

(11) *Número de Publicação:* **PT 89611 B**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

C12N009/10 A

C12N015/00 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) *Data de depósito:* 1989.02.03

(30) *Prioridade:* 1988.02.08 US 153361
1988.12.14 US 284344

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.10.04

(45) *Data e BPI da concessão:*
11/93 1993.11.26

(73) *Titular(es):*

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
FRUIT STREET BOSTON MASSACHUSETTS 02114
US

(72) *Inventor(es):*

JOHN A. SMITH US
FANG-JEN S. LEE US

(74) *Mandatário(s):*

JORGE BARBOSA PEREIRA DA CRUZ
RUA DE VITOR CORDON 10-A 3/AND. 1200 LISBOA
PT

(54) *Epígrafe:* MÉTODO PARA O ISOLAMENTO PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAÇÃO DE N ALFA-ACETILTRANSFERASE

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 89 611

REQUERENTE: THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION, norte-americana, com sede em Fruit Street, Boston , Massachusetts 02114, Estados Unidos da América do Norte.

EPÍGRAFE: " MÉTODO PARA O ISOLAMENTO PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE N^o - ACETILTRANSFERASE ".

INVENTORES: John A. Smith e Fang-Jen S. Lee.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. Estados Unidos da América do Norte, em 8 de Fevereiro de 1988, sob o nº. 153,361 e em 14 de Dezembro de 1988, sob o nº. 284,344.

MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

Este invento é dirigido a um método para a purificação N^α-acetiltransferase com um peso molecular de cerca de 180 000 daltons, sendo a referida N^α-acetiltransferase composta por duas subunidades peptídicas tendo pesos

=====

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

"METODO PARA O ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAÇÃO DE N^α-ACETILTRANSFERASE"

moleculares de cerca de 95 000 cada, possuindo actividade enzimática superior a 100 em que uma unidade de actividade é definida como 1 pmole de resíduos acetilo incorporados na hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) nas condições de ensaio padrão.

O método para a purificação de N^{α} -acetiltransferase consiste em se recuperar N^{α} -acetiltransferase bruta a partir de uma amostra que a contem, se submeter a referida N^{α} -acetiltransferase bruta a cromatografia de permuta iónica, se submeter as fracções adequadas a cromatografia de absorção com hidroxiapatite, e se purificar a N^{α} -acetiltransferase parcialmente purificada por cromatografia de afinidade, seguida de eluição do produto desejado.

Titulo do Invento

Isolamento, purificação, caracterização
clonagem e sequenciação de N^a-acetil-
transferase

Referência a pedidos de patente relacionados:

Este pedido é uma continuação em parte de um pedido da Patente dos Estados Unidos Nº. 153.361, entregue em 8 de Fevereiro, 1988, o conteúdo da qual é aqui totalmente incluído como referência.

Campo do Invento

O invento é dirigido ao isolamento, purificação, caracterização, clonagem e sequenciação de N^a-acetiltransferase e à própria enzima.

Fundamento do Invento

Em 1958 (Warita, K., Biochim Biophys Acta 28:184-191 (1958)) foi descoberto um grupo acetilo como grupo amino-terminal bloqueador de proteína de cápside viral e do peptídeo hormonal em 1959 (Harris J.I., Biochem.J. 71: 451-459 (1959)). Desde então observou-se que um grande número de proteínas em vários organismos possui resíduos amino-terminais acetilados. Por exemplo, as células L de murganho e as células Ehrlich de ascites têm cerca de 80% das suas proteínas solúveis intracelulares N^a-acetiladas (Brown. J.I. e Roberts, W.K., J. Biol Chem 251: 1009 (1976) e Brown, J.L. J. Biol Chem 254: 1447 (1979)). Nos organismos eucariotas inferiores cerca de 50% das proteínas solúveis são acetiladas (Brown. J.L. Int'l Congr. Biochem. Abstr. (Internation Union Biochemistry, Canada) Vol.

11:90 (1979)). Estes resultados demonstram que N^α-acetilo é um grupo bloqueador importante. Foi sugerido que a função biológica deste grupo bloqueador pode ser proteger o catabolismo prematuro das proteínas (Jornvall, H. J. Theor. Biol. 55:1-22 (1975)) e a degradação proteolítica das proteínas (Rubenstein, P. e Beuchler, J. Biol.Chem 254: 11142 (1979)). No entanto, nas células L de murganho tal N^α-acetilação não tem aparentemente esta função biológica (Brown, J, L., J. Biol. Chem. 254:1447 (1979)).

Apesar de não ter sido estabelecida com certeza uma função geral clara para a N-acetilação, têm sido observados alguns efeitos específicos para um pequeno número de proteínas. A glutamato-desidrogenase específica de NADP não acetilada num mutante de Neurospora crassa é instável ao calor, ao contrário da forma acetilada (Siddig et al., J.Mol. Biol. 137:125 (1980)). Um mutante de Escherichia coli, em que a proteína ribossomal S5 não é acetilada apresenta termosensibilidade (Lumberlidge, A.G. e Isono, K., J.Mol.Biol 131:169 (1979)). A N^α-acetilação de dois dos produtos a partir da proteína precursora proopiomelanocortina tem um efeito regulador profundo na activação biológica destes polipeptídeos; a actividade opióide da B-endorfina é completamente suprimida, enquanto que o efeito melanotrófico de -MSH é aumentado se fôr N^α-acetilado (Smyth et al., Nature 279: 252 (1970); Smyth, D. G. e Zakarian, S., Nature 288:613 (1980); e Ramachandram, J. e Li. L.H., Ado. Enzymol 29:391 (1967)). Tanto a activa citoplasmática acetilada como a não acetilada de célula de Drosophila em cultura participam na montagem dos microfilamentos, no entanto a última com menos eficácia (Berger et al., Biochem. Geneti 19 321 (1981)). Mais recentemente, a velocidade de reciclagem de proteínas mediada pelo sistema de degradação dependente da ubiquitina observou-se depender da presença de um grupo L-NH₂ livre no extremo N de uma proteína (Hershko et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 81:9021-9025 (1984) e Bachmair et al.,

Science 234: 179-186 (1986), sugerindo que a N^α-acetilação pode ter um papel no impedimento da reciclagem da proteína.

Dada a importância da N-acetilação para a função e capacidade destas proteínas N-acetiladas para modular o metabolismo celular, será interessante examinar a localização subcelular, especificidade do substrato e regulação da proteína acetiltransferase. No sentido de classificar as implicações biológicas da N-acetilação e elucidar o mecanismo enzimático da reação, como primeiro passo, deve ser isolada uma enzima capaz de catalisar a acetilação amino-terminal para se investigar a sua especificidade de substrato. A existência de tal acetiltransferase tem sido demonstrada e estudada em *E.coli* para a proteína ribossomal L12 (Brot et al. Arch. Biochem Biophys. 155:475 (1973)) em fígado de rato (Pastana, A. e Pitot, H.C. Biochemistry 14:1404 (1975); Green et al., Lan. J. Biochem. 56: 1075 (1978)); e Pestana, A. e Pitot, H.C. Biochemistry 14:1397 (1975)), cristalino de vitela (Granger et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 73:3031 (1976)), pituitária de rato (Woodford, T.A. e Dixon J.E., J. Biol.Chem. 254:4993 (1979); Pease, K.A. e Dixon J.E., Arch. Biochem. Biophys. 212:177 (1981); e Glembotski, I.I., J.Biol.Chem 257:10501 (1982)), pituitária de boi (Massy D.E. e Smyth, D.G. Biochem Soc'y Trans.:8 751-753 (1980)), oviducto de galinha (Tsunasawa et al., J.Biochem. 87:645 (1980)) e gérmen de trigo (Kido et al. Arch Biochem Biophys. 208:95 (1981)). No entanto, não foi conseguido o isolamento desta enzima, e apenas a enzima do oviducto da galinha foi parcialmente purificada cerca de 40 vezes (Tsunasawa et al. J. Biochem. 87:645 (1980)). A incapacidade para isolar e purificar estas enzimas é devido à sua baixa concentração e extrema instabilidade após purificação.

Sumário do invento

De acordo com este invento, uma N^{α} -acetiltransferase que transfere um grupo acetilo do acetil-coenzima A para o grupo amina N-terminal de polipeptídeos foi isolada e purificada 4 600 vezes até à homogeneidade. O invento relaciona-se ainda portanto com a purificação até à homogeneidade de N^{α} -acetiltransferase e à N^{α} -acetiltransferase purificada.

