción del mensaje genético en secuencias específicas de aminoácidos durante la biosíntesis de las proteínas.

A fin de esquematizar este complejo mecanismo y para su mayor comprensión vamos a dividirlo en varias etapas:

### 1.- Activación

- 2.- Iniciación
- 3.- Elongación ( Transpeptidación y Traslocación )
- 4.- Terminación ( Separación del último tRNA y N-deformilación )

La activación (aspecto fundamental al que se hará especial referencia en el presente trabajo) como su nombre lo indica, consiste en la activación del grupo carboxilo del aminoácido por medio del ATP. En seguida, en el curso de una segunda reacción dicho aminoácido se enlaza covalentemente a su respectivo tRNA. Tanto la activación del aminoácido, como la aminoacilación con su tRNA correspondiente, se realiza por medio de enzimas específicas denominadas aminoacil-tRNA sintetetas (que denominaremos por su naturaleza codificadora y por razones de brevedad, codasas [11]) y su interacción con los respectivos sustratos queda expresada de la siguiente forma:



E = Codasa  
aa = aminoácido

Como se puede observar, la función de dicha enzima es esencial, ya que no podría existir ninguna asignación específica entre aminoácidos y anticodones si no fuera por su capacidades únicas de reconocimiento. Es razonable pensar que la transmisión de la información desde los albores de la vida ha sido posible

gracias a esta familia de enzimas.

#### CODASAS

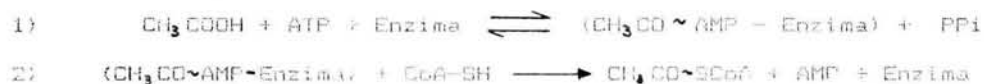
El descubrimiento original de las codasas es el resultado de una progresión lógica de investigaciones dispuestas a resolver el problema energético de la biosíntesis de las proteínas.

Hacia 1941 Fritz Lipmann publicó un artículo referente al problema de la utilización de la energía para los procesos biosintéticos, en donde, aportaba una visión global de los conocimientos acumulados sobre la síntesis proteica que por aquel entonces se estaban esbozando [12].

En los años posteriores y una vez terminada la segunda guerra mundial, surgieron nuevas técnicas de laboratorio y métodos de estudio tales como el uso de marcadores radiactivos [13], inhibidores de la síntesis proteica [14], así como la aplicación de sofisticados procedimientos cromatográficos [15] que dieron lugar a que tanto el mismo Lipmann, entonces profesor de la Universidad de Harvard, como Fyodor Lynen, en Munich, Alemania, esclarecieran de manera independiente un mecanismo de activación del grupo carboxilo del acetato [16,17].

Este mecanismo (muy similar al realizado por las codasas), es catalizado por las enzimas llamadas acetil-coenzima A sintetetasas, y se utiliza en un amplio espectro de reacciones jugando un papel central en numerosas vías metabólicas. La

reacción se lleva a cabo en dos etapas:



Con base en ello, uno de sus colaboradores, Mahlon Hoagland, preocupado por el problema energético de la síntesis proteica, decidió buscar un método de activación de los aminoácidos análogo al encontrado para el acetato en el laboratorio vecino.

Fue así como en 1953 Hoagland y Zamecnik trabajando con extractos de hígado de rata encontraron ciertos factores que requerían la presencia de aminoácidos para llevar a cabo el intercambio isotópico del P entre el pirofosfato y el ATP. Posteriormente en otros laboratorios se descubrió que en dicha reacción el aminoácido interaccionaba con la molécula de ATP para formar aminoacil-adenilato el cual permanecía fuertemente ligado a la enzima.

La importancia de estos hallazgos reside en que en los extractos de hígado de rata se presentaba una enzima diferente para cada uno de los veinte aminoácidos naturales. Este hecho causó escepticismo por parte de algunos bioquímicos quienes argumentaban que termodinámicamente el hecho de sintetizar veinte enzimas distintas con la misma funcionalidad resultaba para la célula energéticamente incoesteable. Sin embargo, más adelante veremos que dicho gasto se justifica plenamente [10].

El estudio de la estructura de las codasas mostró que se pueden encontrar en cinco diferentes tipos de subunidad [19,20]:

$$\alpha_1, \alpha_2, \alpha\gamma, \alpha\beta, \alpha_2\beta_2.$$

La  $\alpha_1$  está definida como una sola subunidad;  $\alpha_2$  respresenta un dímero constituido de subunidades idénticas (y diferente de  $\alpha_1$ );  $\alpha\gamma$  es un tetramero de subunidades idénticas (y diferentes de  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) mientras que  $\alpha\beta$  es un dímero de subunidades diferentes (y diferentes de  $\alpha_1, \alpha_2$  y  $\alpha\gamma$ ) y  $\alpha_2\beta_2$  es un tetrámero formado por 2 subunidades  $\alpha$  iguales unidas a otras dos subunidades  $\beta$  iguales entre ellas pero diferentes de  $\alpha_1$  (ambas subunidades diferentes de  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha\gamma$  y  $\alpha\beta$ ).

(Algunas características de las subunidades para cada codasa purificada se muestran en la tabla 2).

Esta clasificación es por supuesto tentativa, ya que todas las determinaciones se han hecho siempre in vitro y no se tiene una visión muy clara de lo que sucede in vivo.

Es pues un caso aparente el que las variaciones estructurales en las subunidades esté determinada in vitro, ya que como sabemos una proteólisis ocurrida durante la purificación de esta enzima puede producir una asignación incorrecta al valor del peso molecular, y en consecuencia de la estructura cuaternaria. En sf, es el mismo problema presentado por los complejos enzimáticos (la asociación de diversas codasas) a los que más adelante se hará referencia.

## PURIFICACION

La purificación de las codasas se ha llevado a cabo mediante el empleo de un conjunto de técnicas bioquímicas que se describirán más adelante. El número de codasas descubiertas a la fecha asciende a 150, incluyendo las obtenidas de organismos procariontes y los complejos multienzimáticos encontrados en eucariontes superiores (anfibios, reptiles, aves y mamíferos) (Tabla 2).

Tabla 2  
Pesos moleculares y subunidades de algunas codasas purificadas [21]

codasa	organismo	Mr (X 10 <sup>-3</sup> )	subunidad estructural (Mr X 10 <sup>-3</sup> )	codasa	organismo	Mr (X 10 <sup>-3</sup> )	subunidad estructural (Mr X 10 <sup>-3</sup> )
Alanina	Escherichia coli	160	$\alpha_2$ ( $\alpha=80$ )	Histidina	B. stearothermophilus	120	$\alpha_2$ ( $\alpha=60$ )
	E.coli	380	$\alpha_4$ ( $\alpha=95$ )		embrion de pollo Staphylococcus aureus		
	Bacillus stearothermophilus	173	-		E.coli	85	$\alpha_2$ ( $\alpha=42.5$ )
Arginina	Saccharoayces cerviseae	130	$\alpha_1$	B.stearothermophilus	102	-	
	higado de rata			Salmonella typhimurium	80	$\alpha_2$	
	E.coli	72	$\alpha_1$	S.cerevisiae levadura			
	E.coli K-12	63	$\alpha_1$	hoja de tabaco			
	E.coli	74	$\alpha_1$	reticulocitos de conejo	122	$\alpha_2$ ( $\alpha=64$ )	
	B.stearothermophilus	78	$\alpha_1$	higado de rata			
	Neurospora crassa	85	$\alpha_1$	E.coli B	112	$\alpha_1$	
	levadura de pan			E.coli MRE 600	102	$\alpha_1$	
	S.cerevisiae germ. de trigo	73	$\alpha_1$	B.Stearothermophilus	110	$\alpha_1$	
	Lupinus luteus	140	$\alpha_2$ ( $\alpha=70$ )	S.cerevisiae levadura de Pan	115	-	
Ac.aspartico	higado de rata	89	-	hoja de tabaco	125	$\alpha_1$	
	higado de rata neoplasica			higado de rata			
	Holobacterium cutirubrum			H.cutirubrum			
	E.coli	119	$\alpha_2$ ( $\alpha=61$ )	E.coli	104	$\alpha_1$	
	B.stearothermophilus	129	-	E.coli MRE 600	94	-	
	N.crassa			B.stearothermophilus	110	$\alpha_1$	
	mitocondria de N.crassa			S.cerevisiae	120	$\alpha_2$ ( $\alpha=60$ )	
	N.crassa			Candida utilis	128	-	
	S.cerevisiae	120	$\alpha_1$ ( $\alpha=60$ )	Levadura de pan			
	S.cerevisiae	114	$\alpha_1$ ( $\alpha=57$ )	N.crassa	110	$\alpha_1$	
Aspargina	Phaseolus aur.			N.crassa			
	Lactobacillus arabinosa			de mitocondria	90	$\alpha_1$	
	hoja de tabaco			Euglena gracilis	110	$\alpha_1$	
	levadura de pan	113	-	cloroplasto de			
	E.coli	100	-	E.grasilis	105	$\alpha_1$	
B.stearothermophilus	127	$\alpha_2$ ( $\alpha=51$ )	T.pyriformis	120	$\alpha_1$		
L.arabinosa							

CONTINUA TABLA 2

Codasa	Organismo	Mr ( $\times 10^{-3}$ )	Subunidad estructural (Mr $\times 10^{-3}$ )	Codasa	Organismo	Mr ( $\times 10^{-3}$ )	subunidad estructural (Mr $\times 10^{-3}$ )
	<i>N. crassa</i>				mitocondria	100	$\alpha_1$
	linfoma de Gardner				<i>Lupinus luteus</i>		
	<i>P. aureus</i>				semillas	170	-
Cisteina	<i>E. coli</i> K-12	55	-		germ. de trigo	110	$\alpha_2$ ( $\alpha=63$ )
	<i>B. stearothermophilus</i>	61	-		soya		
	levadura de pan	160	-		<i>Aesculus hippocastanum</i>		
	<i>P. aureus</i>				hoja de tabaco		
	<i>Astragalus crotariae</i>				<i>P. aeruginosa</i>		
	<i>A. bisulcatus</i>				higado de rata	108	-
	<i>A. racemosus</i>				<i>Drosophila melanogaster</i>	75	-
	<i>A. lentiginosus</i>				tenebrio molitor	99	$\alpha_1$
	hoja de tabaco		$\alpha_2$		gland. mamaria de vaca	182	$\alpha_2$ ( $\alpha=83$ )
	higado de rata	240					
	placenta hum.						
Ac. glutámico	<i>E. coli</i>	50	-		<i>B. subtilis</i>		
	<i>E. coli</i>	59	$\alpha_1$		<i>H. cutirubrum</i>		
	<i>E. coli</i>	62	$\alpha_1$	Lisina	<i>E. coli</i> MRE 600	104	$\alpha_2$ ( $\alpha=52$ )
	<i>E. coli</i>	56	$\alpha_1$				
	<i>E. coli</i>	102	$\alpha\beta$		<i>B. stearothermophilus</i>	112	$\alpha_2$ ( $\alpha=58$ )
	<i>B. stearothermophilus</i>	42	$\alpha_1$				
	Levadura				<i>B. subtilis</i>	130	-
	hoja de tabaco				<i>S. cerevisiae</i>	138	$\alpha_1$ ( $\alpha=69$ )
	higado de rata	180	-				
	cerebro de res				levadura de pan	150	-
	cerebro de ternero				levadura	113	-
Glutamina	<i>E. coli</i>	69	$\alpha_1$		higado de rata	129	-
	<i>B. stearothermophilus</i>	126			reticulocitos de conejo	112	$\alpha_2$
	<i>N. crassa</i>			Metionina	<i>E. coli</i>	170	$\alpha_2$ ( $\alpha=85$ )
	<i>P. aureus</i>						
	<i>Albizzia julibrissizn</i>				<i>S. faecalis</i>		
	cerebro de res				<i>Mycobacterium smegmatis</i> A	65	$\alpha$
	hig. de puerco				<i>M. smegmatis</i> B	85	$\alpha_2\beta_2$ ( $\alpha=31$ ) ( $\beta=10$ )
	<i>B. subtilis</i>						
Glicina	<i>E. coli</i>	277	$\alpha_2\beta_2$ ( $\alpha=33$ ) ( $\beta=80$ )		<i>B. brevis</i>		
	<i>E. coli</i> CH754 (pLC 1-3)	205	$\alpha\beta_2$ ( $\alpha=204$ ) ( $\beta=65$ )		levadura		
	<i>B. brevis</i>	226	$\alpha_2\beta_2$ ( $\alpha=30\ 000$ ) ( $\beta=81\ 000$ )		mitocondria de levadura	110	$\alpha_2$
	<i>Sarcina lutea</i>				<i>S. cerevisiae</i>		
					<i>B. stearothermophilus</i>	153	$\alpha_2$ ( $\alpha=82$ )
					higado de rata	90	-



CONTINUA TABLA 2							
Codasa	Organismo	Mr ( $\times 10^{-3}$ )	Subunidad estructural (Mr $\times 10^{-3}$ )	Codasa	organismo	Mr ( $\times 10^{-3}$ )	Subunidad estructural (Mr $\times 10^{-3}$ )
	germ. de trigo	163	$\alpha_2$ ( $\alpha=74$ )		higado de gallina	122	$\alpha_2$ ( $\alpha=63$ )
	germ. de trigo A	105	$\alpha_3$	Treonina	E.coli	117	-
	germ. de trigo B	70			E.coli	152	$\alpha_2$ ( $\alpha=76$ )
	sem. de L. luteus	170	$\alpha_3$ ( $\alpha=85$ )		B. stearothermo- philus	120	-
	glandula mam. de cordero	78	$\alpha_1$		S. carlsbergensis	150	$\alpha_2$ ( $\alpha=82$ )
	hig. de cordero	78	$\alpha_1$		levadura de pan	170	$\alpha_2$
	reticulocitos de conejo				A. hippocastanum		
	higado de rata	90	-		higado de rata	170	$\alpha_2$
Fenilalanina	E.coli B	180	$\alpha_2$ ( $\alpha=45$ )	Triptofano	E.coli	74	$\alpha_2$ ( $\alpha=37$ )
	E.coli K-10	270	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=38$ ) ( $\beta=96$ )		B. stearothermo- philus	70	$\alpha_2$ ( $\alpha=35$ )
	B. subtilis				B. subtilis	87	-
	B. stearothermo- philus	221	-		S. cerevisiae	110	$\alpha_2$ ( $\alpha=55$ )
	S. cerevisiae	230	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=56$ ) ( $\beta=63$ )		sem. de L. luteus	200	( $\alpha=37$ )
	S. cerevisiae	270	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=63$ ) ( $\beta=75$ )		P. aureus		
	levadura de pan	180	-		Polygonatum multiflorum		
	levadura de pan	276	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=63$ ) ( $\beta=75$ )		pancreas de res	108	$\alpha_2$ ( $\alpha=54$ )
	mitochondria de Levadura	266	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=57$ ) ( $\beta=72$ )		pancreas de res	120	$\alpha_2$
	cotil. de soya				cerebro de bufalo	150	$\alpha_3$
	sem. de L. luteus	260	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=59$ ) ( $\beta=75$ )	Tirosina	placenta humana	116	$\alpha_2$ ( $\alpha=58$ )
	germ. de trigo	250	$\alpha_2 \beta_2$ ( $\alpha=50$ ) ( $\beta=80$ )		piel humana	116	$\alpha_2$ ( $\alpha=58$ )
		260	$\alpha_2$ ( $\alpha=61$ )		fibrobl. humano		
	Aesculus californica				celulas de hamster		
	A. glabra				E.coli	97	$\alpha_2$
	A. hippocastanum				B. stearothermo- philus	88	$\alpha_2$
	A. parviflora				B. subtilis	88	-
	N. crassa				S. cerevisiae	116	$\alpha_4$
					S. cerevisiae	46.5	$\alpha_1$
					levadura de pan	80	$\alpha_2$ ( $\alpha=40$ )
					Soya	122	$\alpha_2$
					clorop. de soya	86	$\alpha_2$
					P. aeruginosa		
					hig. de ternero	65	-
					higado de rata	150	( $\alpha=68$ ) $\alpha \beta$

CONTINUA TABLA 2							
Codasa	Organismo	Mr (X 10 <sup>-3</sup> )	Subunidad estructural (Mr X 10 <sup>-3</sup> )	Codasa	Organismo	Mr (X 10 <sup>-3</sup> )	Subunidad estructural (Mr X 10 <sup>-3</sup> )
	<i>E. gracilis</i>	65			higado de rata	124	$\alpha\beta$
	<i>D. melanogaster</i>	180	-				( $\alpha=61$ )
	higado de rata	287	$\alpha_2\beta_2$ ( $\alpha=69$ ) ( $\beta=74.5$ )		pancr. de cerdo	118	( $\beta=62$ ) $\alpha_2$ ( $\alpha=58$ )
	higado de rata C			Valina	pancr. de cerdo		
	higado de rata C				<i>E. coli</i> K-12	110	$\alpha_1$
	mitocondria de rata				<i>E. coli</i>	100	-
	placenta humana	130	$\alpha\beta$ ( $\alpha=55$ ) ( $\beta=72$ )		<i>E. coli</i> T4	170	-
	<i>H. cutirubrum</i>			fago modificado	170	-	
Prolina	<i>E. coli</i>	94	$\alpha_2$ ( $\alpha=47$ )	<i>B. stearothermo-</i> <i>philus</i>	110	$\alpha_1$	
	<i>B. stearothermo-</i> <i>philus</i>	125	-	<i>S. cerevisiae</i>	140	$\alpha_1$	
	<i>P. aureus</i>			<i>S. cerevisiae</i>	122	$\alpha_1$	
	<i>Delonix regia</i>			levadura de pan	130	$\alpha_1$	
Serina	higado de rata			<i>M. smegmatis</i>	120	$\alpha\gamma$	
	<i>E. coli</i> B	103	$\alpha_2$ ( $\alpha=53$ )	<i>N. crassa</i>			
	<i>E. coli</i> K-12	95	$\alpha_2$ ( $\alpha=50$ )	cloroplasto de <i>E. gracilis</i>	126	$\alpha_1$	
	<i>B. stearothermo-</i> <i>philus</i>	88	$\alpha_2$ ( $\alpha=49$ )	<i>E. gracilis</i>	125	$\alpha_1$	
	<i>Saccharomyces</i> <i>calbergensis</i>	95	$\alpha_2$ ( $\alpha=47.5$ )	<i>T. pyriformis</i> mitocondria de <i>T. pyriformis</i>			
	<i>S. cerevisiae</i>	120	$\alpha_2$ ( $\alpha=60$ )	hoja de tabaco			
	<i>S. cerevisiae</i> sem. de <i>L. luteus</i>	89	-	<i>A. californica</i>			
		110	$\alpha_2$ ( $\alpha=55$ )	sem. de <i>L. luteus</i>	125	$\alpha_1$	
				<i>S. typhimurium</i>			
				cerebro de embr. de pollo	110	-	
			higado de res				
			higado de rata				

- = No se identificó el tipo de subunidad que constituye a la codasa.