A N^{α} -acetiltransferase foi purificada por passos de purificação sucessivos usando permuta iónica hidroxilapatite e cromatografia de afinidade. A N^{α} -acetiltransferase é composta por duas subunidades idênticas. O peso molecular (M_r) da enzima nativa foi calculado como sendo $180\,000 \pm 10\,000$ daltons por cromatografia de filtração em gel e o M_r de cada subunidade foi calculado como sendo $95\,000 \pm 2\,000$ daltons por SDS-PAGE. A enzima tem um pH óptimo perto de 9,0 e apresenta uma actividade máxima a temperatura entre 30° e 42°C . Por cromatofocagem em Mono-P o ponto isoeléctrico desta enzima foi determinado como sendo 4,3. De entre uma série de catiões divalentes, demonstrou-se que Cu^{2+} e Zn^{2+} são os inibidores mais potentes da enzima. Usando vários peptídeos sintéticos demonstrou-se que a enzima tem uma especificidade de substrato definida dependente do resíduo amino-terminal e que a enzima pode estar envolvida no processamento N-terminal de proteínas de levedura.

Ainda, a partir de cDNA seduziu-se toda a sequência de aminoácidos da N^{α} -acetiltransferase de levedura. A enzima N^{α} -acetiltransferase foi clonada a partir de uma biblioteca de cDNA de levedura em λ gt11 e sequenciado um cDNA completo codificador da N^{α} -acetiltransferase de levedura. As hibridações de transferências Southern de DNA genómico e cromossómico revelaram que a enzima é codificada por um único gene que está localizado no cromossoma IV. Este gene é designado aqui como "AAA 1" (Amino-terminal Alfa-amino Acetil-transferase 1). Este cDNA de levedura forma a base da elucidada-

ção da função biológica e regulação da N^a-acetiltransferase na síntese proteica eucariótica e degradação de proteínas. Ainda, usando mutagénese dirigida pode ser elucidado o mecanismo catalítico e regulação da N^a-acetiltransferase.

Breve descrição das figuras

Figura 1 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em DEAE-Sephadex (0,2 M KCl).

Figura 2 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em DEAE Sephadex (0,05 a 0,5 M KCl).

Figura 3 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em hidroxilapatite.

Figura 4 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em DE(2 celulose

Figura 5 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em gel Affi-Blue.

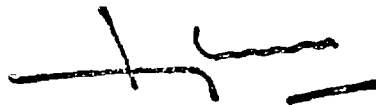
Figura 6 mostra o cálculo do peso molecular da acetiltransferase de levedura desnatada por SDS-PAGE.

Figura 7 mostra o cálculo do peso molecular da acetiltransferase nativa de levedura por filtração em gel.

Figura 8 mostra a cromatofocagem de acetiltransferase de levedura numa coluna Mono P.

Figura 9 mostra o efeito da temperatura em acetiltransferase de levedura.

Figura 10 mostra a actividade específica de acetiltransferase de levedura determinada em tampões HEPES 50 mM, fosfato de potássio, CHES e CAPS de diferentes pH.



-8-

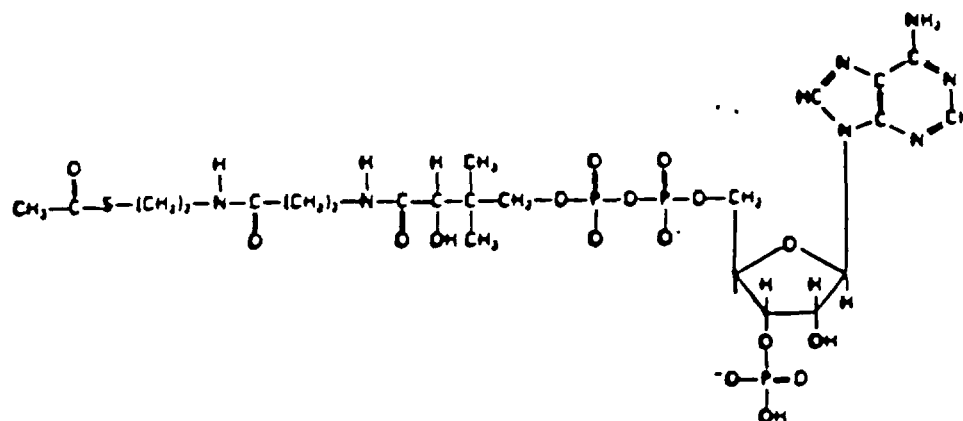
Figura 11 mostra a separação por HPLC dos peptídeos tripticos de N^{α} -acetiltransferase de levedura. Os números referem-se aos peptídeos trípticos, as sequências dos quais estão apresentadas na Figura 12C.

Figura 12 mostra a clonagem e sequenciação. (A) mostra as sondas oligonucleotídicas usadas para o despiste inicial da biblioteca em lgt11. As posições de nucleotídeos indicadas pelo asterisco diferem da sequência de DNA real apresentada em (C). A numeração dos peptídeos trípticos é como se segue: o primeiro número refere-se ao pico correspondente nas Figuras 11, o segundo número refere-se ao pico na separação isocrática em HPLC (dados não apresentados) e o terceiro número refere-se ao pico na segunda separação isocrática em HPLC (dados não apresentados). (B) mostra o mapa de restrição e a estratégia de sequenciação de DNA dos clones de cDNA. As setas indicam a direcção e grau de determinação das sequências para cada fragmento após deleção com exonuclease III. (C) mostra o nucleotídeo e sequência de aminoácidos deduzida dos clones de cDNA da N^{α} -acetiltransferase.

Figura 13 mostra um gráfico de hidrofobicidade da N^{α} -acetiltransferase de levedura.

Descrição detalhada do invento

N^{α} -acetiltransferase é uma enzima que transfere um grupo acetilo do acetil-coenzima A para o extremo amina de uma proteína ou polipeptídeo. A estrutura do acetil-coenzima A está descrita abaixo:



Acetil

Coenzima A (CoA)

I. Isolamento, purificação e sequenciação de N^a-acetiltransferase.

De acordo com este invento, N^a-acetiltransferase pode ser isolada a partir de uma amostra contendo a enzima. Qualquer amostra que contenha a enzima pode ser usada como material de partida de acordo com os métodos descritos neste invento. A N^a-acetiltransferase parece ser ubíqua, sendo encontrada em todos os eucariotas, incluindo plantas, animais e organismos multicelulares. Pensa-se também que a enzima esteja presente em procariotas. Assim, qualquer fonte de N^a-acetiltransferase é considerada neste invento. Conforme aqui é usado, a amostra contendo a enzima será referida simplesmente como "amostra" que se destina a incluir amostra contendo N^a-acetiltransferase.

O isolamento e purificação de N^a-acetiltransferase será daqui em diante descrito a partir de uma amostra de levedura, se bem que se deva entender que outras amostras poderão ser usadas como material de partida. O método preferido para a purificação da N^a-acetiltransferase do presente invento é o de Lee, F.J.S. et al. (J.Biol. Chem 263: 14948-14955 (1988), referência esta aqui incluída na sua tota-



lidade por referência).

As células de levedura foram transformadas em esferoplastos pela acção de liticase e homogenizadas em tampão hipotónico com um homogeneizador Dounce. A acetiltransferase de levedura foi libertada do lisado celular para o tampão B contendo 0,2 M KCl com agitação suave. Após centrifugação o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração com membrana PM-30 e dialisado durante a noite contra tampão HDG (20 mM Hepes- K^+ , pH 7,4, 0,9mM DTT, 10% (v/v) glicerol e 0,02% NaN_3) contendo 0,2 M KCl. A acetiltransferase de levedura não é uma enzima estável e usou-se 10% de glicerol para prolongar a semi-vida da enzima.

O passo seguinte na purificação foi a remoção dos biomateriais celulares residuais no sobrenadante para evitar a agregação de proteína-biomateriais nos passos subsequentes. Neste processo pode-se usar a permuta iónica. Neste passo, a permuta iónica usada foi cromatografia em DEAE-Sephárose em eluição numa concentração constante de sal (0,2 M KCl) que se verificou ser o processo mais suave. Cerca de 80% dos biomateriais ou proteínas foi removido com uma recuperação de 107% da actividade de acetiltransferase de levedura. A figura 1 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em DEAE-Spharose (0,2MKCl). Uma amostra dos sobrenadantes dos homogenatos de levedura foi cromatografado em DEAE-Spharose (0,2M KCl). O material eluído foi medido aA_{200} e a actividade de acetiltransferase foi testada como descrito nos Exemplos. As fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas conforme indicado pela barra horizontal.

As fracções do pico da coluna de DAAE-Spharose (0,2M KCl) foram reunidas, concentradas, dialisadas contra tampão HDG contendo 0,05 MKCl e aplicadas numa solução de DEAE-Spharose e eluídas com um gradiente de sal contínuo (0,05 a 0,5MKCl). A Figura 2 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em DEAE-Spharose (0,05 a 0,5M KCl). O

conjunto de fracções de acetiltransferase derivado de DEAE-Sephrose (0,2M KCl) foi concentrado, dialisado e uma amostra foi cromatografada numa coluna de DEAE-Sephrose (0,05 a 0,5M KCl) e analisado por A_{280} conductividade e actividade de acetiltransferase como descrito nos Exemplos. As fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas conforme indicadas pela barra horizontal. Obteve-se um único pico de actividade simétrica centrado em 0,18M KCl. Neste passo conseguiu-se uma recuperação de 204% da actividade de acetiltransferase (Tabela 1) segerindo que foi removido um inibidor.

As fracções do pico de DEAE-Sephrose (0,05 a 0,5M KCl) foram reunidas, concentradas, dialisadas contra tampão fosfato de potássio 0,05M, pH 7,4, 0,5mM DTT 10% (v/v) glicerol, 0,02% NaN_3 e aplicados numa coluna de adsorção usando hidroxilapatite. Conforme é conhecido na especialidade, uma coluna de hidroxilapatite adsorverá selectivamente proteínas a iões cálcio presentes no hidroxifosfato de cálcio. A ~~coluna de~~ hidroxilapatite foi eluida com um gradiente salino linear e obteve-se um único pico de actividade em fosfato de potássio 0,36 M. Neste passo o pico principal da eluição total de proteína ocorreu em fosfato de potássio 0,5 a 2,0M. A Figura 3 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em hidroxilapatite. O conjunto de fracções de acetiltransferase da coluna de DEAE-Sephrose (0,05 a 0,5M KCl) foi concentrado, dialisado e uma amostra foi cromatografada numa coluna de hidroxilapatite e analisado por A_{280} , conductividade e actividade de acetiltransferase como descrito nos Exemplos. As fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas conforme indicado pelas barras horizontais.

As fracções do pico da coluna de hidroxilapatite foram reunidas, concentradas, dialisadas contra tampão HDG contendo 0,05M KCl e aplicadas numa coluna de permuta iónica, DE52-celulose, com um gradiente de sal contínuo.

Obteve-se um único pico de actividade que se centrou em 0,14M KCl. A Figura 4 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura em DE52 celulose. O conjunto de fracções de acetiltransferase da coluna de hidroxilapatite foi concentrado, dialisado e uma amostra foi submetida a cromatografia em coluna de DE52 celulose e analisado por A_{280} , conductividade e actividade de acetiltransferase como o descrito nos Exemplos. As fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas conforme indicado pela barra horizontal.

As fracções do pico da coluna de DE52-celulose foram reunidas, concentradas, dialisadas contra tampão HDG contendo 0,05M KCl e aplicadas numa coluna de afinidade, gel Affi-Blue, eluido com um gradiente contínuo de sal (0,05 a 1,0M KCl). Obteve-se um único pico de actividade centrado em 0,6M KCl. A Figura 5 mostra a cromatografia da acetiltransferase de levedura numa coluna de gel Affi-Blue e analisado por A_{280} , conductividade e actividade ou acetiltransferase como descrito acima em "Materiais e métodos". As fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas conforme indicado pela barra horizontal.

Usando esta série de passos de cromatografia, a acetiltransferase de levedura foi purificada aproximadamente 4 600 vezes relativamente ao extracto celular como um rendimento de 27% como se vê na Tabela 1.

TABELA 1

Purificação de N^a-acetiltransferase de levedura

Passo	Actividade (unidade)	Proteína (mg)	Actividade específica (unidade/mg)	Purificação (vezes)	Rendi- mento (%)
1.Extrato bruto	30200	17700	1,7	1,0	100
2.DEAE-Sepharose ^a	32200	3710	8,7	5,1	107 ^b
3.DEAE-Sepharose ^c	61500	1470	41,8	24,5	204 ^b
4.Hidroxilapatite	19300	53,6	360	210	64
5.DEAE-celulose	12700	8,58	1500	870	42
6.Affi-Blue Gel	8160	1.05	7800	4600	27

a) Os resultados para o passo 2 são os rendimentos combinados de duas cromatografias. A eluição foi com 0,2M KCl.

b) Removeu-se um inibidor neste passo.

c) A eluição foi de 0,05 a 0,2M KCl.

Tal como aqui é usado o termo "substancialmente puro" ou "substancialmente purificado" pretende descrever N^a-acetiltransferase que está substancialmente livre de qualquer composto normalmente associado à enzima no seu estado natural, i.e., sem proteína ou componentes tipo açúcar. O termo pretende ainda descrever N^a-acetiltransferase que é homogénea por uma ou mais características de pureza ou homogeneidade usadas pelos familiarizados com a matéria. Por exemplo, uma N^a-acetiltransferase substancialmente pura apresentará características constantes e reprodutíveis dentro dos desvios experimentais convencionais para parâmetros tais como os

que se seguem: peso molecular, técnicas de cromatografia e outros parâmetros. O termo, no entanto, não pretende excluir misturas artificiais ou sintéticas das enzimas com outros compostos. O termo também não pretende excluir a presença de impurezas menores que não interferem com a actividade biológica da enzima e que podem estar presentes, por exemplo, devido a purificação incompleta.

II. Identificação, purificação e caracterização, de N^o-acetiltransferase

Peso molecular

Os géis de SDS-poliacrilamida da amostra purificada revelam uma única banda quando corados com azul Coomassie. A electroforese foi efectuada de acordo com o método de Laemmli, U.K., Nature 227:680-685 (1970) usando um gel de 8%. O gel foi corado com azul coomassie. Padrões proteicos de peso molecular 45,66,97, 116 e 205 migraram juntamente com o extracto bruto, fracções de DEAE-Sepharose, fracções de hidroxilapatite, fracções de DEAE-celulose e fracções de gel Affi-Blue. A electroforese em gel de SDS poliacrilamida mostra que a enzima purificada tem um peso molecular de 95000 ± 2000 deltas. A Figura 6 mostra o cálculo do peso molecular da acetiltransferase de levedura desnatada em SDS-PAGE. A enzima purificada foi aplicada em electroforese com SDS de acordo com o método de Laemmli, U.K. Nature 227:680-685 (1970) usando um gel de 9%. O peso molecular das acetiltransferase de levedura desnatada foi calculado usando padrões proteicos. A cromatografia de filtração em gel de Sepharose CL-4B mostrou que o peso molecular nativo da acetiltransferase é de aproximadamente 180.000 daltons. A Figura 7 mostra o cálculo do peso molecular da acetiltransferase nativa de levedura por filtração em gel. A enzima purificada foi aplicada numa coluna de Sepharose CL-4B (2,5 x 96 cm). O peso molecular aparente da acetiltransferase

nativa de levedura foi calculado a partir do volume de eluição relativo de proteínas padrão como sendo $180\,000 \pm 10\,000$ daltons. O volume de eluição foi determinado por absorvância a 280 nm e actividade enzimática. Estes resultados sugerem que a acetiltransferase de levedura é composta por duas subunidades idênticas. A acetiltransferase de levedura purificada foi sujeita a análise de aminoácidos. Os resultados desta análise estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2

Composição em aminoácidos de N-Acetiltransferase de levedura

Aminoácido	Resíduos Calculados ^b
Asx	103
Thr	24
Ser	43
Glx	96
Pro	32
Gly	39
Ala	61
Val	41
Met	3
Ile	41
Leu	106
Tyr	32
Phe	45
Lys	73
His	12
Arg	37

- a) A acetiltransferase purificada foi obtida por eluição do gel após SDS-PAGE
- b) Os resíduos por subunidade de enzima foram calculados com base num peso molecular de 95 000. Não foi feita qualquer correcção para as quantidades de aminoácidos ser e tre que são destruídas a hidrólise lis e trp não foram determinadas por este método.