TABLA 2A

Resumen de las codasas purificadas de los diferentes organismos [21].

Fuente	Ala	Arg	Asp	Asn	Cis	Glu	Gln	Gli	His	Ile	Leu	Lis	Met	Fen	Pro	Ser	Thr	Trp	Tir	Val
E.coli	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B.stearoth	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B.subtilis							+				+	+		+				+	+	+
S.cerevisiae	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+			+		+	+
S.carlsberg																	+	+		
N.crassa		+	+				+						+						+	+
N.crassa mit			+									+								
P.aureus			+	+	+		+							+					+	
L.arabinosa			+	+																
G.linfoma				+																
B.brevis								+					+							
A.crotoriae					+															
A.biscalcatus					+															
A.racemosus					+															
A.lentigenos				+																
A.julibrissin							+													
S.faecalis													+							
S.aureus								+												
P.multiflor																		+		
S.typhimurium										+	+	+	+						+	+
M.saegetis													+							+
D.melanogaster											+			+						
C.utilis											+									
S.lutea													+							
P.aeruginosa											+								+	
E.gracilis											+			+						+
E.gracilis. chl.											+									+
T.pyriformis											+									+
T.pyriformis.mit											+									+
T.molitor											+									
A.hypocast.											+			+			+			
A.california														+						+
A.gabra														+						
A.parvifl														+						
D.regia														+						
L.luteus		+									+		+	+		+				+
M.cryophilis						+								+						
H.cutirubrum		+								+	+			+						
Geræen de T.		+									+		+	+						
Soya											+									+
Cl. soya																				+
Hoja de tabaco			+		+	+			+	+	+									+
gInd. de cor.													+							
Higado de Cor.													+							
Hig. de cerdo							+													
Hig. Rata.	+	+			+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mit.Hig.rat.														+						
Hig.res																				+
Cerebra res						+	+													

CONTINUA TABLA 2A

Fuente	Ala	Arg	Asp	Asn	Cis	Glu	Gln	Gli	His	Ile	Leu	Lis	Met	Fen	Pro	Ser	Thr	Trp	Tir	Val
Pancreas res																				+
Cerebro ternero						+														
Híg.res																				+
Retic.conejo									+		+	+								
gln.mam.vaca											+									
Placenta.Hua.					+									+						+
Piel Hum.																				+
Fibrobl.Hua.														+						+
Cerebro Búfalo																				+
Pancreas cerdo																				+
Hígado gallina																+				
Embrión pollo								+												+
Haaster	+	+		+		+			+		+		+							+
Cei.ratón	+																			

No existe un esquema universal de purificación que permita obtener todas las codasas de una preparación, sin embargo, si se dispone de procedimientos específicos que permiten aislar varias de estas enzimas.

Kalousek y Konigsberg [22] proponen un esquema de separación que puede ser usado para purificar cierto grupo de codasas a partir de un sólo extracto. El procedimiento se esquematiza a continuación.

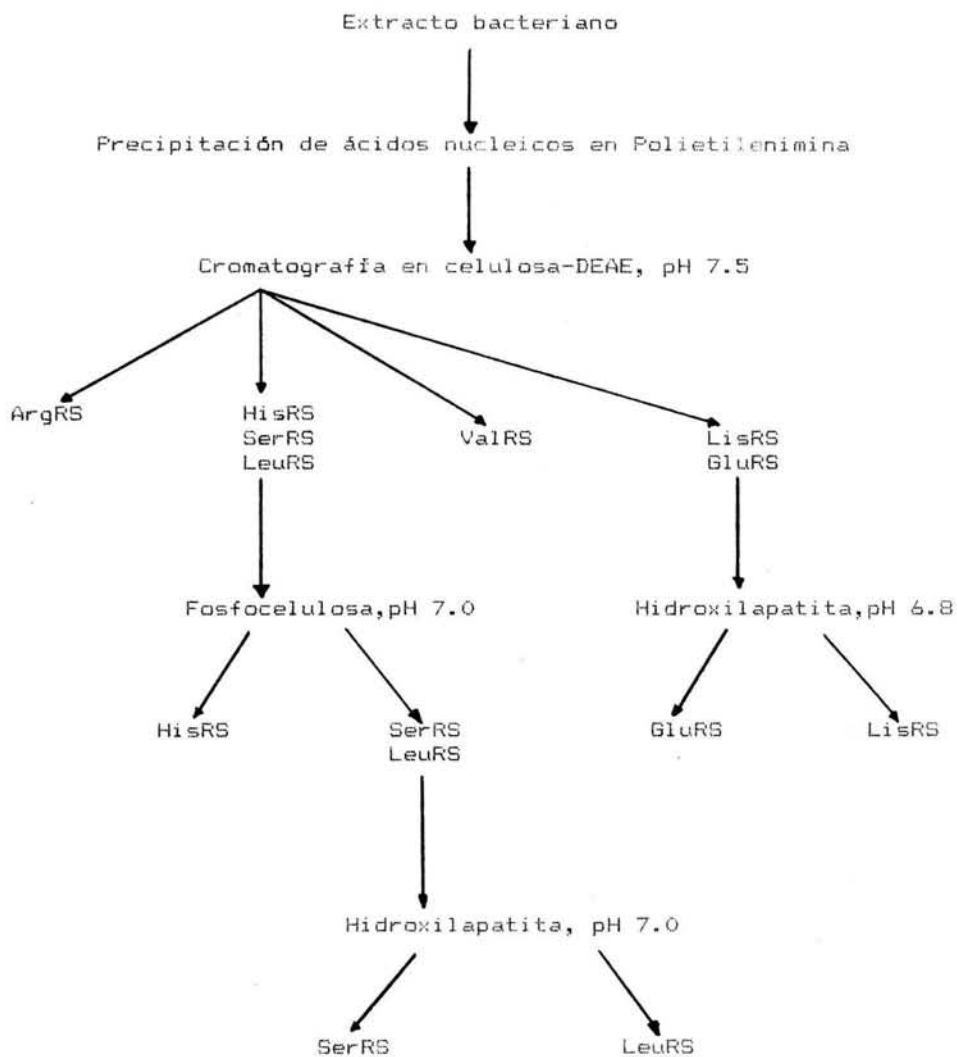


Figura.1. Esquema de purificación de algunas codasas de *E. coli* [221]. (RS=tRNA sintetasa).

Kalousek y Konigsberg encontraron que la adición de polietilenimina al 0.2% es un agente eficaz para remover las membranas celulares, ácidos nucleicos y algunas proteínas citoplásmicas. Luego de la centrifugación se adiciona más polietilenimina al 0.5% para precipitar las proteínas adicionales. Algunas codasas como la fenilalanil-codasa pueden precipitar a esta concentración mientras que otras permanecen solubles. La principal ventaja que ofrece la precipitación del polietilenimina en contraste con otros procedimientos tales como la adición de  $(NH_4)_2SO_4$  ó estreptomycin es el de que la mayoría de las codasas retienen su actividad en presencia de polietilenimina.

Existen otros factores que ayudan a preservar la actividad de las codasas. Estos incluyen la adición de inhibidores proteolíticos como el fenilmetil sulfonil fluoruro (PMFS), la presencia de glicerol ( 20% v/v) y el manejo rápido del material a bajas temperaturas.

Después de la centrifugación el sobrenadante puede tratarse en una columna de Sephadex G-200. Esto es principalmente utilizado para aislar codasas de peso molecular elevado (aproximadamente 100,000 D). Alternativamente el sobrenadante puede pasarse por cromatografía en una columna de dietilaminoetil (DEAE) de celulosa a pH 7.8. El orden de elución para algunas codasas de E. coli es el siguiente; arginina, serina, histidina, leucina, valina, lisina y glutamina. La fracción poseedora de las codasas de interés pueden ser entonces refraccionadas en DEAE de celulosa a pH bajo, o en DEAE Sephadex

A-500 usando gradiente de fuerza iónica. También se ha utilizado fosfocelulosa con mayor ventaja en la purificación de seril-codasa de levadura [23] y de histidil-codasa de S. tiphimurium [24] y E.coli. [25].

Existen numerosos reportes que señalan al ATP y al ion  $Mg^{++}$  como agentes estabilizadores de la enzima durante su purificación.

También, como último paso en la identificación de las codasas se emplean anticuerpos específicos o marcaje radiactivo.

Un procedimiento que ha resultado bastante útil en la identificación de codasas [26] y que permitiría establecer homologías entre las subunidades de las codasas es el empleo de anticuerpos específicos para dichas subunidades.

#### DISTRIBUCION

Los estudios de purificación de codasas han mostrado la presencia de moléculas con un peso molecular menor de 25,000 en organismos procariontes y hasta de 270,000 D para organismos eucariontes. Esta gran disparidad en peso la podemos atribuir a la naturaleza intrínseca de la enzima, ya que en el caso de organismos eucariontes la codasa puede estar constituida hasta de cuatro subunidades, aspecto que no es tan evidente en los organismos procariontes. También se ha reportado la presencia de sólo una codasa para cada uno de los 20 aminoácidos naturales. La excepción a la regla la encontramos en glutaminil codasa de B.megaterium y de Bacillus subtilis donde no se ha hecho



evidente la existencia de Gln-codasa [26].

La ausencia de Gln-codasa nos llevaría inevitablemente a pensar que su aminoácido correspondiente la glutamina no sería activado y en consecuencia no aparecería en la cadena proteica sintetizada. Sin embargo, no sucede así. Al parecer glu-codasa tiene la capacidad de acilar al tRNA<sup>Glu</sup> y al tRNA<sup>Gln</sup>. La Glu-tRNA<sup>Gln</sup> sintetizada es entonces convertida en Gln-tRNA<sup>Gln</sup> mediante una reacción de transaminación llevándose de este modo su activación e incorporación a las proteínas [27].

La facilidad de obtención de codasas libres en células bacterianas contrasta de forma sorprendente con las incertidumbres y confusiones que se presentan en la interpretación de los resultados al obtenerlas a partir de organismos eucariontes.

En organismos eucariontes se ha demostrado que existen codasas para un mismo aminoácido tanto en el núcleo-citoplasma como en las mitocondria y, aparentemente, con afinidades diferentes. Sin embargo, la dificultad estriba en conocer exactamente su procedencia, es decir, saber si la codasa se origina en las mitocondrias o en el núcleo-citoplasma, o si ambas codasas actúan conjuntamente.

En un trabajo reportado por Gross se logró aislar por cromatografía de intercambio isotópico dos especies diferentes de codasas de Neurospora, y aparentemente la enzima núcleo-citoplásmica aminoacila preferencialmente al tRNA<sup>Leu</sup> del citoplasma mientras que la codasa mitocondrial aminoacila al

tRNA<sup>leu</sup> de mitocondria. Aunque los resultados no son del todos concluyentes, el autor infiere que las diferencias, al menos en este caso, son resultado de las modificaciones que se presentan después de la traducción una vez que la enzima ha sido codificada por más de un gen nuclear [28].

Con respecto a las codasas procedentes de cloroplastos se cree que igualan en número al de mitocondrias y a las de núcleo-citoplasma. Sin embargo, se desconocen las afinidades de aminoacilación de cada una de ellas en los diversos vegetales [29].

La tabla 3 muestra el peso molecular de codasas extraídas de citoplasma y mitocondria de hígado de res comparándolos con los valores registrados por otros autores [30].

TABLA 3 [30]

Aminoácido	Localización subcelular en hepatocitos (datos de filtración en gel)	Peso molec. ( $\times 10^3$ )	Número de determinaciones	Otros organisa.	Dato Copilado <sup>a</sup> Peso molec. ( $\times 10^3$ )	Subunidad	Número de determinaciones
His	Mito	154	(1)	no-mamífero	80-120	$\alpha_2$	(3)
	Cito	$153 \pm 1\%$	(3)				
		170 <sup>b</sup> 1124	(1)	mamífero	122	$\alpha_2$	(1)
		múltiples de 45 <sup>c</sup>					
Thr	Mito	206	(1)	no-mamífero	117-170	$\alpha_2$	(6)
	Cito	$195 \pm 10\%$ 166 <sup>b</sup>		mamífero	170	$\alpha_2$	(1)
Ser	Mito	150 1162	(1)	no-mamífero	88-120	$\alpha_2$	(7)
	Cito	$166 \pm 8\%$ 102 <sup>c</sup>	(3) (1)	mamífero	90-122	$\alpha_2$	(2)
Asn	Mito	189	(1)	no-mamífero	100-127		(2)
	Cito	$175 \pm 7\%$	(4)				
Trp	Mito	91	(1)	no-mamífero	170-110 200	$\alpha_2$	(4) (1)
	Cito	91 1170 <sup>b</sup>	(1) (1)	mamífero	108-150	$\alpha_2$	(5)
Ala	Mito	162	(1)	no-mamífero	1130-173 580	$\alpha_2$ $\alpha_1$	(3)
	Cito	$141 \pm 9\%$	(3)	no-mamífero	120	$\alpha_2$	(1)
Gli	Mito	189	(1)	no-mamífero	205-227	$\alpha_2\beta_2$	(3)
	Cito	$202 \pm 11\%$ 170	(3) (1)				
		88	(1)	no-mamífero	147 86-122	$\alpha_2$	(1) (6)
Tir	Mit	88	(1)	no-mamífero	147 86-122		(1) (6)
	Cito	$93 \pm 10\%$	(3)	mamífero	165 118-150		(1) (3)
		82	(1)	no-mamífero	161 160		(1) (1)
Cis	Mito	82	(1)	no-mamífero	161 160		(1) (1)
	Cito	262	(1)	mamífero	240	$\alpha_2$	(1)
Pro	Mito	162	(1)	no-mamífero	94-125	$\alpha_2$	(2)
	Cito	$155 \pm 14\%$ 110 <sup>c</sup> $\pm$ 2%	(4) (3)				
		agregados 117 $\pm$ 4% 57	(3)	no-mamífero	113-129	$\alpha_2$	(5)

CONTINUA TABLA 3

Aminoácido	Localización Subcelular en hepatocitos (datos de filtración en gel)	Peso molec. ( $\times 10^{-3}$ )	Número de determinaciones	Otros organisa.	Dato Copilado <sup>a</sup> Peso molec. ( $\times 10^{-3}$ )	Subunidad	Número de determinaciones
Fen	Mito		(1)	no-mamífero	65		(1)
	Cito	60 $\pm$ 18%	(3)	mamífero	180-276 130	$\alpha_2\beta_2$ $\alpha_1\beta$ $\alpha_2\beta_2$ $\alpha_1$	(11) (1) (1) (11)
Val	Mito	162	(1)	no-mamífero	100-170		(1)
	Cito	361 $\pm$ 14%	(3)	mamífero	110		(1)
Gln	Mito	138	(1)	no-mamífero	69 126	$\alpha_1$	(1) (1)
	Cito	162 $\pm$ 2%	(2)	no-mamífero	100-125	$\alpha_1$	(5)
Glu				no-mamífero	42-62	$\alpha_1$	(5)
	Cito	111	(1)	mamífero	102 180	$\alpha_2\beta$	(1) (1)
Lis	Mito	162	(1)	no-mamífero	104-150	$\alpha_2$	(6)
	Cito	180	(1)	no-mamífero	122-129	$\alpha_2$	(2)
Leu				no-mamífero	90-128	$\alpha_1$	(15)
	Cito	165	(1)	mamífero	108 182	$\alpha_2$	(1) (1)
Met	Mito	79	(1)	no-mamífero	65-110 153-170	$\alpha_1$ $\alpha_2$	(5) (4)
	Cito	82	(1)	mamífero	78-90	$\alpha_1$	(3)
Arg	Mito	100	(1)	no-mamífero	63-85 140	$\alpha_1$ $\alpha_2$	(7) (1)
	Cito	95	(1)	mamíferos	89		(2)

Pesos moleculares de aminoacil-tRNA sintetetas (codasas) libres obtenidas de citoplasma y mitocondria de hígado de res, los valores se comparan con los reportados en la literatura.

<sup>a</sup> Joachimiak y Barciszewski [1980].

<sup>b</sup> Los valores anormales de bajo peso molecular se determinaron en presencia de PMFS.

<sup>c</sup> Los valores anormales de bajo peso molecular se determinaron en ausencia de PMFS.

Los datos de filtración en gel en paréntesis se observaron en una elusión vertical [30].

Estos resultados reafirman de alguna forma la discrepancia presentada entre codasas citoplásmicas y de organelos, hecho que no sólo es aparente por su peso molecular, sino también por su comportamiento cromatográfico, reactividad inmunológica y especificidad con respecto a diferentes tRNAs, junto con otros parámetros reportados por diversos autores [31].

Es además una incógnita el grado de similitud entre codasas de organelos y las de organismos procariontes. Argumento que para algunos investigadores es aparente ya que sus características son semejantes más no idénticas [32], lo cual resulta interesante desde el punto de vista de las teorías del origen de la célula eucariontica. Estas similitudes son presentadas en la Tabla 4.

Del estudio de las codasas en organismos evolutivamente más antiguos, como las Archaeobacterias esperamos establecer, de acuerdo con la teoría de endosimbiosis [171] similitudes con las codasas de núcleo-citoplasma de organismos eucariontes.

TABLA 4

codasa	Mitochondria de mamífero		<u>B. Stearo-</u> <u>termophilus</u>		<u>E.coli</u>	
	Mr ( $10^3$ )	S.E.	Mr ( $10^3$ )	S.E.	Mr ( $10^3$ )	S.E.
Histidina	80-120	$\alpha_2$	102		85	$\alpha_2$
Threonina	117	$\alpha_2$	120	$\alpha_2$	117	$\alpha_2$
Serina	80-122	$\alpha_2$	89	$\alpha_2$	95	$\alpha_2$
Aspargina	127	$\alpha_2$	127	$\alpha_2$	100	
Triptofano	70-110	$\alpha_2$	70	$\alpha_2$	74	$\alpha_2$
Alanina	130-170	$\alpha_2$	173	$\alpha_2$	160	$\alpha_2$
Glicina	120	$\alpha_2$	-	-	227	$\alpha_2 \beta_2$
Tirosina	86-122	$\alpha_2$	88	$\alpha_2$	97	$\alpha_2$
Cisteina	61	-	61	-	55	-
Prolina	94-125	$\alpha_2$	125	-	94	$\alpha_2$
Ac. Aspartico	-	$\alpha_2$	129	-	119	$\alpha_2$
Fenilalanina	180-276	$\alpha_2 \beta_2$	221	-	180	$\alpha_4$
Valina	100-170	$\alpha_1$	110	$\alpha_1$	100	$\alpha_1$
Glutamina	69-126	$\alpha_1$	126	$\alpha_1$	69	$\alpha_1$
Lisina	-	-	110	$\alpha_1$	112	$\alpha_1$
Ac. glutámico	-	-	42	$\alpha_1$	50-59	$\alpha_1$
Isoleucina	104-150	$\alpha_2$	112	$\alpha_2$	104	$\alpha_2$
Leucina	-	-	110	$\alpha_1$	104	$\alpha_1$
Metionina	65-110	$\alpha_1$	153	$\alpha_2$	170	$\alpha_2$
Arginina	63-85	$\alpha_1$	78	$\alpha_1$	74	$\alpha_1$

Pesos moleculares de codasas obtenidas de mitocondria de vários mamíferos [20]. los valores se comparan con los reportados para E.coli y B. stearothermophilus.  
S.E.= Subunidad Estructural.

La complejidad exhibida por las codasas en organismos procariontes estimuló a los científicos a fijar su atención hacia el estudio de ellas en anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Sin embargo, las incógnitas se multiplicaron.

Desde 1970 con los primeros trabajos en eucariontes superiores, especialmente mamíferos, las codasas mostraron la característica de presentarse en complejos moléculares constituidos de tRNAs, factores de elongación, lípidos, proteínas etc. que en conjunto conforman una estructura molecular de aproximadamente  $10^6$  D [19,26,33,34,35]. A partir de entonces los reportes haciendo alusión a tales complejos se han descrito en hígado de rata, embrión e hígado de ratón, glándulas mamarias de rata, reticulocito de ratón, glándula tiroidea de bovino, músculo esquelético de rata, hígado y glándulas mamarias de oveja, cerebro de bovino, placenta humana, células de ovario de hamster, células HeLa, células leucémicas, oocitos de Xenopus leavis, Drosophila, células de planta (Phaseolus aureus, Polygonatum multiflorum), levadura, reticulocitos de conejo etc. [36,37,38].

La composición del complejo dilucidada a través de la actividad de cada uno de los componentes que se escinden durante su aislamiento hizo sugerir a los investigadores que la estructura del complejo esta constituida de tres regiones denominadas arbitrariamente como complejo nuclear, región intermedia y región externa [30]. Mirande [39] considera que no son tres las regiones sino dos, el complejo nuclear y la región

externa.

De una u otra forma existen evidencias de que el complejo macromolecular es demasiado frágil, de tal suerte que durante estados bien definidos de homogenización se fragmenta en pequeños segmentos del que sobresale un complejo nuclear muy estable constituido de 7 a 9 codasas.

A pesar de que la estructura de este complejo nuclear es muy similar en todos los resultados reportados por los diversos laboratorios persiste la duda de si su conformación es homotípica, es decir, conformada de un sólo tipo de codasas ó de naturaleza heterotípica, o sea, configurado de diferentes tipos de codasas.

Aunque las evidencias encontradas no favorecen la primera suposición autores como Dickman y Roll [40] argumentan que los métodos de purificación son lo suficientemente eficaces como para disgregar el homocomplejo que según ellos existe y estudiarlo en detalle. En favor a este punto [32,33,34] han acumulado evidencia de la existencia de sitios inseparables de los homocomplejos con propiedades similares a las vistas en los heterocomplejos [41,42,43]. Sin embargo, dichas estructuras estudiadas con las técnicas de gradiente de densidad en sacarosa, los homocomplejos resultan ser estructuras mucho más pequeñas que los heterocomplejos.

Las pruebas hasta ahora acumuladas hablan en su mayoría en favor del complejo heterotípico o heterocomplejo de estructura y



composición definida [30]. Este argumento tiene su fundamento en la veracidad de ciertas técnicas de purificación que han permitido descubrir el tamaño y características de cada uno de los componentes constituyentes del complejo [19,39,44].

La Tabla 5 muestra las codasas presentes en el complejo macromolecular aislado de organismos eucariontes [36].

TABLA 5 [36]

Procedencia	Ala	Arg	Asp	Asn	Cis	Gln	Glu	Gli	His	Ile	Leu	Lis	Met	Fen	Pro	Ser	Thr	Trp	Tir	Val
hig.raton	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
hig.raton		+	+			+	+				+	+	+	+	+					+
eabr.raton		+	+			+	+				+	+	+	+	+					+
hig.rata	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hig.rata		+	+		+		+				+	+	+	+	+		+	+		+
hig.rata		+				+	+				+	+	+	+	+					+
hig.rata		+				+	+				+	+	+	+	+					+
hig.rata		+				+	+				+	+	+	+	+					+
hig.rata		+				+	+				+	+	+	+	+					+
hig.rata		+				+	+				+	+	+	+	+					+
gnd.mam. de rata		+			+	+				+	+	+	+							+
musc.esq. de raton		+				+	+			+	+	+	+		+					+
retic. de conejo		+								+	+	+	+							+
gnd.tir. de porcino		+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
hig.cor. cerebro de bovino		+				+	+			+	+	+	+							+
cerebro de vaca		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
plac.hum. embr.pollo		+				+	+			+	+	+	+							+
cél.leuc. cél.ovario de hamster		+	+			+	+			+	+	+	+		+					+
cél.ascitis de Ehrlich drosophila										+	+	+	+	+						+
germ.trigo levadura		+								+			+	+						+

La actividad se examinó a sólo unas pocas codasas.

La discusión de la naturaleza del complejo no se detiene aquí, sino que, se enfrenta a otro problema que quizá sea el más grave.

Todo lo que se conoce hasta la fecha de las codasas ha sido logrado mediante trabajos realizados in vitro, aspecto que no ha resultado satisfactorio dada la diversidad de variaciones en tamaño y contenido de codasas reportadas en ocasiones hasta para el mismo complejo molecular. Ello ha motivado dudas y algunos ven con escepticismo la existencia in vivo de los complejos enzimáticos, opinión que si bien no ha dado frutos, no ha podido refutar la existencia de tales complejos.

Como consecuencia de la discordancia de datos aportados de los complejos multienzimáticos durante su aislamiento en diferentes laboratorios, Dang [44] propone 6 causas principales:

- a) empleo de diferentes tejidos
- b) diferencias en las técnicas de purificación
- c) inactivación de la actividad sintetasa
- d) formación del complejo tRNA sintetasa
- e) imprecisión en la determinación del Mr (movilidad relativa en electroforesis) y S<sub>w</sub>. (unidades de sedimentación en ultracentrifuga).

Por otra parte, las investigaciones aplicando el mismo procedimiento de purificación de forma continua a un grupo de organismos, han revelado que complejos aislados de diferentes tejidos de una misma especie presenta el mismo patrón en gel, mientras que los complejos aislados de un mismo tipo celular de

distintas especies ostentan diferencias en el Mr del número de los polipéptidos que constituyen a las codasas.

Estas variaciones observacionales muestran a la composición polipeptídica como específica para cada especie.

Todo ello constituye, para algunos, una prueba irrefutable de que el complejo enzimático no surge como un artefacto de preparación y es tan sólo una expresión real de la organización estructural que hay en la célula [45].

Una característica común, antes mencionada, de todos los complejos codasas purificados es su composición nuclear, en donde invariablemente se presentan de 7 a 9 codasas. A excepción de los homocomplejos reportados por [41,42,43] los demás han resultado ser heterocomplejos conformados por metionil-, lisil-, leucil-, e isoleucil-codasas seguidos en frecuencia por arginil-, glutamil-, glutaminil-, y prolil-codasas. Estos resultados documentando dicha información se representan en la Figura 2 en forma de histograma, en donde se tabula la frecuencia de informes en donde se ha reportado actividad particular de cada una de las codasas dentro del complejo, de donde se ha podido inferir a las cinco codasas nucleares y periféricas [46] (no representadas en la figura 3).

La Figura 3 esquematiza la estructura y desensamblaje por proteólisis endógena del complejo nuclear [44].

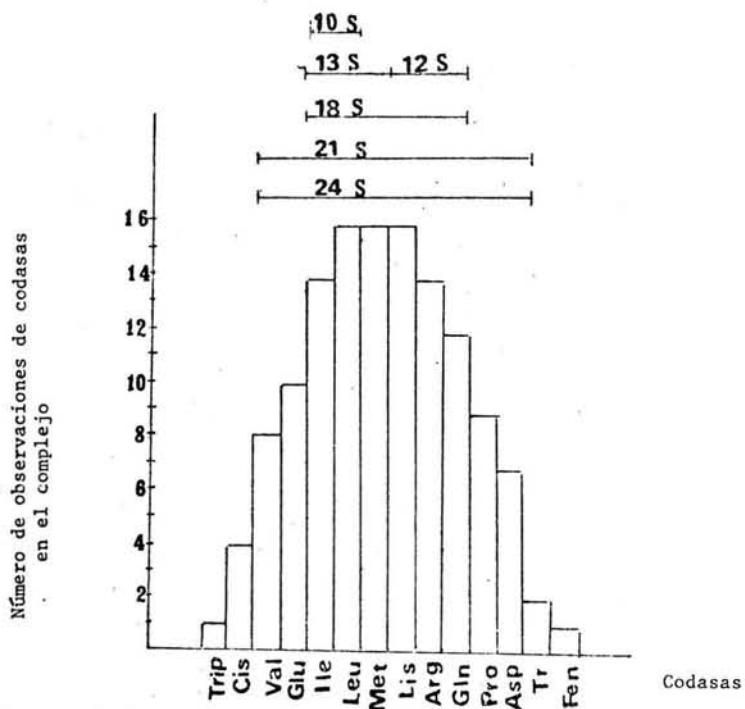


Fig. 2. Histograma de frecuencias de codasas de eucariotes en forma de complejo (46). La frecuencia en el complejo molecular (>12 S) de las codasas específicas para cada aminoácido, fue recopilada de 10 estudios.

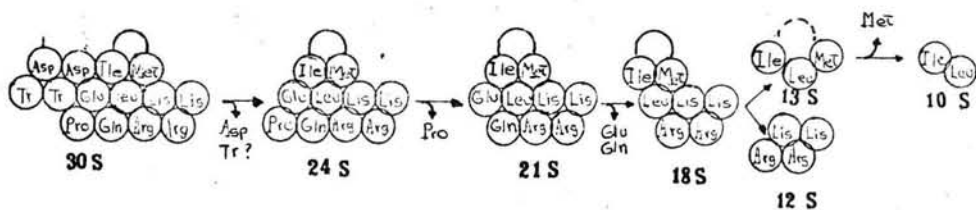


Fig. 3. Esquema de la organización estructural de las codasas encontradas en los complejos de alto peso molecular en mariferos (44). El tamaño del complejo se representa en unidades de sedimentación. Los círculos vacíos representan compuestos no identificados del complejo.

La existencia de una organización estructural en forma de complejos junto con el significado fisiológico que cumple, son aún desconocidos.

Explorando las propiedades funcionales por medio de análisis cinéticos, Mirande et al. [47] encontraron que las 7 codasas constituyentes del complejo enzimático en hígado de cordero carecen de interdependencia funcional. Por otro lado, la función catalítica de una de ellas, no interfiere con la funcionalidad enzimática de cualquiera de los otros componentes del complejo.

El hecho de que únicamente se reporten ciertas codasas como componentes del complejo no implica que las restantes no se presenten o queden excluidas de toda actividad celular. Las codasas no mencionadas como parte del complejo nuclear se han localizado como unidades libres e independientes, lo que puede ser producto del aislamiento del complejo supermolecular poseedor de las 20 codasas in vivo.

Se piensa que la existencia in vivo de los complejos contribuye a la eficiencia en la síntesis de protefnas. Sin embargo, es de esperarse que de encontrar tales complejos de codasas in vivo se podrán confirmar todas las especulaciones fascinantes hechas acerca de su mecanismo de acción.

#### ELUCIDACION ESTRUCTURAL

Un primer paso en el entendimiento del mecanismo y función de cualquier enzima es el de definir su estructura primaria en

términos de su secuencias de aminoácidos. En el caso de las codasas es de gran interés ya que cabría esperar que enzimas con tan marcada similitud funcional presentaran estructuras semejantes. A partir de esa información uno podría imaginar la evolución de las codasas como surgidas de una especie común que sufrió una serie de arreglos graduales en su secuencia para interaccionar con diferentes aminoácidos y tRNAs.

Puesto que su peso molecular no da evidencia de ello, las subunidades estructurales que lo conforman podrían aportar una homología de los sitios específicos de unión para el ATP, tRNA y el aminoácido. Todas estas interrogantes podrían ser analizadas mediante la determinación de secuencias de aminoácidos. Lamentablemente sólo 3 codasas se han secuenciado y todo indica que no existe una aparente similitud entre ellas, dificultad que complica más el conocimiento sobre su origen [19].

A falta de una correlación entre la diversidad de estructuras cuaternarias de las codasas con los eslabones evolutivos propuestos para el código genético, su estudio se ha encaminado hacia la posible relación con sus funciones regulatorias más que con su función básica que es la de aminoacilación específica de los tRNAs [48].

La composición aminoacídica de 12 codasas para E. coli e enlistan en la Tabla 6.