Propriedade bioquímicas da N^α-acetiltransferase

Usou-se cromatofocagem em Mono P para determinar pI da acetiltransferase. Observou-se um pico de actividade a pH 4,3. A Figura 8 mostra a cromatofocagem de acetiltransferase de levedura numa coluna Mono P. A enzima parcialmente purificada obtida de coluna de DE52, foi aplicada na coluna Mono P equilibrada com tampão Tris-Bis 25 mM (pH6) e eluida por Polybuffer 74 (pH 3,6) num caudal de 1 ml/min a 4°C. A eluição foi controlada por absorvância a 280 nm e colheram-se fracções de 0,5 ml para medir o pH e actividade enzimática.

A Figura 9 mostra o efeito da temperatura numa acetiltransferase de levedura. A Figura 10 mostra a actividade específica da acetiltransferase de levedura determinada nos tampões HEPES, fosfato de potássio, CHES e CAPS 50mM de diferentes pH's. A temperatura óptima para a acetiltransferase de levedura foi determinada em condições convencionais. Os ensaios foram efectuados de 5° a 55° conforme indicado na Figura 9. A acetiltransferase de levedura apresenta um máximo de actividade a temperatura de 30° a 42°C. A desnaturação irreversível ocorreu após 1 minuto a 65°C. A dependencia do pH da acetiltransferase de levedura foi medida testando nos valores de pH de 5 a 11 e na presença dos tampões HEPES, fosfato de potássio, CHES e CAPS 50 mM conforme indicado na Figura 10. A actividade enzimática máxima ocorreu a pH 9,0. A actividade enzimática foi inferior a 25% abaixo de pH 6,5 e acima de

pH 11. A adição de KCl ou NaCl até à concentração 0,45 M não afectou a reacção enzimática. Observou-se uma redução de 50% na actividade enzimática quando o ensaio foi efectuado a 0,6 KCl ou 0,6M NaCl.

Efeito dos catiões divalentes na reacção enzimética

O efeito dos vários catiões divalentes na actividade enzimática foi determinado como se mostra na Tabela 3. Numa concentração de 1mM, Ca^{2+} e Mg^{2+} não tiveram qualquer efeito enquanto que na presença de Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} observou-se inibição quase total. Cu^{2+} e Zn^{2+} foram os inibidores mais potentes. Verificou-se que os efeitos observados dos iões metálicos não eram devidos ao anião SO_4^{-2} .

Tabela 3

~~Efeitos~~ de catiões divalentes na actividade enzimática

Adição	Actividade (%)		
	Concentração (mM)		
	1	0,1	0,01
Nada	100	---	---
CaCl_2	100	---	---
MgCl_2	99	120	---
MgSO_4	120	120	---
MnCl_2	28	43	84
CoCl_2	20	60	86
CdCl_2	12	42	90
FeSO_4	12	53	78
CuSO_4	0	0	58
ZnSO_4	0	0	40

- a. A acetiltransferase de levedura foi incubada na presença de vários catiões divalentes à temperatura ambiente durante 5 minutos. A actividade enzimática foi determinada pela adição de substrato directamente à mistura de incubação seguido do processo de ensaio convencional.

Efeito das modificações químicas na reacção enzimática

Para avaliar o possível papel catalítico dos resíduos de aminoácidos na reacção de acetilação desta enzima, efectuaram-se várias modificações químicas (Tabela 4) A acetiltransferase de levedura foi incubada com cada um dos reagentes a 30°C durante quinze minutos, dialisada contra tampão HEPES 50 mM pH 7,4, 150 mM DTT a 4°C durante 3-4 horas. A actividade enzimática foi determinada como descrito atrás. A reacção de acetiltransferase com dietil-piropiridato 1 ou 5 mM um reagente de modificação da histidina, provocou uma inactivação completa da enzima. Os reagentes usados na Tabela 4 são: reagentes que modificam resíduos de cisteína e cistina (NEM, N-etil-maleimida; IAA, ácido iodoacético; IAM, iodoacetamida; pCMB, p-cloromercuribenzoato; DTT, ditiotreitól); reagentes que modificam resíduos HIS TYR ou LYS (DEPC, dietilpiropiridato); reagentes que modificam resíduos HIS, TYR ou TRP (NBS, N-Bromo succinimida); reagentes que modificam HIS ou carboxilo (Woodward's 3'sulfonato de N-etil-5-fenilisoxazólio); reagentes que modificam lisina ou resíduos de aminoácidos primários (anidrido succínico; TNBS, ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfónico); reagentes que modificam resíduos TYR (N-acetilimidazole); reagentes que modificam resíduos TRP (HNBS (CH₃)₂-Br; brometo de dimetil-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)sulfónico; reagentes que modificam resíduos SER (PMSF); e reagentes que quelatam iões metálicos (DEAE).

Tabela 4

Efeito de reagentes modificadores de proteina na actividade enzimática de N-alfa-acetiltransferase de *S.cerevisial*

Reagente adicionado	Concentração (mM)	Actividade enzimática (%)
Nenhum		100
NEM	1,0	92
	10,0	13
IAA	1,0	100
	5,0	73
IAM	1,0	98
	10,0	63
pCMB	1,0	10 0
	10,0	55
pCMB+DTT	1,0 + 10,0	10 0
	10,0 + 60,0	16 0
DTT	1,0	10 0
	10,0	11 0
	50,0	12 0
DEPC	0,5	52
	1,0	1,6
	5,0	0
DEPC+Hidrolxilamina	1,0 + 250,0	0
	1,0 + 500,0	0
NBS	0,5	30
	5,0	0,5
Woodward's K	1,0	79
	10,0	0
Anidrido succinico	1,0	94
	10,0	71
TNBS	1,0	94
	10,0	76
N-acetilimidazole	1,0	100
	10,0	63
HNBS(CH ₃) ₂ -Br	1,0	82
	10,0	70

PMSF	1,0	140
	10,0	134
DEAE	2,5	120
	25,0	135
2-Mercaptoctanol	10,0	110

Especificidade do substrato

Fez-se uma determinação parcial da especificidade de substrato da acetiltransferase de levedura usando um substrato contendo os 24 primeiros resíduos de aminoácidos da hormona adrenocorticotrófica (ACTH). As sequências de aminoácidos dos quatro substratos de ACTH são como descritas por Lee, F.-J.S., et al, (J. Biol Chem 263:14948-14955 (1988) referência essa que aqui foi incluída por referência na sua totalidade).

A Tabela 5 mostra que a eficácia de acetilação do análogo [Phe²] não foi significativamente diferente da ACTH (aminoácidos 1-24). Quatro formas truncadas de ACTH (aminoácidos 4-10), (aminoácidos 11-24), (aminoácidos 17-38) e aminoácidos 18-39), sem resíduos N-terminais diferentes de ACTH, não foram acetilados. B-endorfina pode ser acetilada no resíduo Tyr N-terminal pela acetiltransferase de pituitária de rato mas não pela acetiltransferase de levedura (Tabela 6). A especificidade de substrato usando substratos naturais na levedura foi também investigada. A álcool-desidrogenase (ADM) de levedura é naturalmente acetilada no seu resíduo Ser N-terminal. A superóxido dismutase (SOD) humana é naturalmente acetilada no seu resíduo Ala N-terminal e também quando expressa como proteína recombinante em levedura. No entanto, SOD endógena de levedura, que é 48% idêntica à SOD humana, não é acetilada. Não é claro se as diferenças nas sequências N-terminais entre estas

proteínas são ou não responsáveis pelas diferenças de acetilação. Como se mostra na Tabela 6, ADH sintética de levedura (aminoácidos 1-24) e SOD sintética humana (aminoácidos 1-24) podem ser acetilados por esta enzima. No entanto, ADH de levedura já naturalmente acetilada no resíduo Ser do extremo N ou SOD sintética de levedura (aminoácidos 1-24) não podem ser acetiladas. Em adição, a enolase de levedura contendo um resíduo Ala com um grupo $L-NH_2$ livre sabe-se que não é acetilada em N in-vivo e de facto não pode ser acetilada por esta enzima. Ainda, as histonas de timo de vitela ricas em lisina ou argina não são acetiladas pela acetiltransferase de levedura.