TABLA 6

Aminoacil-tRNA sintetasa†  
(codasa)

Amino ac.	Gln	Glu	His	Ile	Leu	Lis	Met	Fen	Ser	Tr	Tir	Val
Lis	30.7	78	35.5	65.3	56	53.8	44.3	67.8	43.8	58	62	47
His	14.7	42	36.6	24.8	17	22.3	19.0	42.0	20.5	18	13	5
Arg	34.4	54	15.7	48.7	42	59.9	42.6	118.4	61.4	30	45	37
Asp	59.4	100	63.3	99.0	93	107.9	91.7	166.2	96.4	78	90	140
Tr	25.4	46	34.6	48.2	54	51.5	43.8	87.0	46.6	28	40	22
Ser	24.8	51	36.6	46.4	26	47.1	49.6	70.8	48.0	42	38	35
Glu	56.8	92	82.6	99.3	95	134.2	100.8	182.2	124.0	86	111	150
Pro	28.9	29	22.5	47.2	41	0.5	33.8	80.7	40.4	36	37	22
Gli	34.6	81	75.9	82.0	61	95.4	71.3	126.8	66.7	48	79	93
Ala	39.6	90	71.5	100.0	78	115.6	82.5	145.8	72.2	68	77	145
Cis	17.7	8	7.9	15.0	6	6.5	10.1	27.9	9.5	6	11	11
Val	35.2	57	40.3	76.7	72	82.7	57.6	130.5	59.8	54	51	78
Met	13.4	19	10.4	24.5	30	4.0	18.6	30.7	26.0	14	18	17
Ile	31.6	50	29.2	48.7	37	60.1	46.1	89.5	35.8	30	51	58
Leu	41.1	58	84.2	80.3	64	94.4	80.4	161.3	96.8	56	84	67
Tir	20.3	23	3.5	32.7	33	12.3	25.1	32.2	22.9	18	26	39
Fen	22.0	24	22.0	32.1	29	39.3	37.1	61.2	24.0	18	41	22
Trip	N.D.	8	1.82	24.5	24	N.D.	8.7	14.0	6.6	4	18	11

Composición de 12 codasas en *E. coli* [22].

† Expresado en residuos por mol de enzima; N.D.= No Determinado

En ocasiones la comparación de dos codasas de la misma especificidad y de diferentes organismos presentan marcadas diferencias en su composición, tal como lo expresan los estudios de lisil-codasa de levadura y de E.coli. [22,49,50].

Investigaciones llevadas a cabo por medio de mapeo de alta resolución probadas en dos dimensiones demostró que metionil-codasa (dímero de 66,000 D) y leucil-codasa (cadena única de de 110,000 D) procedente de B. stearothermophilus exhiben secuencias repetidas internas [19].

Por otro lado los estudios de Blow et.al. [51] de la estructura tridimensional por difracción de rayos x de metionil-codasa de E.coli y tirosil-codasa de B. stearothermophilus, ambas de estructura dimerica y distinto peso molecular, presentaron notable semejanza estructural. Para este caso la región de homología parece estar conformada de 5 cadenas beta plegadas, incluyendo un plegamiento que se ha especulado daría cabida a un mononucleótido (a pesar de que se desconoce la capacidad de las codasas para unirse con mononucleotidos) constituido de 3 estructuras beta paralelas unidas a 2 hélices alfa que ligan a una de las cadenas betas con la siguiente. Dentro de estas conformaciones se ha identificado una homología, pero, en esta ocasión, a nivel de secuencias de aminoácidos. La homología se presenta a lo largo de una secuencia de 14 aminoácidos, en donde la cistina e histidina se disponen en posición idénticas en ambas codasas [52]



Los resultados de secuenciación, muestran que no siempre las codasas presentan secuencias repetidas. Por ejemplo, la triptofanil-codasa de E. coli, B. stearothermophilus y placenta humana (las dos primeras constituidas de un dímero idéntico de 37,000 D cada uno y la última de dos dímeros de 58,000 D cada uno) en ningún caso presentan secuencias repetidas. Los mismos resultados se han obtenido con seril-codasa de E. coli. En contraste las subunidades  $\alpha_2\beta_2$  de fenil-codasa de levadura (en donde la subunidad beta tiene un peso molecular de de 60,000 D. y la alfa de 70,000 D) mostraron repeticiones en cada una de las subunidades [19].

Finalmente, de las codasas que constituyen el complejo nuclear en organismos superiores, cinco de ellas se presentaron como monómeros y la lisil-codasa (y posiblemente metionil-codasa) son dímeros (vease Tabla 7).

TABLA 7

codasa	hepatocito de		levadura	estructura	<u>E. coli</u>	
	oveja	conejo			MrX10 <sup>-3</sup>	estructura
Ile	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	124		112	$\alpha_1$
Leu	129	129	128 <sup>b</sup>		105	$\alpha_1$
Met	103	$\alpha_2$ 108	$\alpha_2$	ND <sup>a</sup>	85	$\alpha_2$
Gln	94	96		ND <sup>a</sup>	69	$\alpha_1$
Glu	85	150		ND <sup>a</sup>	56	$\alpha_1$
Lis	79	$\alpha_2$ 76	$\alpha_2$ 72		68	$\alpha_2$
Arg	73	74	73		63	$\alpha_1$

Movilidad relativa en electroforésis (Mr) del complejo en hepatocitos de conejo y oveja, los cuales se comparan con algunas codasas en levadura y E. coli [39].

<sup>a</sup>ND = No Determinada

<sup>b</sup>de Candida utilis

El porqué leucil-, arginil-, y lisil codasa presentan pesos moleculares semejantes en hepatocitos y en levadura a pesar de que en los primeros las codasas están asociadas en un complejo nuclear y en las levaduras existen aisladamente (no asociadas a un complejo nuclear) constituye un enigma a resolver.

Como se puede observar, la mayoría de estos estudios tienden a confirmar la hipótesis de que en las codasas de gran peso molecular de cadenas únicas o las constituidas por varias unidades contienen secuencias repetidas a diferencia de las codasas poseedoras de subunidades pequeñas.

La existencia de secuencias repetidas en codasas de gran peso molecular y de cadenas únicas nos permite establecer su equivalencia con las codasas de subunidades diméricas [19,53]. La disposición de tales secuencias se presenta como una evidencia vestigial de un proceso evolutivo de duplicación y fusión de genes [19,20,22,54,55,56,57].

El apoyo a esta sugerencia la encontramos en las características estudiadas para la glutamil-, glutaminil- y arginil-codasas de E.coli. Todos ellos están constituidos por una sola cadena con diversos grados de homología en su estructura primaria, siendo mayor en la glutamil y arginil-codasas y ligeramente menor (relativa a las anteriores) en la glu-codasa. Esto ha llevado a sugerir [58] que probablemente los genes estructurales de glutaminil y arginil-codasa evolucionaron por mutación y duplicación de un gen que codificaba para una

glutamil-codasa primitiva.

Esta propuesta resulta ser muy atractiva y puede corroborarse con el mecanismo particular de catálisis que realizan (pág.47) así como con los estudios de B. Subtilis en donde como ya habíamos mencionado (pág.26) no se presenta la gln-codasa, por lo que la activación de gln se lleva a cabo a través de glu-codasa.

Esta serie de características en común presentes en glu., gln y arginil-codasa nos permite considerarlas como posiblemente las primeras codasas con funcionalidad biológica, surgidas probablemente de un ancestro común.

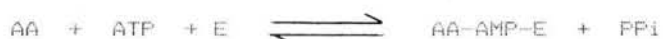
#### FUNCION CATALITICA

Al inicio del presente capítulo se esbozó, grosso modo, las reacciones de catálisis en las que participan las codasas. A continuación desglosaremos este aspecto abarcando desde los sustratos implicados hasta las condiciones físico-químicas óptimas para llevar a cabo dichas reacciones.

Las codasas catalizan dos reacciones que experimentalmente son distinguibles.

La primera reacción (de activación) comprende el ataque nucleofílico del enlace anhídrido de la porción alfa y beta del

grupo trifosfato del ATP con la consecuente formación de aminoacil-AMP-codasa y la liberación de pirofosfato inorganico.



Es importante señalar que en E.coli, por ejemplo, la glutamil.-glutaminil y arginil-codasas necesitan de su tRNA afin para llevar a cabo la reacción de activación [59,60], mientras que las codasas restantes solamente de su aminoácido o de algún otro semejante.

El estudio de la catálisis en estos casos resultaría de gran importancia ya que el tRNA funciona como un cofactor en la reacción.

Se sabe desde hace ya varios años que la molécula de tRNA además de cumplir su función de transportadora de aminoácidos durante la síntesis de proteínas ejerce otras funciones. Entre ellas el de actuar como coenzimas para la iniciación en la síntesis de DNA catalizada por la reversa transcriptasa [61], como regulador metabólico [62,63], en la síntesis de pared celular [64], como molécula capaz de incorporar aminoácidos en ausencia de ribosomas [65]. Seguramente que estas funciones fueron capitales en los inicios de la replicación [66].

La participación del tRNA como cofactor en los inicios de la traducción se hace patente al analizar las características de

glutamil.-glutaminil y arginil-codasas de E.coli.

Ellas están constituidas de pequeñas unidades monoméricas (56,000, 69,000 y 74,000 D respectivamente) y con menor número de secuencias de duplicación que las encontradas en codasas monoméricas de pesos moleculares mayores de 100 D [67].

Si relacionamos la naturaleza monomérica con los requerimientos catalíticos de cada una de estas enzimas que utilizan como coenzima a su respectivo tRNA, quizá estemos siendo testigos de uno de los primeros mecanismos de catálisis de las codasas, en el que la activación del aminoácido así como su esterificación al tRNA *affn* se presentaba en una sola reacción, es decir:



Que es tal y como se lleva a cabo en glutamil-, glutaminil y arginil-codasas de varios organismos contemporáneos.

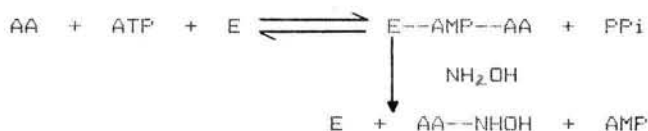
Glutamil-, arginil-, y glutaminil-codasas necesitan de su tRNA *affn* para llevar a cabo la reacción de activación [47,48], mientras que las codasas restantes solamente de su aminoácido o de algún otro semejante.

La reacción de activación no siempre es específica para cada aminoácido [68]. Por ejemplo, la isoleucil-codasa de E.coli. cataliza la formación de leucil-, y valil-adenilato, y de

manera similar la valil-codasa cataliza la formación de treonil adenilato [22].

Los métodos utilizados para el estudio de la reacción se han realizado mediante el uso de PPI el cual se intercambia con el fosfato del ATP, formándose ATP marcado, el cual es fácil de cuantificar una vez filtrado en carbono.

La reacción de activación se puede identificar por la formación de aminoacilhidroximato cuando se adiciona hidroxilamina a la mezcla de reacción [50].



Aunque de gran utilidad en un principio, ha sido substituido por la sensibilidad del método de intercambio radiactivo ATP-PPi.

La segunda reacción catalizada por las codasas es la transferencia del aminoácido del adenilato al correspondiente tRNA:



Esta segunda reacción, básicamente de esterificación, muestra un alto grado de especificidad tanto para el tRNA como para el aminoácido transferido.

El grado de afinidad alcanza una armonización tal que cuando un aminoácido se asocia a un tRNA no afín, la codasa reconoce este tRNA incorrecto y de inmediato produce la hidrólisis del aminoacil-tRNA. El suceso se ha reportado para Ile-tRNA<sup>fen</sup> en donde la fenil-codasa produce la rápida separación del Ile-tRNA en sus componentes originales [22].

La misma situación se presenta cuando interviene un aminoácido de clase D [69].

Los mecanismos de corrección que llevan a cabo las codasas son bastante bien conocidos [70,71]. Tres de ellos han sido descritos y de acuerdo a su capacidad correctora se conocen como: corrección cinética, corrección conformacional y corrección química.

La corrección cinética ocurre durante la activación de un aminoácido no afín a la enzima, si esta corrección no se ejecuta, la segunda reacción, que es la de aminoacilación del aminoácido con el tRNA puede dar origen a un cambio conformacional en la codasa al interactuar con el tRNA (sin llegarse a formar el complejo aminoácido no afín-tRNA-codasa) y así producir hidrólisis y separar el aminoácido de la codasa. Finalmente, si ninguna de las correcciones arriba citadas funciona y se logra formar el complejo aminoácido no afín-tRNA-codasa, la corrección química produce entonces disociación del complejo AA-tRNA (Véase la figura 4).





La elevada capacidad correctora de las codasas en la síntesis de proteínas sugiere que son enzimas altamente conservadas [72] que seguramente durante la evolución han sufrido poca modificación en su estructura.

Por otra parte la estabilidad del complejo aminoacil-AMP y el tRNA depende de la concentración de iones  $Mg^{++}$ . Se sabe además que la activación de la reacción depende del pH, el cual puede variar notoriamente con la proporción de  $Mg^{++}$  y ATP, que en cada caso tiene un óptimo diferente. Proporciones de Mg: ATP de 10 a 1 causan efectos inhibitorios; lo mismo ocurre cuando se presenta un exceso de aniones. El grado de inhibición varía para cada una de las codasas.

La esterificación del aminoácido con un tRNA no afin puede suceder en condiciones elevadas de  $Mg^{++}$ :ATP; cuando la concentración enzimática es muy elevada ó en presencia de solventes tales como dimetilsulfóxido ó metanol [22].

Aniones como el pirofosfato además de producir alteraciones enzimáticas inhibe la reacción de esterificación. Arginil y seril-codasas son las más afectadas por el PPI [19].

En cuanto a la unión del aminoácido con la ribosa del nucleótido terminal en el tRNA (extremo CCA) se sabe desde hace 20 años que el aminoácido fenilalanina se enlaza con la ribosa en la posición 3' de su respectivo tRNA [69]. En un principio se creyó que dos tercios del aminoácido se localizaban en la posición 3' y la parte restante en el 2'. Estudios posteriores

pusieron en duda dicha distribución y mostraron cómo la migración del grupo acil se producía durante el aislamiento del adenosin terminal aminoacilado. Sin embargo, trabajos recientes contradicen las anteriores conclusiones [22]. Recientemente un grupo de investigadores propuso un mecanismo razonable a partir de los resultados conocidos.

Sus conclusiones son las siguientes. a) El sitio de unión no es el mismo para todos los tRNAs. Algunos utilizan la posición 3' otros la 2' y los hay quienes pueden utilizar cualquiera de las dos posiciones (véase tabla 8).

A pesar de existir intentos de explicar esta distribución de enlaces de unión no se ha encontrado una explicación biológica para dicho resultado. Quizá la distribución es una consecuencia de la relación evolutiva entre diferentes codasas [19,20,73].

Así lo muestra la similitud de los sitios de aminoacilación para E.coli. y Levadura lo cual sugiere una aparente conservación de la posición inicial de aminoacilación del tRNA durante la evolución de organismos procariontes a organismos eucariontes [75].

b) Existe una constancia sorprendente en el sitio inicial de acilación entre el aminoácido y el tRNA en los distintos organismos. Los datos presentados en la tabla 8 ilustran esta aseveración.

TABLA 8

amino acido	E.coli			levadura	gera.de Trigo	hepatocito de bovino
	74	75	76	76	77	78
Ala	3'	I	3'	3'	3'	3'
Arg	2',3'	2'	2'	2'	2',3'	2'
Asn	3'	2'	2',3'	2,3'	3'	2,3
Asp	3'	I	I	2,3'	3'	3'
Cis	I	2',3'	2',3'	2',3'	3'	3'
Gln	2'	I	I	3'	2'	I
Glu	2'	I	2'	I	2',3'	I
Gli	3'	3'	3'	3'	3'	3'
His	3'	3'	3'	3'	3'	3'
Ile	2',3'	2'	2'	2'	2'	2'
Leu	2'	2'	2'	2'	2'	2'
Lis	3'	3'	3'	3'	2',3'	3'
Met	2',3'	2'	2'	2'	2',3'	I
Fen	2'	2'	2'	2'	2',3'	2'
Pro	2',3'	I	3'	3'	3'	I
Ser	2',3'	3'	3'	3'	3'	3'
Thr	3'	3'	3'	3'	3'	3'
Trip	2',3'	2'	2'	3'	2',3'	3'
Tir	2'	2',3'	2',3'	2',3'	2'	2',3'
Val	2'	2'	2'	2'	2'	2'

Comparacion de tRNAs procedentes de E.coli, levadura, germen de trigo y hepatocito de bovino en donde se muestra el sitio en el cual el aminoacido es localizado una vez aminoacilado [19].  
I = Indeterminado.

#### RECONOCIMIENTO DEL tRNA POR LA CODASA

La mayor parte de los estudios acerca del ensamble de las codasas con sus ligandos afines se han enfocado al estudio de los requerimientos estructurales de los distintos tRNAs con la enzima respectiva. Es por tal motivo conveniente realizar antes una descripción somera de las principales características de los tRNAs.

La primera evidencia de la existencia de los tRNAs se logró en 1957 por Hoagland y Zemecnik. La molécula aceptora

descubierta, resultó ser un tipo de ácido ribonucleico presente en la fracción soluble del extracto de hígado de rata [69].

Paul Berg y sus colaboradores en la Universidad de G. Washington, demostraron claramente que había no una sola clase de molécula aceptora sino una verdadera familia de ácidos ribonucleicos solubles (sRNA o tRNA como había de llamárseles después aduciendo a su función de transferir grupos aminoacilos) [18].

Antes de 1963 no se habían desarrollado técnicas satisfactorias para lograr la separación o purificación de los tRNAs. Sin embargo por aquella época no existía la duda de la presencia de los 20 aminoácidos en la célula con capacidad de unirse a 20 diferentes tRNAs. Todo el trabajo acerca de la estructura del tRNA era elaborado mediante mezclas poco fraccionadas de sólo un organismo de donde las conclusiones se extendían a los demás organismos.

En la actualidad los sofisticados métodos utilizados han revelado la presencia de más de 75 diferentes tipos de tRNAs. Su tamaño varía de 75 a 93 nucleótidos a los cuales se les respresenta esquemáticamente con una estructura en forma de "hoja de trebol".