Tabela 5

Actividade relativa da acetiltransferase de levedura para a N-acetilação de fragmentos de ACTH

Substrato	Actividade (%)
ACTH (1-24)	100 $\pm$ 5
/Phe ² /ACTH (1-24)	90 $\pm$ 9
ACTH (4-10)	0
ACTH (11-24)	0
ACTH (7-38)	0
ACTH (18-39)	0

Dados apresentados como actividade média $\pm$ DP (N=3-5)

Tabela 6

Actividade relativa da acetiltransferase de levedura para a N-acetilação de vários peptídeos sintéticos e proteínas nativas

Substrato	Actividade (%)
ACTH (1-24) (Humano)	100 $\pm$ 5
B-endorfina(humana)	2 $\pm$ 2
Álcool-desidrogenase (1-24) (levedura)	92 $\pm$ 8
Álcool-desidrogenase (levedura)	4 $\pm$ 2
Superóxido-dismutase (1-24) (levedura)	0
Superóxido-dismutase (1-24) (humano)	86 $\pm$ 6
Enolase (1-24) (levedura)	4 $\pm$ 2
Histona (rica em lisina) (timo de vitela)	0
Histona (rica em arginina) (timo de vitela)	0

Dados apresentados com actividade média $\pm$ DP(N=3-5)

Sequências de aminoácidos de N -acetiltransferase

A N~~A~~-acetiltransferase foi clivada com tripsina e os fragmentos foram separados numa coluna de HPLC de fase reversa. Os fragmentos peptídicos (indicados com linhas a tracejado de dois dos fragmentos peptídicos sequenciados, Fragmento 15-3-1 e Fragmento 29-1 são como se segue:

Fragmento 15-3-1

gli-val-pro-ala-tre-fen-ser-asn-val-lis-pro-leu-tir-gln-arg

Fragmento 29-1:

fen-ile-pro-leu-tre-fen-leu-gln-asp-lis-glu-glu-leu-ser-lis

Conforme detalhado abaixo, a informação da sequência destes dois fragmentos peptídicos podem ser usada para sintetizar sondas oligonucleotídicas conforme descrito abaixo no Exemplo 2.

III. Engenharia genética da N^{ac}etiltransferase

Sequênciação da N^{ac}etiltrasferase

Os inventores completaram a clonagem molecular e determinaram toda a sequência de DNA de um gene eucariótico de N^{ac}etiltransferase. A proteína N^{ac}etiltransferase de levedura é codificada por uma grelha de leitura aberta de 2562 bases e consiste em 854 aminoácidos. O seu peso molecular calculado a partir da sua composição em aminoácidos é de 98 575 daltons e o seu peso molecular está de acordo com a M_r da subunidade, calculado como sendo $95\,000 \pm 2\,000$. Conforme descrita atrás, a análise da sequência proteica da proteína nativa revelou o seu bloqueio N-terminal, sendo provável que após a clivagem do resíduo N-terminal Met que o penúltimo resíduo serilo seja acilado (possivelmente acetilado). Apesar da enzima não ser conhecida como uma glicoproteína, ela possui 6 sítios peptídicos de N-glicosilação (i.e., sequências, Asn-X-Ser (ou Tre)) nos resíduos 122-122, 161-163, 643-645, 702-704, 761-763, 792-793. A região hidrofílica entre os resíduos 508 e 720 é uma característica estrutural invulgar da molécula, se bem que não seja claro se esta região desempenha um papel funcional na regulação ou localização da enzima. Uma comparação das sequências proteicas da N^{ac}etiltransferase com outras acetiltransferase não revela uma percentagem apreciável de semelhanças entre elas, se bem que determinadas pequenas sequências tenham uma semelhança superior a 50%. Provavelmente estas são regiões onde as mutações específicas de sítio deverão ser introduzidas nas tentativas preliminares para identificar re-

síduos envolvidos na catálise.

Considerados em conjunto, as transferências Northern e Southern indicam haver um gene codificador desta N^K-acetiltransferase. No entanto, não é claro se a levedura contém ou não ainda outras acetiltransferases capazes de codificar o grupo $K-NA_2$ de proteínas. Ainda, estudos anteriores sobre a especificidade do substrato da N^K-acetiltransferase de levedura demonstraram claramente que esta enzima não é capaz de fazer acetilação de grupos E-NH₂ em substratos peptídicos ou em histonas, se bem que tenha sido demonstrada uma acetiltransferase específica de histonas na levedura (Travis, G.H., J. Biol Chem 259: 14406-14412 (1984)).

O gene AAA 1 está situado no cromossoma 4 e está colocado imediatamente adjacente à sequência delimitante 5 do gene STR₂. Uma vez que SIR₂ e três outros genes de 8IR que não estão em "linkage" afectam a repressão trans da transcrição dos genes HMR e HML, os quais estão envolvidos na determinação do tipo de conjugação das leveduras haplóides, não existe uma relação clara entre a função destes genes e AAA1.

O gene AAA1 de levedura permitirá obter detalhes moleculares do papel da N^K-acetilação no processamento e degradação de proteínas eucarióticas.

Clonagem de N^K-acetiltransferase

Este invento compreende ainda as sequências de aminoácidos da N^K-acetiltransferase, as sequências genéticas codificadoras da enzima, veículos contendo a sequência genética, hospedeiros transformados com eles, produção de enzima por expressão do hospedeiro transformado e utilização da enzima na acetilação de peptídicos ou proteínas.

A sequência de DNA codificadora de N^α-acetiltransferase pode ser derivada de uma variedade de fontes. Por exemplo, mRNA codificado pela N^α-acetiltransferase pode ser isolado a partir dos tecidos de quaisquer espécies que produzam a enzima, usando o método de transferência Northern (Alwine, et al., Method Enzymol. 68: 220-242 (1979)) e sondas oligonucleotídicas marcadas. O mRNA pode ser então convertido em cDNA por técnicas conhecidas pelos familiarizados com a matéria. As sondas podem ser sintetizadas com base na sequência de aminoácidos conhecida da N^α-acetiltransferase como descrita atrás.

Como alternativa, podem ser usadas sondas de DNA degenerativas para fazer o despiste de uma biblioteca de DNA de uma espécie que produza N^α-acetiltransferase, isolado assim, um clone que contém a sequência de DNA codificadora da enzima. A biblioteca de DNA é criada pela fragmentação usando uma ou mais endonucleases de restrição do DNA genômico, seguido de incorporação em vetores e sua utilização para transformar células hospedeiras, as quais são então semeadas e despistadas.

A sonda de DNA pode ser marcada com um grupo detectável. Tal grupo detectável pode ser qualquer material tendo uma propriedade física ou química detectável. Tais materiais têm sido bem desenvolvidos no campo dos imunoenaios e de um modo geral qualquer marca utilizada em tais métodos pode ser aplicada no presente invento. São particularmente úteis grupos enzimaticamente activos, tais como enzimas (ver Clin. Chem. 22: 1243 (1976), substratos de enzimas (ver Especificação de Pat. Britânica 1548 741), coenzimas (ver Pat. U.S. Nºs 4230 797 e 4238565) e inibidores de enzimas (ver Pat. U.S. Nº. 4 134 792); substâncias fluorescentes (ver. Clin. Chem 25: 353 (1979)); cromóforos; substâncias luminescentes como sejam quimioluminescentes e bioluminescentes (ver Clin Chem. 25: 512 (1979)); ligandos de ligação específica; pares de interacção proximal; a rediaisolopos tais como ³H, ³⁵S

^{32}P , ^{125}I e ^{14}C . Tais marcas e pares de marcação são detectados com base nas suas próprias propriedades físicas (e.g., compostos fluorescentes, cromóforos e radioisótopos) ou nas suas propriedades de reactividade ou ligação (e.g., enzimas, substratos, coenzimas e inibidores). Por exemplo, uma sonda marcada com um cofactor pode ser detectada pela adição da enzima para a qual a marca é um cofactor e um substrato da enzima. Por exemplo, pode-se usar uma enzima que actue sobre um substrato para gerar um produto com uma propriedade física mensurável. Exemplos deste último incluem mas não estão limitadas a beta-galactosidase, fosfatase alcalina e peroxidase.

Uma sequência de DNA codificada da N α -acetiltransferase pode ser recombinada com DNA vector de acordo com técnicas convencionais, incluindo extremos agos ou coesivos para ligação, digestão com enzimas de restrição, para dar extremos apropriados, preenchimento de extremos coesivos conforme adequados, tratamento com fosfatase alcalina para evitar ligação, indesejável e ligação com ligases adequadas.

Para expressar N α -acetiltransferase são necessários sinais de transcrição e tradução reconhecidos por um elemento hospedeiro adequado. Os hospedeiros eucarióticos podem ser células de mamífero que possam ser cultivadas in vitro, particularmente leucócitos, mais particularmente células de mielona ou outros linfócitos transformados ou oncogénicos, e.g. células transformadas por EBV. Como alternativa, podem ser empregues células que não sejam de mamíferos, tais como bactérias, fungos, e.g. leveduras, fungos filamentosos ou similares.

Constituem possíveis hospedeiros para a produção de N α -acetiltransferase, células de mamífero, cultivadas in vitro em cultura de tecidos ou in vivo em animais. As células de mamífero podem proporcionar modificações pós-tradução das moléculas de N α -acetiltransferase incluindo enrolamento ou glicosilação correcta dos sítios correctos. As

células de mamíferos que podem ser úteis como hospedeiros incluem células de origem fibroblástica tais como Vero ou CHO-K1 ou Células de origem linfóide, tais como o hibridoma SP2/0-AG14 ou o mieloma P3 x 635gh e seus derivados. Geralmente a construção de N -acetiltransferase será parte de um vector tendo um sistema de replicação reconhecida pela célula hospedeira.

Numa execução, uma célula procariota é transformada por um plasmídeo portador do gene codificador da N -acetiltransferase. Hospedeiros bacterianos de particular interesse incluem E. coli K12 estirpe 294 (ATCC 31446), E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli W3110 (F⁻, lambda⁻, fototrófica (ATCC 27325)) e outras enterobactérias tais como Salmonella Typhimurium ou Serratia marcescens, e várias espécies de Pseudomonas. Em tais condições a N-acetiltransferase não será glicosilada. O hospedeiro procariótico deve ser compatível com a replicação e sequências de controle no plasmídeo de expressão.

Em geral, tais vectores contendo replicação e sequências de controle que são derivadas de espécies compatíveis com uma célula hospedeira são usados em ligação com o hospedeiro. O vector normalmente possui um sítio de replicação, assim como genes específicos que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas. A expressão do DNA codificador de N -acetiltransferase pode também ser colocada sob controle de outras sequências reguladoras que podem ser homólogas para o organismo no seu estado não transformado. Por exemplo, DNA cromossómico de E. coli dependente de lactose compreende um operon lactose ou lac que medeia a utilização de lactose através da elaboração da enzima B-galactosidase. Os elementos de controle lac podem ser obtidos a partir do bacteriófago lambda plac5, que é infeccioso para E. coli. O sistema promotor-operador lac pode ser induzido por IPTG.

Também podem ser empregues outros sistemas promotor/operador ou porções deles. Por exemplo podem ser usados colicinas El, galactose, fosfatase alcalina, triptofano, xilose tax e similares.

Para um hospedeiro mamífero vários sistemas vector possíveis estão disponíveis para expressão. Uma classe de vectores utiliza elementos de DNA que proporcionam plasmídeos extra-cromossómicos de replicação autónoma, derivados de vírus animais tais como vírus do papiloma bovino, vírus polioma, adenovírus ou vírus 5 B40. Uma segunda classe de vectores baseia-se na integração das sequências genes pretendidas no cromossoma hospedeiro. As células que têm estávelmente integrado o DNA introduzido nos seus cromossomas podem ser seleccionadas através da introdução de uma ou mais marcas que permitem selecção de células hospedeiras que contenham o vector de expressão. A marca pode proporcionar prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocidas, e.g. antibióticos ou metais pesados, tais como cobre ou similares. O gene da marca seleccionável pode ser ligado directamente às sequências de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por cotransformação. Podem também ser necessários elementos adicionais para a síntese óptima de mRNA. Estes elementos podem incluir sinais de "shlicing", assim como promotores de potenciadores e sinais de terminação da transcrição. Os vectores de expressão de cDNA que incluem tais elementos abrangem os descritos por Okayama, H., Mol. Cel. Biol. 3: 280 (1983) e outros.

Podem ser empregues uma grande variedade de sequências reguladores da transcrição e tradução dependendo da natureza do hospedeiro. Os sinais de transcrição e tradução podem derivar de fontes virais tais como adenovírus, vírus do papiloma bovino, vírus sínio ou similares, onde os sinais reguladores estejam associados com um gene particular que um elevado nível de expressão. Como alternativa podem ser empregues promotores de produtos de expressão de mamíferos tais como activo, colagénio, miosina, etc. Podem igualmente ser se-

leccionados sinais de iniciação da transcrição que permitem a repressão ou activação de modo a que a expressão dos genes possa ser modulada. São particularmente interessantes os sinais reguladores sensíveis à temperatura de modo a que variando a temperatura, a expressão possa ser reprimida ou iniciada, ou que estejam sujeitos a regulação química, e.g. metabolitos.

Uma vez preparado para expressão o vector ou sequência de DNA contendo as construções, as construções de DNA podem ser introduzidas num hospedeiro adequado. Podem ser empregues várias técnicas tais como fusão de protoplastos, precipitação com fosfato de cálcio, electroporação ou outras técnicas convencionais. Após fusão, as células são cultivadas em meio e despistadas quanto às actividades adequadas. A expressão do(s) gene(s) resulta na produção de N^α-acetiltransferase.

As células hospedeiras para produção de N^α-acetiltransferase podem ser células imortalizadas principalmente células de mieloma ou linfoma. Estas células podem ser cultivadas num meio nutritivo adequado em frascos de cultura ou injectadas num hospedeiro sinérgico, e.g., murganho ou rato ou hospedeiro imunodeficiente ou local do hospedeiro imunodeficiente, e.g. murganho labro ou bolsa de hamster.

A N^α-acetiltransferase do invento pode ser isolada e purificada de acordo com condições convencionais, tais como extracção precipitação, cromatografia, cromatografia de afinidade, electroforese ou similares.

IV Utilizações da N^α-acetiltransferase.

N^α-acetiltransferase uma vez produzida e purificada pode ser usada, por exemplo, num ambiente de fabrico farmacêutico para N-acetilar um peptídeo ou proteína. A N-acetilação é útil na redução da degradação de proteínas a serem usadas terapêuticamente. Ver a discussão de A. Klibinov,

"Unconventional Catalytic Properties of Conventional Enzymes" em Basic Biology of New Developments in Biotechnology pág 497-518 (A. Hollaender, ed., 1973) sobre o uso de enzimas.

Expressão da N α -acetiltransferase em plantas

Ainda, a N α -acetiltransferase pode ser introduzida numa planta por técnicas de engenharia genética para aumentar a velocidade de acetilação. Sabe-se que certos herbicidas são inativados por acetilação. Portanto, é possível produzir uma planta que seja mais tolerante aos herbicidas. Ainda numa outra realização deste invento, o gene da N α -acetiltransferase é usado para transformar uma planta para aumentar a tolerância da planta a herbicidas.

A região codificadora do gene da N α -acetiltransferase que pode ser usado neste invento pode ser homólogo ou heterólogo para a célula vegetal ou planta a ser transformada. É necessário no entanto, que a sequência genética codificadora da N α -acetiltransferase seja expressa e produzida como uma proteína funcional ou polipeptídeo na célula vegetal resultante. Assim, o invento compreende plantas contendo genes homólogos da N α -acetiltransferase ou genes heterólogos da N α -acetiltransferase que expressam a enzima.

Numa realização deste invento, a N α -acetiltransferase compreende uma N α -acetiltransferase vegetal que é homóloga da planta a ser transformada. Numa outra realização deste invento, a N α -acetiltransferase compreende uma enzima que é heteróloga da planta a ser transformada. Ainda, o DNA do DNA genómico ou cDNA codificador do gene da N α -acetiltransferase pode ser usado neste invento. Ainda, um gene N α -acetiltransferase pode ser construído parcialmente com um clone de cDNA e parcialmente com um clone genómico. Em adição, o DNA codificador do gene da N α -acetiltransferase pode compreender porções de várias espécies.

Existe uma variedade de realização abrangidas pelo conceito lato deste invento. Numa das suas realizações, este invento compreende sequências genéticas quiméricas:

(a) uma primeira sequência genética codificadora de uma N α -acetiltransferase que quando da expressão do gene numa determinada célula vegetal é funcional para N α -acetiltransferase;

(b) uma ou mais sequências genéticas adicionais operativamente, ligadas em ambos os lados da região codificadora da N α -acetiltransferase. Estas sequências genéticas adicionais contêm sequências para promotor(es) ou terminador(es). As sequências reguladoras vegetais podem ser heterólogas ou homólogas para a célula hospedeira.