Sin excepción alguna todos los tRNAs contienen 4 asas denominadas el asa D (dihidrouridina), el asa TΨC, el asa del anticodón y el asa de la zona aceptora. Algunos presentan un asa variable.

De los tRNAs secuenciados, existen bases que permanecen en posición invariable y son los siguientes: U<sub>6</sub>, A<sub>14</sub>, G<sub>18</sub>, G<sub>19</sub>, A<sub>21</sub>, U<sub>33</sub>, G<sub>63</sub>, T<sub>59</sub>, Ψ<sub>55</sub>, C<sub>54</sub>, A<sub>56</sub>, C<sub>61</sub>, C<sub>74</sub>, C<sub>75</sub>, y A<sub>76</sub>. Las bases poco variables seguidas en frecuencia son Y<sub>11</sub>, R<sub>15</sub>, R<sub>29</sub>, Y<sub>34</sub>, H<sub>37</sub>, Y<sub>48</sub>, R<sub>57</sub>, Y<sub>60</sub> y se denominan bases semivariabiles. En la figura 5 se representan dichos nucleotidos. (un estudio comparativo de los tRNAs se encuentra en Dillon [79]).

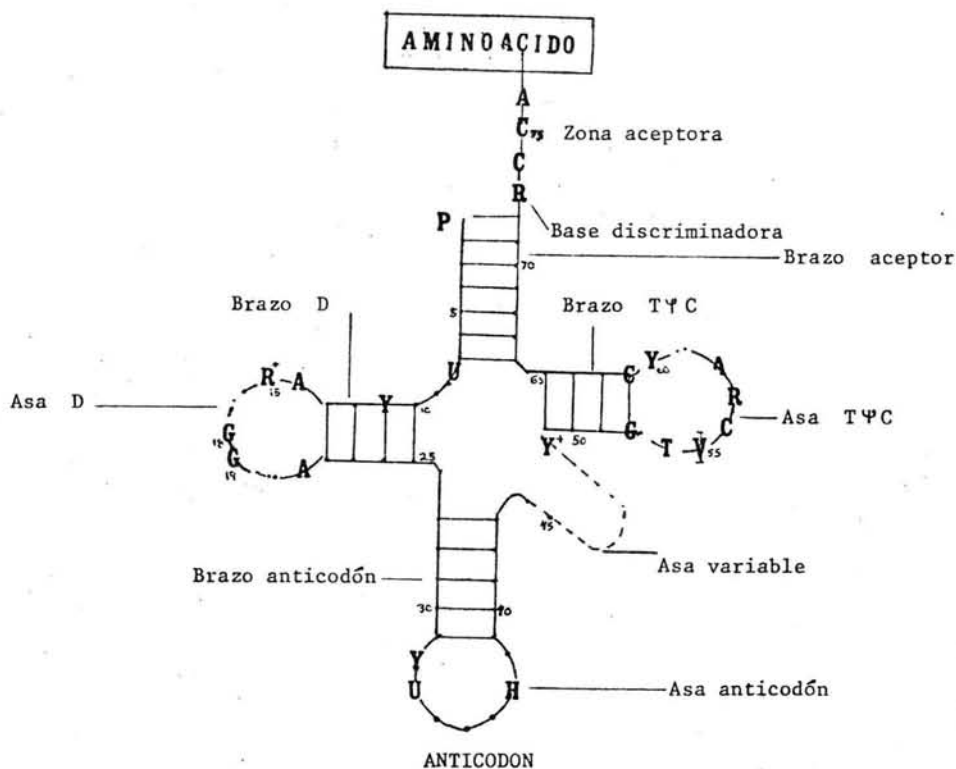


Fig. 5. Diagrama de todos los tRNAs secuenciados, exceptuando tRNAs de iniciación y Archaeobacterias. Y = pirimidina, R = purina, H = purina hipermodificada.  $R_{15}^+$  y  $Y_{78}^+$  frecuentemente son complementarios [80].

Hasta aquí lo referente a las características estructurales de los tRNAs. Ahora veamos algunos aspectos de su reconocimiento por las codasas.

La base molecular de la interacción específica de las codasas y su tRNA correspondiente ha sido analizado ampliamente [26].

Los intensos esfuerzos para correlacionar la estructura de los tRNAs y su habilidad de reconocimiento por la codasa afin no se ha traducido en una probable semejanza estructural común capaz de ser reconocida por las codasas. Al parecer la enzima reconoce ciertas regiones de la estructura terciaria de su tRNA correspondiente y las bases implicadas en la región de reconocimiento de la estructura terciaria son diferentes en cada tRNA.

Los estudios a este respecto se han llevado a cabo utilizando dos métodos. Uno de ellos consiste en alterar la estructura del tRNA y determinar el efecto de las modificaciones en su interacción con las codasas. La realización de dicho estudio incluye modificaciones químicas en el tRNA, aminoacilación de moléculas fragmentadas, análisis de tRNAs mutantes, hidrólisis de codasas con proteasas.

La segunda clase de estudios consiste en mapear directamente los puntos de contacto de las codasas después de la formación de complejos covalentes fotoactivados, marcaje isotópico, aminoacilación heteróloga. Dichos métodos proporcionan gran

cantidad de información y aunque no resuelven el problema del reconocimiento, constituyen una fuente invaluable para lograr una descripción de sus características principales.

A) Modificación química del tRNA.

Modificaciones químicas con bisulfito, acetona, clorocetoaldehído, fotooxidación, o cianoetilación son algunos de los métodos empleados para provocar modificaciones en las bases de los tRNAs.

Varios de estos tratamientos aplicados en tRNA<sup>met</sup> y su interacción con metionil-codasa se representan en la figura 6.





Las áreas en cubos representan las modificaciones químicas tratadas. La alteración de 25 a 75 bases no causa la inactivación del tRNA. Sin embargo, modificaciones en las dos primeras bases del anticodón, de la zona aceptora o de una base en el brazo variable producen la inactivación del tRNA.

Los estudios reportados para diferentes tRNAs no permiten generalizar estos resultados [81], probablemente los puntos de modificación son sitios más susceptibles de producir cambios conformacionales en la estructura del tRNA.

#### B) Aminoacilación de moléculas fragmentadas

Este método consiste en seccionar porciones del tRNA no requeridas para la interacción con su codasa, dejando aquellas que son esenciales.

La eliminación del anticodón en el tRNA<sup>fen</sup> de levadura no inhibe su aminoacilación con su respectiva enzima, por lo tanto, el anticodón no es esencial para el reconocimiento en este caso [82]. Un resultado diametralmente opuesto al anterior es el de tRNA<sup>val</sup> para el mismo organismo. Al remover cualquiera de los nucleótidos del anticodón se pierde por completo la capacidad de ser aminoacilado por la enzima [83].

Estos resultados revelan cómo en determinados casos la enzima interactúa con la región del anticodón mientras que en otros casos no lo hace. Por consiguiente, las codasas pueden reconocer diferentes partes de la estructura de los tRNAs y no

necesariamente interactúan con el anticodón. Debe destacarse que en ciertos casos, aun cuando la codasa no utilice como centro de reconocimiento al anticodón, es capaz de hidrolizar el grupo acilo cuando se encuentra un aminoácido no afín al tRNA [71].

#### C) Análisis de tRNAs mutantes

Comparaciones de los tRNAs mutantes de E.coli con tRNAs silvestres por medio de la manipulación genética hacen posible afectar el reconocimiento del tRNA por las codasas y la consecuente aminoacilación por una codasa no afín. Mutaciones de ésta índole ocurren tanto en la zona del anticodón como en la zona aceptora, regiones ampliamente separadas en la estructura tridimensional.

Así pues, estos estudios no definen el mecanismo específico de reconocimiento, aunque sí reflejan la extrema precisión del mismo.

#### D) Formación de complejos covalentes fotoactivados

La activación fotoquímica del complejo aminoacil-tRNA codasa se lleva a cabo por irradiación directa a 254 nm.

Se conoce una variedad de bases nucleotídicas y de cadenas de aminoácidos que pueden unirse covalentemente bajo la acción de luz ultravioleta. Este es un procedimiento ideal para que se presente la unión fotoquímica, lo cual ha permitido estimar los

puntos de contacto de ocho diferentes codasas.

Los resultados al respecto sugieren la existencia de una característica común de la organización estructural de las codasas. En la figura 7 se describen únicamente las regiones que son generalmente observables como sitios de contacto en el complejo tRNA-codasa.

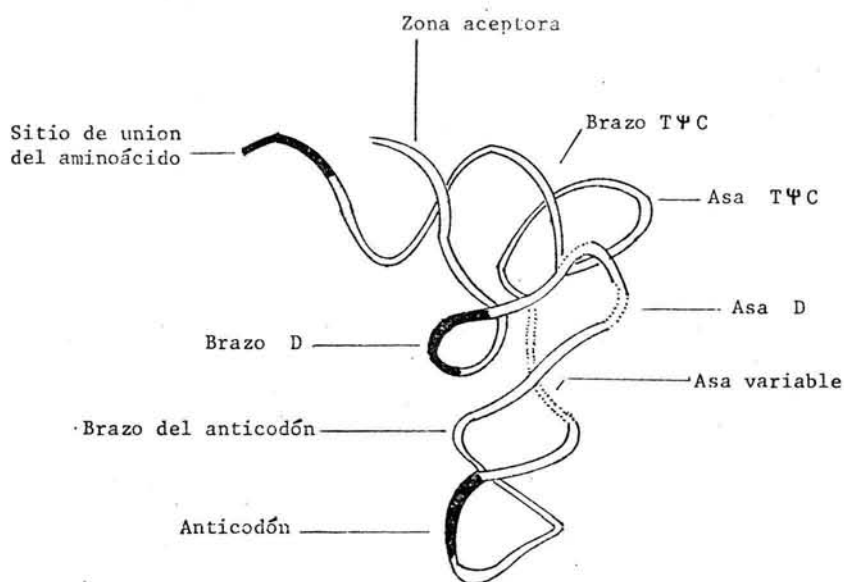


Fig. 7. Ilustración esquemática de la estructura tridimensional del tRNA. Las áreas sombradas identifican regiones cercanas a la superficie de la codasa, de acuerdo con los resultados presentados en varios sistemas [19].

### E) Aminoacilación heteróloga

Como se mencionó anteriormente, algunas codasas son capaces de aminoacilar tRNAs no afines de diferentes fuentes celulares. Conocer qué bases son las escogidas por la enzima puede realizarse comparando la secuencias nucleotídicas de los tRNAs.

Se ha observado [84] que la fenil-codasa de levadura puede aminoacilar tRNA<sup>met</sup>, tRNA<sup>val</sup>, tRNA<sup>lle</sup> y tRNA<sup>fen</sup> de E.coli.

Una explicación a este respecto la podemos encontrar en Crother et.al [85]. El citado autor ha sugerido que el probable sitio que reconoce la codasa de su respectivo tRNA es el de la base discriminadora (ver figura 5). De acuerdo con esta hipótesis los aminoácidos con características químicamente similares tendrán la misma base discriminadora .

Si bajo esta serie de consideraciones analizamos a tRNA<sup>met</sup>, tRNA<sup>val</sup>, tRNA<sup>lle</sup>, y tRNA<sup>fen</sup> de E.coli y de levadura encontramos que existen características que son comunes. Ellas son: la presencia de adenina como base discriminadora, la capacidad de llevar a cabo la aminoacilación en el extremo 2' [20] y finalmente, el de que en los cuatro casos sus respectivos aminoácidos, todos hidrófobos, son codificados por uracilo como base central del codón.

A diferencia de lo que sucede en la levadura, en E.coli se ha reportado una relación muy estrecha en las secuencias nucleotídicas de tRNA<sup>met</sup>, tRNA<sup>lle</sup>, y tRNA<sup>val</sup> [86].

Así mismo, en el caso de *E. Stereathermophilus*, también se ha reportado la presencia de cierta homología de regiones peptídicas en metionil-, leucil y valil codasas. Resultaría muy interesante comparar estas codasas con las de *E. coli* y las de levadura.

Basandose en las similitudes de tRNA<sup>met</sup>, tRNA<sup>le</sup> y tRNA<sup>val</sup> de *E. coli* Dudock [87] argumenta que nueve nucleótidos del asa D y cuatro nucleótidos del extremo 3' de estos tRNAs constituyen el sitio de reconocimiento para la fenil codasa de levadura.

Roy [88] y Vlassov [89] han apoyado dicha idea y sugieren como probable zona de reconocimiento, además del asa D, el asa variable y el anticodón.

Todas estas similitudes conjugadas tanto en los sitios activos de reconocimiento de las codasas con sus respectivos sustratos así como la de los sustratos respaldan la idea de un ancestro común tanto del tRNA como de las codasas.

Los estudios con fenil-codasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron que puede realizar la aminoacilación del tRNA<sup>fen</sup> de *Schizosaccharomyces pombe*. El tRNA<sup>fen</sup> reconocido de la *Schizosaccharomyces pombe* carece de los nucleótidos de reconocimiento que se presentan en el tRNA<sup>fen</sup> propio de la *Saccharomyces cerevisiae* [90].

Probablemente la clave del acertijo a resolver se encuentre en la estructura terciaria de los tRNAs. Sin embargo, esta

consideración tendrá que esperar hasta lograr una mayor comprensión de ella.



## CAPITULO 2

### ASPECTOS CINETICOS Y TERMODINAMICOS DE LA ACILACION POR CODASAS

Se ha visto que el sistema constituido por codasa, tRNA y aminoácido en su conjunto, es más estable a pH de 5.5 que a pH de 7.5.

Por otra parte la estabilidad del complejo tRNA-codasa es mayor cuando tanto el tRNA como su codasa (afín) proceden del mismo organismo (sistema homólogo). La inestabilidad es más frecuente cuando la codasa se une a cualquier otro tRNA de procedencia distinta al de la enzima (sistema heterólogo).

#### a) Parámetros termodinámicos.

La constante de asociación para los dos sistemas, homólogo y heterólogo, se estudian en función de su temperatura.

Los resultados presentados muestran algunos obstáculos ya que al parecer existen fluctuaciones en los valores de las  $\Delta H$  y  $\Delta S$  registrados para ambos sistemas. Se dice que esto es debido a que entran en juego otros factores como la interacción electrostática o la influencia térmica en la regulación de la expresión del gene de la codasa [91].

Las codasa del complejo nuclear en organismos superiores son de naturaleza termolábil y probablemente ejercen otras funciones, como la de regulación génica.

b) Parámetros cinéticos

Ebel et.al. [92] sugieren que la discriminación por la enzima depende no sólo del enlace específico del tRNA, sino que en ocasiones principalmente de la velocidad máxima.

Algunos parámetros cinéticos para sistemas homólogos y heterólogos se muestran en la tabla 9.

TABLA 9

tRNA	Km ( $\mu$ M)	Vmax
levadura-tRNA <sup>fen</sup>	0.83	1.0
trigo-tRNA <sup>fen</sup>	0.56	1.2
E.coli-tRNA <sup>fen</sup>	5.8	0.2
E.coli-tRNA <sup>val</sup> <sub>1</sub>	3.7	0.1
E.coli-tRNA <sup>ala</sup> <sub>1</sub>	4.2	0.05
E.coli-tRNA <sup>ile</sup>	5.2	0.02
E.coli-tRNA <sup>ala</sup> <sub>2</sub>	3.4	0.02
E.coli-tRNA <sup>val</sup> <sub>2</sub>	1.5	0.01
E.coli-tRNA <sup>leu</sup> <sub>26</sub>	1.3	0.007
E.coli-tRNA <sup>met</sup>	1.0	0.007

Parámetros cinéticos de aminoacilación heteróloga correcta e incorrecta de fenil-codasa de levadura. (La codasa empleada en todos los casos fue la de levadura).

La aminoacilación se llevó a cabo a 30 en 50 mM Tris, 40 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.2 [92].

Como es de esperarse, estos datos muestran que en un sistema heterólogo (es decir, fenil-codasa procedente de levadura que actúa en E.coli-tRNA) la  $V_{max}$  es inferior al caso homólogo (cuando fenil-codasa de levadura se asocia con levadura tRNA).

La no acilación aun en sistemas homólogos puede inducirse por modificaciones en las condiciones de la solución. Por ejemplo, la adición de solventes orgánicos usados en la mezcla de reacción pueden causar múltiples variaciones de no acilación. Ello nos da una idea de la sensibilidad del reconocimiento y de los riesgos de modificación que implica el sólo manipular el sistema enzimático [19].

#### REACCION DE UNION Y ACTIVACION DEL AMINOACIDO POR LA CODASA

Debido a que el grupo amino (de un aminoácido) es esencial en la formación del enlace peptídico durante la síntesis de proteínas en el ribosoma, no es extraño que moléculas con grupos aminos compitan cinéticamente durante dicho proceso. Así los amino alcoholes, aminoácidos no naturales y adenilatos aminoalquílicos actúan como inhibidores competitivos con constantes de inhibición cercanos a los valores de  $K_m$  de los aminoácidos correspondientes. La constante de equilibrio de disociación del complejo enzima-aminoácido para la mayoría de los aminoácidos se ha medido por equilibrio de diálisis, o bien se ha deducido de mediciones cinéticas.

Como se mencionó anteriormente, sólo aminoácidos L son activados, más no los de la serie D, a excepción de la D-tirosina que también puede activarse. No obstante su valor es bajo en comparación al isómero L. Los valores de  $V_{max}$  son mucho menores para el isómero D comparándolo con la L-tirosina, siendo que el valor para  $K_m$  es bastante similar.

Además, el complejo D-tir- $tRNA^{Tyr}$  está sujeto a una hidrólisis más rápida que L-tir- $tRNA^{Tyr}$  en presencia de tirosil-codasa de varios organismos [22].

a) Unión del ATP con la codasa.

Todos los resultados señalan la existencia de un sólo sitio de enlace del ATP por codasa. Lo que reafirma el hecho de que son enzimas altamente conservadas.

Los requerimientos estructurales del ATP elevan a la adenina al rango de esencial. Ninguna otra base púrica o pirimidica puede actuar como sustrato para cualquiera de estas enzimas. En ocasiones la sustitución del ATP por GTP es tolerado, sin embargo, actúa como inhibidor. El sustrato utilizado en la mayoría de las codasas investigadas ha sido el desoxi ATP (dATP) el cual participa en la reacción de activación y de aminoacilación in vitro.

La constante cinética al emplear dATP presenta un valor mucho mayor a la del ATP, mientras que la  $V_{max}$  en la reacción de esterificación del aminoácido y su tRNA afín es aproximadamente

la misma para ambos derivados.

Se ha encontrado además que la ó aminopurina es la mejor fuente de enlace energético entre el ATP y la enzima, de hecho, la adenina sólo se une más estrechamente a la enzima que al ATP.

Conclusiones definitivas de la forma de unión del ATP con las codasas deberán realizarse hasta que su estudio comprenda parámetros cinéticos.

- b) Influencia de los cationes divalentes en la actividad de la codasa.

Los cationes divalentes tales como el  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ , o  $Ca^{++}$  son indispensables en la actividad de las codasas. Es sabido que los cationes divalentes también catalizan la transformación del tRNA de la forma inactiva a una activa, siendo reversible su participación.

El ion  $Mg^{++}$  resulta ser el más efectivo de todos los cationes conocidos.

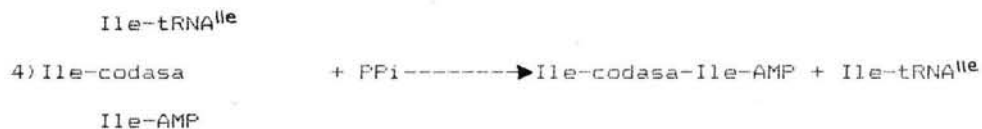
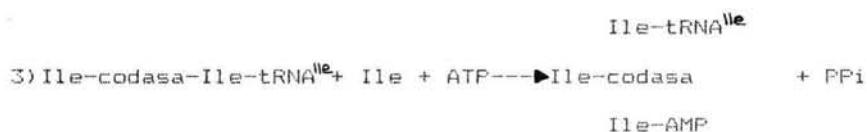
- c) Mecanismo de catálisis

Los escasos estudios cinéticos en codasas demuestran la existencia de tres sitios activos. El ATP, el tRNA y el aminoácido se enlazan independientemente uno del otro sin existir un orden de adición de los sustratos.

Se dice que estas múltiples reacciones de acoplamiento en los centros activos, aumentan la eficiencia catalítica de la

enzima [94].

No existe un reporte general del mecanismo de catálisis para todas las codasas por lo que nos limitaremos a comentar la secuencia de reacciones propuesta por Kalousek [22]. El citado autor arguye que la aminoacilación ocurre vía cíclica a través de numerosos pasos. El mecanismo se resume en las siguientes reacciones:



.  
.  
etc

Con respecto a la función catalítica de los complejos codasas de organismos superiores, se dice que éstos a diferencia de otros sistemas enzimáticos existentes en la célula catalizan reacciones más bien paralelas que secuenciales [34].

Aunque se ha reportado la presencia de  $\text{Zn}^{++}$  en algunas codasas

[93], no se ha investigado a fondo su participación durante la catálisis. Es de esperarse que las investigaciones minuciosas a este respecto en las distintas codasas de los variados organismos nos permitirá establecer una comparación más estrecha de su grado evolutivo.

#### REGULACION GENETICA DE LAS CODASAS

La traducción en el ribosoma de los nucleótidos del mRNA en una secuencia de aminoácidos de una proteína requiere de la participación de un gran número de enzimas no ribosomales. En E. coli, estas incluyen las veinte codasas, tres factores de elongación y dos factores de liberación. La interacción existente entre las codasas con dichas moléculas se ha logrado a través de mutaciones inducidas a nivel genético para la codasa, lo que ha permitido localizar el gen estructural de la enzima.

Se ha visto que la cantidad disponible de enzimas (codasa) en la célula actúan como elementos reguladores en los niveles de producción y participación de las mismas enzimas. Además, las enzimas regulan la ruta biosintética de ciertos aminoácidos, los cuales a su vez regulan la síntesis de codasas [95].

Un aminoácido esterificado con su respectivo tRNA funciona como correpresor del operón para la codificación de la enzima [19].

Los procedimientos de clonación han resultado apropiados para comprender los diferentes papeles funcionales de gran

cantidad de codasas en los procesos celulares [19]. Se espera que este vehículo sea a su vez de utilidad para la investigación de procesos de regulación celular tales como la división celular, síntesis de compuestos reguladores polifosfatados y en el transporte de polipéptidos.

Estudios en los últimos años han resultado ser reveladores, ya que muestran el efecto de antibióticos convencionales en las codasas y su inhibición en la síntesis protéica [96]. Otras investigaciones han podido mostrar la influencia de la actividad enzimática de las codasas en los distintos estadios de desarrollo [97], y de los factores que estimulan la reacción de aminoacilación en semillas de plantas [72,98,99].

Si bien es cierto que se ha avanzado bastante en el conocimiento de las codasas, resulta mínimo lo que hasta hoy se ha podido resolver, comparado con la infinidad de incertidumbres que restan por resolverse.

Así pues, el estudio de las codasas garantiza un futuro prometedor capaz de responder numerosas e importantes preguntas tales como ¿Qué relación existe entre ellas? ¿Cuántas codasas existen por aminoácido? ¿Cómo se ven dichas enzimas influenciadas por hormonas? ¿Cómo se organizan en cada uno de los niveles de jerarquización biológica? ¿Cuáles son los detalles de la cinética enzimática asociada a su acción? ¿Que significado biológico posee el complejo enzimático en organismos superiores? ¿Cómo se lleva a cabo la interacción con los factores de transcripción? ¿Cuál es el desempeño de las codasas



en las funciones regulatorias? etcétera.

## CAPITULO 3

### ASPECTOS GENERALES EN EL ESTUDIO DEL ORIGEN DEL CODIGO GENETICO

Se dice que Daunce fue la primera persona en sugerir que la información genética contenida en una secuencia de DNA es transcrita a otra de RNA, mediante la intervención de moléculas intermediarias a las que denominó protefnas adaptadoras (postuladas más tarde por Crick como tRNAs) en donde tres nucleótidos especifican a un aminoácido [100].

Esta propuesta formulada en 1952 constituye la primera sugerencia de la existencia de un código genético [101].

Hacia 1953 cuando se realizó el importantísimo descubrimiento por Watson y Crick sobre la estructura de la doble hélice del DNA, un grupo de investigadores del que sobresale el cosmólogo George Gamow se dedicó a proponer las bases teóricas de una probable clave genética.

La hipótesis propuesta pretendía dar explicación a la conformación y funcionalidad del código genético con base en supuestas interacciones. En ella se consideraba, la interacción directa de los veinte aminoácidos naturales con las cuatro bases nucleicas, sin la intervención de enzimas, tRNAs o ribosomas. La equivalencia de tres nucleótidos por aminoácidos fue aceptada

desde un principio como la más adecuada, ya que de esta manera se tenían sesenta y cuatro posibles codificaciones, más que suficientes para la codificación de los veinte aminoácidos.

Este gran número de alternativas hizo pensar en la posibilidad de una clave con superposición de mensajes [18], es decir, un código genético constituido esencialmente por tres diferentes categorías de codones: de un codón por aminoácido o con codones no sobrepuestos; codones completamente sobrepuestos y finalmente codones parcialmente sobrepuestos (Figura 8).

Figura 8

1. Traducción no sobrepuesta

Acido nucleico	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	....				
Codón	UCG			AUC			GAU			CGA			UCG			AUC							
Polipéptido	Ser			.	Ile			.	Asp			.	Arg			.	Ser			.	Ile		

$$\text{Porcentaje de codificación} = \frac{\text{nucleótidos}}{\text{aminoácidos}} = 3$$

2. Traducción completamente sobrepuesta

Acido nucleico	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	....
Codón	UCG	CGA	GAU	AUC	UCG	CGA	GAU	AUC	UCG	CGA	GAU	AUC	UCG	CGA	GAU	AUC	UCG	CGA	
Polipéptido	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Arg	

$$\text{Porcentaje de codificación} = 1$$

3. Traducción parcialmente sobrepuesta

Acido nucleico	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	G	A	U	C	....
Codón	UCG	GAU		UCG	GAU		UCG	GAU		UCG	GAU		UCG						
Polipéptido	Ser	.	Asp	.	Ser	.	Asp	.	Ser	.	Asp	.	Ser	.	Asp	.	Ser		

$$\text{Porcentaje de codificación} = 2$$

Sin embargo, dicha sugerencia se descartó poco después de publicarse la hipótesis de la molécula adaptadora (tRNA) por Crick y de darse a conocer un análisis exhaustivo de las secuencias peptídicas estudiadas.

Ocho años más tarde, es decir en 1961 con la síntesis in vitro llevada a cabo por Nirenberg y Matthaei [102] de un mRNA artificial constituido de ácido poliuridílico capaz de incorporar únicamente al aminoácido fenilalanina proporcionaba la herramienta idónea que habría de permitir descifrar al código genético.

El interés experimental por descifrar el código genético se propagó tan rápidamente que para 1965 los grupos de investigadores encabezados por Nirenberg en el National Institute of Health, de Bethesda, Maryland, y por el profesor Severo Ochoa de la Universidad de Nueva York, consolidaban el esfuerzo de sus trabajos proporcionando un esquema completo del código genético.

Una vez descifrado el código genético no tardaron en esbozarse nuevas ideas y sugerencias sobre su origen.

Los supuestos del probable mecanismo para el origen del código genético se han desarrollado a través de dos rutas [103] La escuela nombrada mecanicista, (con el modelo estereoquímico) supone que las afinidades directas entre aminoácidos y ácidos nucleicos son los factores responsables que dieron lugar al

actual código genético. La escuela alternativa, llamada darwinista, argumenta que las interacciones originales de aminoácidos y ácidos nucleicos eran inicialmente al azar y mediante el proceso evolutivo su función se vió fortalecida.

a) Modelo estereoquímico

La hipótesis estereoquímica propuesta originalmente por Gamow resurgió en 1966. Los seguidores de esta hipótesis Felec y Welton, en ésta ocasión la adoptaban para sugerir el origen del código genético.

Trabajando con cristalografía de rayos X reportaron la existencia de afinidad química entre aminoácidos y los codones de sus respectivos mRNAs [104].

Aunque sus trabajos fueron repetidos y refutados por Crick, la incertidumbre de quién tenía la razón persistía. Dunnill realizó estudios semejantes y pudo hacer constar que la afinidad evidenciada se presentaba más bien entre el aminoácido y su anticodón [105]. En esta ocasión los resultados fueron vistos con optimismo y respaldados por Crick y Woese.

La sólo idea de una ligera afinidad química de aminoácidos y ácidos nucleicos fue motivo suficiente para que en los años posteriores se hilvanaran múltiples investigaciones de carácter serio y profundo destinadas a resolver tal especulación.

Estas investigaciones han consistido en encontrar la correspondencia entre aminoácidos y las bases nucleotídicas

[106], la polaridad y tamaño de los aminoácidos con su codón [107,108,109,110] y anticodón [109,110,111]; afinidad de bases pirimídicas con aminoácidos hidrófobos y de bases púricas con aminoácidos hidrófilos [112,113]; interacciones de los aminoácidos con: mononucleótidos, (ác.adenílico) [114,115,116,117], ATP [114,115,116], con los cuatro diferentes mononucleótidos (GMP,CMP,AMP,UMP) [114,118], con polinucleótidos [115], etcétera.

b) Modelo darwiniano

Por otra parte, los trabajos de la escuela darwiniana que intenta simular el carácter fortuito y selectivo de los factores que dieron origen y permanencia al código genético, han propuesto sofisticados modelos matemáticos de computación [119,120,121,122], minuciosas investigaciones de laboratorio [125,126,127] y han formulado especulaciones y sugerencias de su evolución [119,129,130,131,132].

Los esfuerzos exhaustivos aplicados por parte de ambas escuelas no ha aportado ninguna prueba contundente que permita formular alguna conclusión sobre el origen del código genético.

Lo más seguro es que como sucede en la mayoría de estos casos de la investigación científica, ambas escuelas tengan razón [103].

La idea no resulta nada descabellada ya que en la actualidad podemos darnos cuenta de cómo la interacción química entre

ácidos nucleicos y proteínas es necesaria para que los primeros puedan controlar la síntesis de los segundos, si a ello le añadimos los efectos selectivos en dichas moléculas [125] obtendremos algunos de los probables ingredientes entre tantos que hicieron posible el origen del código genético.

#### ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL ORIGEN DE LAS CODASAS.

Wetzel [20] ha recopilado información recabada sobre las codasas, así como de la estructura terciaria de los tRNAs. Dicha información, afirma él, permite indagar el origen y desarrollo de las codasas en el proceso de codificación genética.

Al examinar la estructura cuaternaria de estas enzimas en E.coli junto con la especificidad por el extremo 2'OH ó 3'OH y de la base discriminadora en los tRNAs (cuarta base del extremo 3' del tRNA, Figura 5), el citado autor ha establecido una secuencia evolutiva del orden de aparición de los grupos codónicos de la siguiente manera: XUX -----> XRX -----> XYX (X= cualesquiera de las cuatro bases; R= purinas; Y= pirimidinas; U= uracilo).

En el esquema propuesto por Wetzel [20] el número de tRNAs es inferior al actual número de tRNAs. La formación de las veinte codasas la explica en base a la duplicación génica de las cinco codasas primitivas. La modificación sufrida, según expone, resulta ventajosa de tal forma que substituirían funcionalmente a las enzimas originales.

La idea de un código primitivo constituido por cuatro grupos codónicos y cinco codasas es también tomado en cuenta por Kaplan [133].

Lapointe [48] ha señalado que la diversidad de estructuras cuaternarias de las codasas no se relaciona con los eslabones evolutivos sugeridos por varias teorías evolutivas del código genético, por lo que ha sugerido que probablemente dichas estructuras se relacionan más con sus funciones regulatorias que con sus funciones específicas que es la de aminoacilación de los tRNAs.

Dicho autor arguye que la evolución del código genético puede comprenderse a partir de la comparación de las propiedades catalíticas que poseen tales enzimas, como es el caso de la arginil-codasa, la glutamil-codasa y la glutaminil-codasas, cuyas propiedades catalíticas comunes llevadas a cabo en una sola reacción y no en dos como en las demás codasas (ver pag.46) las agrupa en una familia de enzimas [48].

Entre otras de las características ya citadas para tratar de explicar el origen del código genético, esta la de aminoacilación del extremo 2'OH o 3'OH por las codasas.

La selectividad de la enzima por alguno de tales sitios se ha dicho está gobernada por el segundo nucleótido del anticodón del tRNA, por lo tanto, los que poseen A en tal posición (ile, leu, met, fen, val) son aminoacilados en el extremo 2'OH mientras que las que portan una G (ala, ser, pro, thr) son



aminoacilados en el extremo 3'OH. Aquellos con C o U son aminoacilado en cualquiera de ambos extremos [133]. La importancia del nucleótido central del anticodón y el extremo 3'OH para que la codasa pueda reconocer tanto al tRNA como al aminoácido se ha propuesto ser el resultado del acercamiento entre un par de tRNAs, el aminoácido y la codasa específica.

Esta idea se conoce con el nombre de modelo de interacción tRNA-tRNA, que se postula tuvo importancia también en el origen del código genético [134].

Aunque se desconoce la función real del complejo nuclear en organismos superiores se ha sugerido que cumple con otras funciones en la codificación genética [19,22,34].

Las observaciones realizadas por Ryazanov a este respecto, son en cierta forma un apoyo al efecto bamboleante (wobble) propuesto originalmente por Crick.

El efecto bamboleante nos dice que la primera base del anticodón (en dirección 5'----3'), al interactuar con la tercera base del codón lo hacen de manera imperfecta, sin cumplir las estrictas leyes de apareamiento de bases propuestas por Watson y Crick. Ahora bien, al analizar el código genético los aminoácidos de las codasas que frecuentemente se presentan en el complejo nuclear (leu, ile, glu, gln, lis, arg), corresponden a los aminoácidos codificados por familias mezcladas (se da esta denominación cuando en el código genético un grupo de cuatro codones codifica para más de un aminoácido). Además Ryazanov

[135] postula que la codasa codifica al nucleotido U en la primera posición del anticodón, afin de poder codificar a dos aminoácidos distintos en dichas familia mezclada. (Tabla 10.)