Numa realização preferida, o promotor do gene da N α -acetiltransferase é usado para expressar a sequência genética quimérica. Outros promotores que podem ser usados na sequência genética incluem promotores nos, ocs e CaMV. Um promotor vegetal eficaz que pode ser usado é um promotor vegetal de superprodução. Este promotor em ligação operacional com a sequência genética da N α -acetiltransferase deverá ser capaz de promover a expressão da referida N α -acetiltransferase de modo a que a planta transformada tenha uma maior tolerância a um herbicida. Os promotores vegetais superprodutores que podem ser usados neste invento incluem o promotor da subunidade de pequena(as) da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase de soja (Berry Lowe et al., J. Molecular and App. Gen. 1: 483-498 (1982)) e o promotor da proteína de ligação à clorofila a/b. Sabe-se que estes dois promotores são induzidos pelas luz em células vegetais eucarióticas (ver, por exemplo, Genetic Engineering of Plants an Agricultural Perspective, A. Cashmore, Plenum, New York 1983, páginas 29-38; Corruzi, G, et al., J. Biol Chem., 258: 1399 (1983); e Dunsmuir, P. et al., J. Mol. and Applied Genet., 2: 285 (1983)).

Ainda, numa outra realização pre-

ferida, a expressão da sequência genética quimérica compreendendo o gene da N^α-acetiltransferase é operacionalmente ligado na grelha de leitura correcta com um promotor vegetal e com uma sequência sinal de um gene de secreção.

A sequência genética quimérica compreende o gene da N^α-acetiltransferase operacionalmente ligado a um promotor vegetal, e na realização preferida com as sequências sinal da secreção, pode ser ligada num vector de clonagem adequado. Em geral, são usados vectores plasmídeos ou virais (bacteriofago) contendo sequências de replicação e de controle derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira. O vector de clonagem possuirá tipicamente uma origem de replicação, assim como genes específicos que são capazes de proporcionar marcas de selecção fenotípica em células hospedeiras transformadas, tipicamente resistência a antibióticos. Os vectores de transformação podem ser seleccionados por estas marcas fenotípicas após transformação de uma célula hospedeira.

As células hospedeiras que podem ser usadas neste invento incluem procariotas, incluindo hospedeiros bacterianos tais como E.coli, S. Typhimurium e Serratia marcescens. Neste invento podem também ser usados hospedeiros eucarióticos tais como leveduras ou fungos filamentosos.

O vector de clonagem e célula hospedeira transformada com o vector são usados neste invento tipicamente para aumentar o número de cópias do vector. Com um aumento do número de cópias, os vectores contendo o gene da N^α-acetiltransferase pode ser isolado e, por exemplo, usado para introduzir as sequências genéticas quiméricas nas células vegetais. O material genético contido no vector pode ser microinjectado directamente nas células vegetais através da utilização de micropipetas para a transferência mecânica do DNA recombinante. O material genético pode também ser transferido para a célula vegetal usando polietilenoglicol que forma um complexo de precipitação com o material genético o qual é internalizado pe

la célula. (Paszkowski et al., EMBO J. 3: 2717-22 (1984)).

Numa execução alternativa deste invento, o gene da N^α-acetiltransferase pode ser introduzido nas células vegetais por electroporação. (Fromm et al., "Expression of Genes transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation", Proc. Nat'l Acad. Sci U.S.A. 82: 5824 (1985)). Nesta técnica os protoplastos vegetais são electroporados na presença de plasmídeos contendo a construção genética da N^α-acetiltransferase. Os implusos eléctricos de alta voltagem permeabilizam reversivelmente biomembranas permitindo a introdução dos plasmídeos. Os protoplastos vegetais electroporados refazem a parede celular, dividem-se e formam calos vegetais. A selecção das células vegetais transformadas com a N^α-acetiltransferase expressa pode ser conseguida usando as marcas fenóticas como descrito atrás.

Um outro método para a introdução do gene da N^α-acetiltransferase em células vegetais é infectar uma ~~célula-vegetal~~ com Agrobacterium tumefaciens transformada com o gene da N^α-acetiltransferase. Em condições adequadas conhecidas na especialidade, as células vegetais transformadas são cultivadas para formar rebentos, raízes e desenvolverem-se em plantas. As sequências genéticas da N^α-acetiltransferase podem ser introduzidas nas células vegetais adequadas, por exemplo, por meio do plasmídeo Ti de Agrobacterium tumefaciens. O plasmídeo Ti é transmitido às células vegetais quando da infecção por Agrobacterium tumefaciens e é estávelmente integrado no genoma vegetal. (Horsch et al., "Inheritance of Functional Foreign genes in Plants", Science 233: 496-498 (1984); Fraley et al. Proc. Nat'l Acad. Sci USA 80:4803 (1983)).

Os plasmídeos Ti contêm regiões essenciais à produção de células transformadas. Uma destas, designada DNA de transferência (TDNA) induz a formação de tumores. A outra, designada região virulenta é essencial à formação mas não à manutenção de tumores. A região do DNA de transferência, que transfere para o genoma vegetal, pode ser aumentada através

da inserção da sequência genética da enzima sem que a sua capacidade de transferência seja afectada. Pela remoção dos genes causadores de tumores de modo a que eles não mais interfiram, o plasmídeo Ti modificado pode então ser usado como um vector para a transferência das construções genéticas do invento para uma célula vegetal adequada.

Todas as células vegetais que podem ser transformadas por Agrobacterium e plastas completas regeneradas a partir das células transformadas podem também ser transformadas de acordo com o invento de modo a produzir plantas completas transformadas que contêm o gene da N -acetiltransferase transferido.

Existem presentemente duas maneiras diferentes de transformar células vegetais com Agrobacterium

- (1) co-cultura de Agrobacterium com protoplastos isolados em cultura ou
- (2) transformação de células ou tecidos com Agrobacterium.

O Método (1) requiere um sistema de cultura estabelecido que permita a cultura de protoplastos e a regeneração de plantas a partir dos protoplastos cultivado.

O Método (2) requiere (a) que as células ou tecidos vegetais possam ser transformados por Agrobacterium e (b) que as células ou tecidos vegetais transformados possam ser induzidos para regenerar plantas completas. No sistema binário, para se ter infecção são necessários dois plasmídeos um plasmídeo contendo T-DNA e um plasmídeo vir.

Após transformação da célula vegetal ou planta, as células vegetais ou plantas transformadas pelo plasmídeo Ti de modo a que a enzima seja expressa, podem ser seleccionados através de um marcador fenotípico adequado. Estas marcas fenotípicas incluem mas não estão limitadas a resistência a antibióticos. São conhecidas outras marcas fenotípicas que podem ser usadas neste invento.

Todas as plantas a partir das quais podem ser isolados e cultivados protoplastos para darem plantas completas regeneradas podem ser transformadas pelo presente invento de modo a que sejam recuperadas plantas completas que contêm o gene da N^A-acetiltransferase transferido. Algumas plantas adequadas incluem, por exemplo, espécies dos géneros Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manicot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersion, Nicotina, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hemerocallis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browallia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum, e Datura.

Existe um número crescente de dados que sugerem que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos em cultura incluindo mas não estando limitado a todas as espécies principais de cereais, cana de açúcar, beterraba sacarina, algodoeiro, árvores de fruto e outros, legumes e vegetais. Neste momento desconhece-se se todas estas plantas podem ser transformadas por Agrobacterium. As espécies que são hospedeiros naturais de Agrobacterium podem ser transformadas in vitro. As plantas monocotiledóneas e em particular, cereais e forragens, não são hospedeiros naturais de Agrobacterium. Até recentemente as tentativas para as transformar com Agrobacterium têm sido infrutíferas. (Hooykas-van Slogteren et al., Nature 311: 763-764 (1984)). Existe evidencia crescente que certas monocotiledóneas podem ser transformadas por Agrobacterium. Usando novas abordagens experimentais agora disponíveis, os cereais e espécies de forragens podem ser transformados.

Outros géneros de plantas que podem ser transformados por Agrobacterium incluem Ipomoea, Passiflora, Allium, Lilium, Narcissus, Ananas, Arachis,

Phaseolus, e Pisum.

A regeneração de plantas a partir de protoplastos em cultura está descrito por Evans et al., "Protoplast Isolation and Culture" em Handbook of Plant Cell Culture 1: 124-176 (MacMillan Publishing Co., New York, 1983); M.R. Davey, "Recent Developmento in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasto" Protoplastos, 1983- Lecture Proceedings, pág. 19-29 (Birkhauser, Basel, 1983); P.J. Dale, "Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Recalcitrant Crops" em Protoplasts 1983 -Lecture Proceedings, pág 31-41 (Birkhauser, Basel, 1983); e H. Binding, "Regeneration of Plants" em Plant Protoplasto, pág. 21-37 (CRC Press, Boca Raton, 1985).