TABLA 10

	U	C	A	G	
U	UUU   Fen UUC   UUA   <b>Leu</b> UUG	UCU   UCU   Ser UCA   UCG	UAU   Tir UAC   UAA   ocre UAG   ambar	UGU   Cys UGC   UGA   opal UGG   Trp	U C A G
C	CUU   CUC   Leu CUA   CUG	CCU   CCC   Pro CCA   CCG	CAU   His CAC   CAA   <b>Gln</b> CAG	CGU   CGC   Arg CGA   CGG	U C A G
A	AUU   AUC   <b>Ile</b> AUA   AUG   Met	ACU   ACC   Thr ACA   ACG	AUU   Asn AAC   AAA   <b>Lis</b> AAG	AGU   Ser AGC   AGA   <b>Arg</b> AGG	U C A G
G	GUU   GUC   Val GUA   GUG	GCU   GCC   Ala GCA   GCG	GAU   Asp GAC   GAA   <b>Glu</b> GAG	GGU   GGC   Gli GGA   GGG	U C A G

La importancia de dicha observación estriba en que se ha reportado que las familias codónicas mezcladas sufren una modificación por enzimas modificadoras en el nucleótido U de la posición bamboleante. De no existir esta modificación, entonces, los cuatro codones, especificarían a sólo un aminoácido, lo que llevaría a una descodificación. Pero, ¿Cuál es el papel de las codasas en este mecanismo? La respuesta se encuentra en que se cree que la enzima funge como un filtro, en el que una vez modificado y aminoacilado el tRNA por las enzimas modificadoras (o la misma codasa) se evita una mala lectura del aminoácido en el ribosoma [135].

## CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se ha hecho hincapié en la importancia que reviste el conocer las codasas, con el propósito de obtener una mayor comprensión de su participación en los albores mismos de la vida.

Lamentablemente no existe ninguna evidencia clara que permita integrarlas dentro del grupo de las primeras moléculas con función catalítica. No obstante, la posibilidad no está del todo excluida.

Los intentos tratando de entender el origen de las enzimas han sido limitados y poco fructíferos. El problema, a mi juicio, no radica en los escasos conocimientos alcanzados sobre su naturaleza, ya que si bien es cierto su complejidad es sorprendente, no necesariamente implica que esta se halla presentado en un principio. Seguramente las características estructurales y funcionales iniciales fueron distintas en las primeras enzimas biológicas

La importancia de lograr sintetizar moléculas funcionalmente equivalentes a las actuales en condiciones abióticas no tienen como objetivo central averiguar si las proteínas antecedieron o no a los ácidos nucleicos. La empresa a seguir es mucho más ambiciosa y pretende, entre otros objetivos, el de explicar la dinámica de los mecanismos que condujeron a la serie de reacciones químicas conjugadas para que se constituyeran como el

primer metabolismo, función que en si mismo le confiere a los organismos el carácter de "vivos".

El tratar el tema del metabolismo biológico requerirfa de un escrito particular ya que su complejidad es extrema. Sin embargo, algunas ideas ya se han considerado [1,133,136,137,138,139].

Mucho se ha hablado de la participación de los diversos agentes catalfticos precursores tales como los iones metálicos, sales de fierro, nucleótidos o agentes arcillosos [10,133,136,140,141,142,143,144,146,147,148,149] en reacciones químicas prebióticas. Las investigaciones han sido tan numerosas que hoy día es un aspecto fuera de controversia y aceptado por la comunidad científica.

En ocasiones su actividad es notoriamente clara. Sin embargo, este hecho no es suficiente para que puedan ser catalogadas como estructuras enzimáticas. Para que una enzima pueda ser considerada como tal se requiere además que realice una función catalftica específica y un carácter polimolecular particular.

Asombrosamente ambas propiedades han sido identificadas en polirribonucleótidos de organismos contemporáneos [150,151].

Los estudios en biología molecular, en especial del mRNA, han despertado un enorme interés dadas sus características informacionales y catalfticas, lo que las hace constituirse dentro del grupo de los primeros catalizadores biológicos [10].

Fox [152] ha reportado ya algunas actividades enzimáticas en las estructuras que ha denominado como proteínoides. Lo sobresaliente es que las aptitudes catalíticas de que están dotadas se asemejan en mucho a las enzimas procedentes de organismos. Por ello a estos proteínoides se les ha nombrado también protoenzimas [133].

La formación de proteínoides en condiciones abióticas se sintetizan bajo el principio que el autor ha designado como autosecuenciación (self-ordering) [152,153], nombrados por Calvin como control por el extremo creciente (growing-end-control) [140].

Según este principio, la secuencia del proteínoides se va conformando de acuerdo a las propiedades químicas de cada aminoácido que se incorpora al polipéptido (proteínoides). La frecuencia de adición del nuevo aminoácido dependerá de la afinidad química que exista con el último aminoácido adicionado a la secuencia (polímero).

En la tabla 11 se expresan algunos valores de la velocidad de reacción para proteínoides, que en comparación al de las enzimas de organismos contemporáneos resultan ser bajos.

Tabla 11 (153)

Resultados de Varias Actividades Catalíticas de Proteínoides

SUSTRATO	AUTORES	AA ACTIVO EN POLÍMEROS	ACTIVIDAD (max) moles $\mu\text{g}^{-1}$ min <sup>-1</sup>	OTROS RESULTADOS Y COMENTARIOS
<b>Aminación y deaminación</b>				
Ac. Cetoglutarico con urea y donadores $\text{NH}_2$ similares	Kraepitz et al (1967)	Lisina, y otros AA básicos	2x10 (hr-día)	Requiere $\text{Cu}^{++}$ , agentes reductores 70% L y 70% D- Glu (mediante proteínoides rico en Lisina).
	Kraepitz et al (1968b)	proteínoides neutral y ácidos no son activos.		Inactivo con polianhidrolisina derivado de anhidrido de Leuch. Cinética de Michaelis-Menten. Inactivación en la acilación. No se inactiva por calor.
Ac. pirúvico, fenilpirúvico y oxaloacético + donadores $\text{NH}_2$	Kraepitz (1968)		(hr) <sup>b</sup>	
Acido glutámico	Kraepitz et al (1968a)		(hr) <sup>b</sup>	Requerimientos de $\text{Cu}^{++}$ , agentes oxidantes (?). Estrictamente catalíticos (?). Aparente reacción de transaminación
Acido cetoglutarico				
<b>Resumen de las propiedades catalíticas y de peroxidasa de los hemoproteínoides.</b>				
$\text{H}_2\text{O}_2$ (reacción catalítica)	Dose y Zaki (1971)	Fen es inhibitorio	1 (sec-min)	50% menos efectivo que la hematina libre. Cinética de pseudo primer orden Michaelis-Menten. Inhibido por agentes complejos.
$\text{H}_2\text{O}_2$ y donadores de H	Dose y Zaki (1971)	Lis y otros AA básicos cooperan con biproducidos tóxicos. Aspirina es inhibitorio	0.2 por guaiacol 2.2 por NAD (se gundo)	50 veces mas efectivo que la hematina (guaiacol como sustrato). Inhibido por agentes complejos. Después de calentar existe un incremento del 100% de actividad. Hematina calentada con Leuch poli-lis solo tiene actividad como hematina libre. Cinética de pseudo primer orden de Michaelis-Menten.

CONTINUA TABLA 11				
SUSTRATO	AUTOR	AA ACTIVO EN POLIMEROS	ACTIVIDAD (aa) ( $\mu$ moles $mg^{-1}$ min)	OTROS RESULTADOS Y COMENTARIOS
Reacciones de hidrólisis				
p-Nitrofenilacetato	Noguchi y Saito (1962)			
	Rohlfing y Fox (1967)	His, Lis, Asp- <i>in</i> ida	(min-hr) <sup>a</sup>	de 1 a 10 veces mas activo que la his. libre. Inactivación por calor. Cinética de Michaelis-Menten.
	Usdin et al (1967)	Glu, Asp, Lis, His, Ser Thr	$1.5 \times 10^{-3}$ (min-hr)	(Ourotripsina: $3 \times 10^{-3}$ $\mu$ moles $mg^{-1}$ min <sup>-1</sup> ). Inhibición con DFB (reversible).
p-Nitrofenil fosfato	Oshima (1968)	His y otros AA basicos y neutros cooperativos con Asp- <i>in</i> ida	$2 \times 10^{-3}$ (hr-dia)	AA libres son inactivos. Inhibición con arseniato, Cu <sup>++</sup> . Pronasa al 10% degrada, al 30% inhibe. Inhibición con calor. Cinética de Michaelis-Menten.
ATP	Fox y Joseph (1965)			
	Durant y Fox (1966)		Favorable en Zn <sup>++</sup>	Zn <sup>++</sup> activo en microesferulas. Promoción de Zn <sup>++</sup> conduce a la formación de proteínoides abundantes en Lis.
	Tetas y Lowenstein (1963)	No hay polia.	(hr-dias)	Zn <sup>++</sup> tan activo como el Zn-proteínide de microesferulas.
Descarboxilación				
Glucosa o ácido glucurónico	Fox y Kraapitz (1964)	Lis	Solo se determino CO (Tiempo de reaccion: hr-dias)	Condiciones anaerobias. ATP estimula la formación de 2 pliegues. Oxidación de glucosa no es catalitica. Sustrato con porcentaje alto en polimeros. Estrictamente catalitico. No presentan cinética de Michaelis-Menten.
	Kraapitz y Hardebeck (1967)	Glu, Thr	Solo se determino $^{14}CO_2$ (Tiempo de reaccion: hr-dias)	La actividad declina con el tiempo de reaccion. Estrictamente catalitico. El calor disminuye la actividad. Ac. oxaloacético no es descarboxilado.
Acido pirúvico	Hardebeck et al (1968)	Inhibición de Ile		
HO-C-C-CH <sub>2</sub> -C-OH	Rohlfing (1967)	Lis	0.3 mole $mg^{-1}$ min <sup>-1</sup> (min-hr)	Cinética de pseudo primer orden. Pol lisina térmico es 10 veces mas activa que Lisina libre (Enzimas 30 moles $mg^{-1}$ min <sup>-1</sup> ). No se determinó la descarboxilación de Ac. pirúvico, malónico, cetoglutárico, gluconico, oxálico y aspártico.
Ac. pirúvico, glicólico, glucurónico	Weber et al (1968)	Pigmento amarillo	Reacción fotosensible (hr-dias)	Superior a 80 veces la velocidad de reaccion de fase oscura.

a = (min-hr) o (hr-dias) indica la duración del experimento.  
b = Tiempo de reacción.



Funcionalmente los proteinoides son muy semejantes a las enzimas, pero, estructuralmente no se configuran del mismo modo. En ninguno se ha detectado la conformación de hélice [153], característica que en la mayoría de las enzimas, constituye un elemento esencial para la formación del centro catalítico activo.

Leslie Orgel [154], investigador en Salk Institute, California, ha tratado de reconstruir parte de la química prebiótica que más interesa a los biólogos moleculares, la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos. De acuerdo con Orgel el código primitivo probablemente posea dos clases de tRNAs. Una clase de ellos portaba aminoácidos hidrofílicos y tenía como base central del anticodón a una base pirimídica. La otra clase aceptaba aminoácidos hidrófobos y en la base central del anticodón presentaba una purina.

Si asumimos que la lectura del codon es más precisa en la segunda posición, entonces, la traducción de la secuencia alternada de RNAs deberá producir un polipéptido alternado. La estructura beta plegada de las proteínas conocidas parecen seguir una formación alternada de aminoácidos hidrófobos e hidrófilos [155].

Siguiendo esta hipótesis Orgel y Brack han hecho un análisis comparativo de los sitios activos en proteínas en donde se revela que la interacción de estructuras betas conforman sitios catalíticos activos para la unión del sustrato en una gran cantidad de enzimas [156].

Sin embargo, aparte de los estudios realizados por S. Fox y colaboradores, la línea de investigaciones sobre el origen prebiótico de las enzimas se ha visto poco explorada.

En cuanto a lo que respecta al tema central de la presente tesis, es decir, algunas consideraciones sobre el origen de las aminoacil-tRNA sintetasas (codasas), resultaría bastante arriesgado y seguramente especulativo dado los escasos trabajos elaborados, dar un esquema de la serie de eventos y condiciones que propiciaron su formación.

Desde hace ya varios años Cairn-Smith ha intentado ampliar la escala de estudio del origen de la vida, adicionando para ello un primer nivel dentro de la evolución química. Este nivel representa para el autor un tipo de origen el cual según asevera, debió estar constituido esencialmente por minerales, seguido por una etapa ulterior de "organismos" minerales con la capacidad para realizar reacciones bio-orgánicas importantes que finalmente dieron lugar al establecimiento de los orígenes de la bioquímica que se conoce en los seres vivos contemporáneos [157,158].

La sugerencia de Cairn-Smith se ha discutido y en realidad hasta el momento ha sido poco explorada. Sin embargo, abre la posibilidad de estudio a interesantes y sobresalientes propiedades de ciertos minerales, en especial de las arcillas.

Investigaciones minuciosas de las variadas estructuras minerales permitirían, quizá, revelar una funcionalidad tan

compleja como la que ejecutan las codasas.

Una forma de conocer más sobre su origen sería el determinar la secuencia de aminoácidos del sitio activo de dicha enzima para que partiendo de dicha información se compare con las estructuras catalíticas de los proteínoides obtenidos. Si los resultados muestran una similitud funcional, el paso a seguir podría ser tratar de sintetizar al proteínoides. De esta manera se podría verificar si los proteínoides cumplen con las propiedades catalíticas específicas de las codasas.

De no presentarse alguna semejanza, podemos extrapolar los nuevos conocimientos de las codasas adquiridas de su función y estructura al diseño de modelos experimentales. Esto es, conociendo la secuencia de aminoácidos de los sitios activos de las codasas podemos deducir la secuencia genética que la codifica. Dependiendo de la naturaleza de dicha secuencia nucleotídica se establecen condiciones muy estrictas de simulación prebiológica para simular la codificación de tales sitios activos bajo esas condiciones.

Cabe aclarar que para desarrollar esta clase de investigaciones será necesario antes que nada, conocer perfectamente la naturaleza de las codasas estudiadas no sólo para un organismo sino de un grupo de ellos que se encuentren emparentados filogenéticamente. En este caso los candidatos más apropiados de estudiar serían las Archaeobacterias. El estudio comparativo de las codasas en estos organismos considerados evolutivamente entre los más antiguos aportaría al igual que en

el caso de las RNAs polimerasas [10] valiosa información no sólo en el estudio del origen del código genético sino también de las codasas.

Otra posibilidad propuesta anteriormente [162] es la de sintetizar polipéptidos abióticamente y, a través de la adición de grupos activos, producir modificaciones en la conformación estructural. La ventaja en la aplicación de este método estriba en que las modificaciones pueden producirse en cualesquiera de los grupos de la molécula que el investigador crea conveniente para inducir la catálisis deseada.

Así pues, las ideas y sugerencias que se pueden elaborar respecto a la formación abiótica de estructuras funcionalmente análogas a las codasas pueden ser variados y de muy distinta índole. Sin embargo, no se obtendrá ningún beneficio de ellas a menos que las sugerencias se puedan verificar por medio de la experimentación.

La sorprendente complejidad de que son portadoras las codasas las hace constituirse como un grupo de moléculas surgidas en un estadio posterior a la evolución química [19, 78, 80, 110, 119, 129, 163, 165, 166, 167, 168, 169].

Aunque dicha deducción esta formulada en base a los conocimientos que se tienen hoy en día sobre su naturaleza no excluye de ninguna manera la posibilidad de algún otro agente capaz de realizar su función en condiciones primigenias, a pesar de que tales estructuras difícilmente se

hubieran preservado.

A lo largo de este escrito nos hemos podido dar cuenta de la existencia de ciertas evidencias vestigiales del probable pasado común de las codasas. Entre algunas de estas evidencias mencionaré las siguientes: la similitud en unidades y peso molecular de las codasas de B. Stereothermophilus y E. coli, la preferencia de aminoacilación ya sea por el extremo 2' o 3' de la ribosa en el extremo terminal 3' del tRNA; la presencia de Zinc en algunas subunidades purificadas; homologías en posiciones de aminoácidos con capacidad catalítica, como la histidina y cisteína, etc. Todo ello nos permite colocar a las codasas dentro del grupo de las primeras enzimas de carácter biológico y respaldar al modelo Replicación, Traducción, Transcripción [10], el cual parte de un sistema biopoyético constituido por moléculas de RNA catalítico, así como de otras moléculas químicas de naturaleza prebiótica embebidas en estructuras lipídicas. La presión de selección en tales sistemas condujo a su eficiencia y al origen monofilético de mecanismos como la traducción (con la formación biológica de enzimas ancestrales como la RNA polimerasa, DNA polimerasa y como hemos visto de las aminoacil-tRNA sintetasas) y la transcripción con la participación de ADN en doble cadena y de mRNA y proteínas.

El interés difundido en torno al origen de la vida se ha propagado notoriamente con el desarrollo alcanzado por las diferentes disciplinas científicas. Una prueba de lo anterior es el estudio de las codasas para lograr una mayor comprensión del mecanismo de codificación genética.

La información recopilada hasta hoy acerca de su naturaleza resulta sólo asequible para establecer ideas opacas y sugerencias vagas sobre su función y origen.

Si bien es cierto que en los últimos 30 años mucho se ha avanzado tanto en el terreno del origen de la vida como de la biología molecular, dicho progreso no ha sido suficiente aún y mucho más habrá que hacerse en tales áreas para dar explicaciones lógicas y coherentes de los probables mecanismos que propiciaron el origen de la vida en la tierra.

No hay duda que el estudio de las codasas constituye uno de los innumerables desafíos a enfrentar por la biología molecular contemporánea.

## REFERENCIAS

1. Aullet, G. 1979, Conocimientos Científicos Actuales Sobre el Origen de la Vida. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
2. Olea, A.F. La Primera Teoría Evolutiva Sobre el Origen de la Vida; Un Intento de Análisis Histórico. Boletín de Difusión, No 6, Depto de Física, Fac. de Ciencias. UNAM. pp.16-24.
3. Mayr, E. 1982, The Growth of Biological Thought. Harvard University Press. C. Massachusetts.
4. Schopf, J.W. 1983, Earths Earliest Biosphere: Its Origen and Evolution. Princeton University Press.
5. Artis, M. et. al. (eds). 1983, Homenaje a Oparin. UAM-I, Mex.
6. Rubey, W.W. 1955, Geol. Soc. Am. 62.
7. Abelson, P. 1966, Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 1365.
8. Garrison, W.H. et. al. 1951, Science. 144, 416.
9. Paschke, H. et. al. 1957, Science. 125, 881.
10. Lazcano, A. et. al. 1986, Origen de la Vida i Evolució de la Cel.lula Treballs de la Societat Catalana de Biologia.
11. Karlson, P. 1969, Probleme der Eiwerts-Biosynthese. Ideen d. Exakt. wiss.
12. Lipmann, F. 1941, Adv. Enzymol. 1, 99.
13. Frantz, I. et. al. 1947, Science. 106, 544-545.
14. Frantz, I. et. al. 1948, J. Biol. Chem. 174, 773-774.
15. Topking, A. et. al. J. Am. Chem. Soc. 69, 2769-2777.
16. Lipmann, F. 1954, Science. 120, 855.
17. Lynen, F. et. al. 1951, Ann. Chem. Soc. 574, 1.
18. Allende, J. 1977, Biosíntesis de Proteínas y el Código Genético. D. E. A.
19. Schimmel, P.R. and D. Soll. 1979, Ann. Rev. Biochem. 48, 601-648.
20. Wetzel, R. 1973, Origen of Life. 9, 39-50. 648.
21. Joachimiak, A. and J. Barciszewski. 1980, FEBS LETTERS. 119, 201-211.
22. Kalousek, F. and W. Konigsberg. 1975, Biochemistry Serie One, Vol 7. Ed. Butterworths, London. 57-88.
23. Heider, H. et. al. 1973, Eur. J. Biochem. 209, 144.
24. DeLorenzo, E. et. al. 1970, J. Biol. Chem. 245, 1710.
25. Kalousek, I and Konigsberg, W. 1974, Biochemistry. 13, 299.
26. Söll, D. and P.R. Schimmel. 1974, The Enzymes. 12, 489.
27. Wilcox, M et. al. 1969, Eur. J. Biochem. 11, 405.
28. Gross, R.S. et. al. 1968, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 253.27.
29. Roberts, W.K. and W.H. Colleman. 1972, Biochem, Biophys. Res. Commun. 46, 206.
30. Walker, E.J. et. al. 1983, Biochemistry. 22, 1934-1941.
31. Beauchamp, P.M. et. al. 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1172-1176.
32. Swamy, G.S. and D.T.N. Pillay. 1982, Plant. Sci. Lett. 25, 73-84.
33. Deutscher, M.P. 1967, J. Biol. Chem. 242, 1123-1131.

34. Dang, Ch. and D.C.H. Yang. 1982, *Int. J. Biochem.* 14, 539-543.
35. Mirande, M. et.al. 1983, *Biochim. Biophys. Acta.* 747, 71-77.
36. Dang, Ch. V. et.al. 1982, *FEBS LETTERS.* 142, 1-6.
37. Norton, S.J. 1965, *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 7-12.
38. Ussery, M.A. et.al. 1977, *Eur. J. Biochem.* 72, 491-500.
39. Mirande, M. et.al. 1982, *J. Biol. Chem.* 257, 11056-11063.
40. Dickman, S.R. and D.J. Roll. 1977, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 1191-1197.
41. Pann, F. 1976, *Biochim. Biophys. Acta.* 452, 277-283.
42. Dietrich, A. et.al. 1978, *Biochim. Biophys. Acta.* 521, 597-605.
43. Zaccaf, G. et.al. 1979, *J. Molec. Biol.* 129, 483-500.
44. Dang, Ch. and D.C.H. Yang. 1984, *Moll and Cell. Biochem.* 63, 134-136.
45. Kellermann, D. et.al. 1982, *J. Biol. Chem.* 257, 11041-11048.
46. Dang, Ch. and D.C.H. Yang. 1979, *J. Biol. Chem.* 254, 5350-5356.
47. Mirande, M. et.al. 1982, *J. Biol. Chem.* 257, 11049-11055.
48. Lapointe, Jacques. 1982, *Can. J. Biochem.* 60, 471-474.
49. Stern, R. and M. Peterkesky. 1969, *Biochemistry.* 8, 4346.
50. Chlumeka, V. et.al. 1969, *J. Biol. Chem.* 254, 5481.
51. Blow, M.D. et. al. 1983, *J. Molec. Biol.* 171, 571-576.
52. Barker, D.G. and G. Winter. 1982, *FEBS LETTERS.* 145, 191-193.
53. Kula, M.R. 1973, *FEBS LETTERS.* 355, 299.
54. Kock G.L. et.al. 1974, *Nature.* 249, 316.
55. Waterson, R.M. and W.H. Konigsberg. 1974, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 376.
56. Robbe-Saul, S. et.al. 1977, *FEBS. LETTERS.* 94, 57-62.
57. Bruton, C. et.al. 1974, *FEBS. LETTERS.* 45, 26-28.
58. Kern, D. et.al. 1979, *J. Biol. Chem.* 254, 518-524.
59. Holler, E. and M. Calvin. 1972, *Biochemistry.* 11, 3741.
60. Kern, D. and J. Lapointe. 1980, *J. Biol. Chem.* 255, 1956-1961.
61. Pannet, A. et.al. 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72, 2535.
62. Simpson, D.R. et.al. 1975, *Fed. Proc.* 34, 586.
63. Schilesinger S. et.al. 1964, *J. Mol. Biol.* 9, 670-682.
64. Roberts, R. 1972, *Nature New Biol.* 237, 44-45.
65. Peterson, N. et.al. 1973, *J. Neurochem.* 21, 97.
66. Sirlin, J. 1972, Biology of RNA. Academic. Press. N.Y. citado por [9].
67. Kern, D. et.al. 1980, *Biochim. Biophys. Acta.* 607, 65-80.
68. Kondo, M. and C. Woese. 1969, *Biochemistry.* 8, 4177.
69. Lotfield, R.B. 1971, In: Protein Synthesis. E.M. McConkey, (ed) Marcel Dekker, N.Y. pp. 1-68.
70. Ferscht, A. 1977, Enzyme Estructure and Mechanism. Freeman Co. San Francisco.
71. Lewin, B. 1983, Genes. Johonn Wiley and Sons. N.Y.
72. Fowden, L. et.al. 1968, Recent Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants, Hewit and Cutling eds. Academic Press.
73. Hecht, S.M. 1977, *Tetrahedron.* 33, 1671.
74. Fraser, T. and Rich, A. 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*



- 72, 3044-3048.
75. Sprinzl, M. and Cramer, F. 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 3049-3053.
  76. Hecht, S and Chinahult, A. 1976. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 405-409.
  77. Julius, D. et.al. 1979, Biochemistry. 18, 604-609.
  78. Chinahult, A. et.al. 1977, Biochem. 16, 766-776.
  79. Dillon, Lawrence. 1978, The Genetic Mechanism and the Origin of Life. Plenum Press. pp. 563
  80. Rich, A. and U. Rajbhandary. 1976, Ann.Rev. Biochem. 46, 806-852.
  81. Schulman, L. y H. Perka. 1971, Biochemistry. 16, 4256-4265.
  82. Thiebe, R. et.al. 1972, Eur.J.Biochem. 26, 144-149.
  83. Mirazabekov, A. et.al. 1971, Nature New Biol. 220, 21-22.
  84. Williams, R. et.al. 1974, Biochem. Biophysc. Res. Comm. 60, 1215-1220.
  85. Crother, M. et al. 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 69, 3063-3065.
  86. Schwartz, R. et.al 1976, Atlas of Protein Sequence and Structure vol. 27, 271.
  87. Dudock, B. et.al. 1973, Biochem. 12, 41-46.
  88. Roy, Harold. 1977, Eur. J. Biochem. 53, 115-127.
  89. Vlassov, V. et.al. 1983, Eur. J. Biochem. 132, 537-544.
  90. McCutchan. et.al. 1978. Biochem. 17, 1622-1628.
  91. Riggs, R. 1970, J. Mol. Biol. 53, 401-417.
  92. Ebel, J. et.al. 1973, Biochemie. 55, 547-557.
  93. Mayaux, J. et.al. Biochem. 20, 46-47.
  94. Degtyarév, Kh. 1983, FEBS LETTERS. 154, 293-296.
  95. Elseviers, D. et.al. 1982, J. Bacteriology. 152, 357-362.
  96. Nowak, T. et.al. 1983, Arch. Biochim. and Biophys. 255, 722-730.
  97. Gabius, H. et al. 1983, Eur. J. Biochem. 131, 231-234.
  98. Barthkowiak, S. and M. Poniatowska. 1983, Phytochemistry. 22, 413-417.
  99. Hecher, M. and H. Muller. 1974, Biochem. Physiol. 165, 419.
  100. Dounce, A.L. 1952, Enzymologia. 15, 251-258.
  101. Woese, C.R. 1967, The Genetic Code. Harper and Row. N.Y.
  102. Nirenberg, M. and Matthaei, H. 1961. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 1588.
  103. Fitch, W.M. 1973, Ann. Rev. Genetics. 7, 343.
  104. Pelec, S.R. and M.G. Welton. 1966, Nature. 209, 868-870.
  105. Dunnill, P. 1966, Nature. 260, 1267-1268.
  106. Egami, F. 1980, In; Origin of Life Proceeding of the Third ISSOL MEETING and de sixth ICOL meeting, Jerusalem, ed. by Yechezkel Wolman. Boston.
  107. Thomas, B.R. 1970, Biochem. Biophysc. Res. Comm. 40, 1289-1296.
  108. Weber, A.L. and J.C. Lacey Jr. 1975, Origins of Life. 6, 273-283.
  109. Weber, A.L. and J.C. Lacey Jr. 1978, J. Mol. Evol. 5, 57.
  110. Jungk, R. 1978, J. Mol. Biol. 11, 211-224.
  111. Balasubramanian, N.P. et al. 1980, Origins of Life. 10, 15-30.
  112. Bull, H.B. and K. Breese. 1974, Arch. Biochem. Biophys. 161, 665.

113. Brack, A. and L. Orgel. 1975, *Nature*. 256, 383.
114. Toulme, J. 1978, *Bioinorg. Chem.* 8, 319.
115. Razka, M. and M. Mandel. 1971, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56, 1325.
116. Reuben, J. and F. Pork. 1980, *J. Mol. Evol.* 15, 103.
117. Lacey, J.C. Jr. and D.W. Mullins. 1983, *Origins of Life*. 13, 1-43.
118. Saxinger, C. and C. Ponnampereuma. 1974, *Origins of Life*. 5, 184-200.
119. Kuhn, H. and K. Christopher. 1978, *Origins of Life*. 9, 137-150.
120. Ishigami, M. et. al. 1984, *Origins of Life*, 14, 605-612.
121. Wilburg, W.J. 1985-85, *J. Mol. Evol.* 21, 169-191.
122. Mosqueira, F.G. 1979, *Biocystems*. 11, 233-242.
123. Lormann, R. et.al. 1975, *J. Mol. Evol.* 5, 57.
124. Ratner, V.A. and A. Batchinsky. 1976, *Origins of Life*. 7, 225-228.
125. Eigen, M. 1984, In: Aspects of Chemical Evolution, ed, G. Nicolis. Wiley and Sons. p 119.
126. Eigen, M. et. al. 1981, *Scientific American* (April), 78-94.
127. Eigen, M. and P. Schuster. 1978, *Naturwissenschaften*. 65, 341-369.
128. Hartmann, H. 1984, *Origins of Life*. 14, 641-648.
129. Hartmann, H. 1978, *Origins of Life*. 9, 133-136.
130. Labougues, J.M. and A. Figureau. 1984, *Origin of life*. 14, 685-692.
131. Ishigami, M. 1980, In; Origin of Life: Proceedings of the Third ISSOL MEETING and the Sixth ICOL meeting, Jerusalem. ed. by Yechezkel Wolman. Boston.
132. Labougues, J.M. and A. Figureau. 1980, In; Origin of Life Proceeding of the Third ISSOL MEETING and Sixth ICOL meeting, Jerusalem. ed. by Yechezkel Wolman. Boston.
133. Kaplan, W.R. 1982, El Origen de la Vida. ed. Alhambra, Madrid Esp. 405 p.
134. Lestienne, P. 1984, *Origins of Life*. 14, 629-634.
135. Ryazanov, A.G. 1984, *FEBS LETTERS*. 179, 6-9.
136. Oparin, A.I. 1981, El Origen y la Evolución de la Vida. ed. Cartago, Méx.
137. Fox, S. and K. Dose. 1974, The Origin of Life and Evolutionary Biochemistry. ed. K. Dose y S. Fox. G.A. Deborin and T.E. Pavlovskaya. Plenum. N.Y.
138. Eakin, R. E. 1963, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 49, 30-36.
139. Ycas, M. 1974, *Theor. Biol.* 44, 145-160.
140. Calvin, M. 1969, Chemical Evolution, Oxford, University. Press.
141. Lohrmann, R. and Orgel, L. 1980, *J. Mol. Biol.* 142, 555.
142. Joyce, J.F. et.al. 1984, *J. Mol. Biol.* 176, 279.
143. Oparin, A.I. 1979, El Origen de la Vida Sobre la Tierra. ed. Ténos, Madrid España.
144. Calvin, M. 1975, *Am. Scient.* 63, 169-177.
145. Oparin, A.I. 1965, *Adv. Enzymol.* 347-379.
146. White, B.E. 1976, *J. Mol. Biol.* 7, 101-104.
147. Brewin, N. 1972, *Nature. New Biol.* 236, 101.

148. Horowitz, P. et.al. 1970, *Nature*. 228, 636.
149. Horowitz, P. 1980. In; Origin of Life Proceeding of the Third ISSDL meeting and the Sixth ICOL meeting, Jerusalem. ed. Yechezkel Wolman, Boston.
150. Zaug, A. et.al. 1986, *Science*. 231, 470-474.
151. Guerrier-Takada and Altman, S. 1984, *Science*. 223, 285.
152. Fox, S. and Dose, K. 1972, Molecular Evolution and the Origin of Life, ed. Marcel Daker, N.Y.
153. Dose, K. 1976, In: Protein Structure and Evolution. ed. Lawrence Fox and Zdenek Deyl. Anton Blzej. Marcel Dekker, Inc. N.Y.
154. Orgel, L. 1970, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1476.
155. Tang, J. et.al. 1978, *Nature*. 271, 618-621
156. Brack, A. and L. Orgel. 1975, *Nature*. 256, 386-387.
157. Cairn-Smith, A.G. 1966, *Jour. Theor. Biol.* 10, 53-86.
158. Cairn-Smith, A.G. 1982, Genetic Take-over. Cambridge, University Press.
159. Dose, K and L.Zaki. 1971, In; Chemical Evolution and the Origin of Life, North Holland, Amsterdam.
160. Oshima, T. 1962, *Arch. Biochem.* 126, 478-485.
161. Uslin, V. et.al. 1968, *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 258.
162. Ninio, J. 1983, Molecular Approaches to Evolution. Princeton, University Press.
163. Mullins, D.W. et.al. 1984, *Origins of Life*. 14, 597-604.
164. Lhemann, U. 1985, *Bio Systems*. 17, 193.
165. Mackinlay, A.G. 1982, *Origins of Life*. 12, 55-69.
166. Tyagi, S. 1981, *Origins of Life*. 11, 343-351.
167. Lohrmann, R.B. et.al. 1980, *Science*. 208, 1464.
168. Poder, S.K. and H.S. Basu. 1984, *Origins of Life*. 14, 477-484.
169. Lehmann, U and H. Kunn. 1984. *Origins of Life*. 14, 497-504.
170. Cech, T.R. 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 4360-4363.
171. Margulis, L. 1981, Symbiosis in Cell Evolution. Freeman Co. San Francisco.