A regeneração varia de espécie para espécie de plantas, mas geralmente uma suspensão de protoplastos transformados contendo múltiplas cópias do gene da N^a-acetiltransferase é obtida em primeiro lugar. A formação de embriões ~~pode~~ então ser induzida a partir das suspensões de protoplastos para a fase de ripening e germinação como embriões naturais. O meio de cultura conterá geralmente vários aminoácidos e hormonas, tais como auxina e ritocininas. É também vantajoso adicionar ácido glutâmico e prolina ao meio, especialmente para espécies tais como milho e alfafa. Os rebentos e raízes normalmente desenvolvem-se simultâneamente. A regeneração eficaz dependerá do meio do genótipo e da história da cultura. Se estas três variáveis forem controladas a regeneração será então totalmente reprodutivel e repetível .

As plantas maduras, cultivadas a partir de células vegetais transformadas, são auto-cruzadas para produzirem plantas "consanguíneas". As plantas "consanguínas" produzem sementes contendo o gene para a N^a-acetiltransferase. Estas sementes podem ser cultivadas para produzir plantas que tenham uma maior velocidade de acetilação.

Estas plantas "consaguíneas" de acordo com este invento podem ser usadas para desenvolver híbridos tolerantes a herbicidas. Neste método, uma linha "consanguínea" tolerante a herbicidas é cruzada com uma outra linha "consanguínea" para produzir o híbrido.

Partes obtidas a partir da planta regenerada, tais como flores, sementes, folhas, ramos, frutos e similares são cobertos pelo invento desde que estas partes compreendam células tolerantes a herbicidas. A progénie e variantes e mutantes das plantas regeneradas também estão incluídas no âmbito deste invento.

Em plantas diplóides, tipicamente um progenitor pode ser transformado pela sequência genética da N~~α~~-acetiltransferase e o outro progenitor é tipo selvagem. Após cruzamento dos progenitores os híbridos da primeira geração (F1) mostrarão uma distribuição de 1/2 N~~α~~-acetiltransferase/tipo selvagem: 1/2 N~~α~~-acetiltransferase/tipo selvagem. Esta ~~primeira~~ geração de híbridas (F1) são auto-cruzados para produzir uma segunda geração de híbridas (F2). A distribuição genética dos híbridos F2 são 1/4 N~~α~~-acetiltransferase/N~~α~~-acetiltransferase: 1/2 N~~α~~-acetiltransferase/tipo selvagem: 1/4 tipo selvagem/tipo selvagem. Os híbridas F2 com a composição genética N~~α~~-acetiltransferase /N~~α~~-acetiltransferase são escolhidos como as plantas tolerantes a herbicidas.

Tal como aqui é usado, variante descreve alterações fenotípicas que são estáveis e hereditárias incluindo variação hereditária que é sexualmente transmitida à progénie das plantas, desde que a variante ainda seja uma planta tolerante a herbicidas através de uma maior taxa de acetilação. Também, como aqui é usado, mutante descreve variação como resultado das condições ambientais, como seja radiação, ou como resultado da variação genética em que uma característica é transmitida meioticamente de acordo com leis da hereditariedade bem estabelecidas. A planta mutante, no entanto, de-

ve ainda apresentar uma tolerância a herbicidas através de uma maior taxa de acetilação de acordo com o invento.

Tendo já descrito de um modo genérico o invento, o mesmo será melhor compreendido por referência a exemplos específicos, os quais são aqui incluídos apenas com fins ilustrativos e não pretendem ser limitantes a menos que de outro modo seja especificado.

EXEMPLO 1

Isolamento e purificação de NA-acetiltransferase

Materiais e métodos

Ensaaios enzimáticos

Amostras de enzimas de 1-10 μ l foram adicionadas a tubos Eppendorf de 1,5 ml contendo uma mistura de reacção de 50 mM Hepes- K^+ , pH 7,4, 150 mM KCl, 1mM DTT, 25 μ M / ^3H /acetil-Coenzima A (0,5 μ Ci, / ^3H /acetil-coenzima A da Amersham, acetil-coenzima A não marcado da P-L Biochemicals) e 50 μ M ACTH (1-24) com um volume final de 100 μ l. A mistura do ensaio foi incubada a 30°C durante 30 minutos. A reacção foi parada pela adição de 17 μ l de ácido acético 0,5 M e arrefecida num banho de gelo. As amostras de reacção foram filtradas através de uma membrana SP de 2,5 cm de diâmetro (Cuno Inc.) que tinha sido pré-inchada numa lavagem com 0,5 M ácido acético. As membranas foram lavadas três vezes em 1 ml de ácido acético 0,5M para remover o [^3H] acetil-coenzima A que não reagiu. As membranas parcialmente secas foram contadas num contador de cintilação Beckman LS 3801. A radioactividade na testemunha representou acetilação de compostos endogenos foi subtraída da determinação de cada amostra. Uma unidade de actividade foi definida

como 1 pmole de resíduos acetilo incorporada em ACTH (1-24) em condições de ensaio convencionais.

Purificação de N α -acetiltransferase de levedura

Crescimento celular e armazenamento

Células de levedura estirpe TD 71-8 foram cultivadas aeróbicamente a 30°C em meio YPD (1% de extracto de levedura, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) colhidas na fase log tardia e guardadas a 20°C com 10% (v/v) de glicerol até 4 meses sem perda de actividade.

Extracto Celular

As células foram descongeladas colhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos (Beckman, rotor JS-4,0). As células (800 g, peso molhado) foram res-suspensas em 1 litro de tampão A (sorbitol 1M, três-HCl 50mM, pH7,0, MgCl₂ 10mM, DTT 3mM) contendo 80 mg liticase (Sigma) e a suspensão celular foi agitada muito suavemente). a 30°C durante 45 minutos. Todos os passos subsequentes foram efectua-dos a 4°C. Os esferoplastos foram colhidos por centrifugação a 4000 rpm durante 10 minutos, lavados por ressuspensão suave em 500 ml de tampão A, colhidos por centrifugação e ressuspensos suavemente em 400 ml de Tampão B /10mM Hepes-K⁺, pH7,4, 1,5mM MgCl_a, 10mM KCl e 0,5 mM DTT). Os esferoplastos foram rebenta-dos neste tampão hipotânico fazendo trinta choques com um homo-geneizador de vidro Dcunce e adicionou-se 2,0 M KCl frio para dar uma concentração de KCl final de 0,2M. O homogenato foi suavemente agitado durante 30 minutos e os detritos celulares removidos por centrifugação a 14000 rpm durante 45 minutos (Beckamn, rotor JA 14). A solução do sobrenadante foi concentra-da por ultrafiltração com membrana PM-30 (Anicon, Lexington, MA)

e dialisada durante a noite contra 8 litros de tampão HDG (20 mM HEPES- K^+ , pH 7,4, 0,5 mM DTT, 10% (v/v) glicerol e 0,02% NaN_3) contendo 0,2M KCl.

Cromatografia em DEAE-Sepharose CL-6B

DEAE Sepharose CL-6B (Pharmacia, P-L Biochemicals) foi preparada, desgaseada e usada para encher uma coluna (55x2,5cm) seguindo as instruções do fabricante. A coluna foi lavada com quatro volumes de coluna de tampão HDG contendo 0,2 KCl (para cromatografia com 0,2M KCl) ou 50mM KCl (para cromatografia com gradiente linear de KCl). O sobrenadante dialisado foi aplicado na DEAE Sepharose CL-6B pré-equilibrada em tampão HDG contendo 0,2 M KCl. A actividade de acetiltransferase foi eluida com o mesmo tampão a 24 ml/h. As fracções contendo a actividade de acetiltransferase foram reunidas e concentradas para um volume de 50 ml usando uma membrana de ultrafiltração PM-30. Este eluato concentrado foi dialisado durante a noite contra 4 litros de tampão HDG contendo 50mM KCl e depois aplicado numa coluna de DEAE Sepharose CL-6B pré-equilibrado em tampão HDG contendo 50mM KCl. A coluna foi desenvolvida com um gradiente linear entre 0,05 M (250 ml) e 0,5M (250ml) de KCl em tampão HDG a 24 ml/h e as fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas e concentradas para um volume de 5 ml.

Cromatografia em hidroxilapatite

O eluato concentrado foi dialisado durante a noite contra 4 litros de tampão fosfato de potássio, pH 7,4, 0,5 mM DTT, 10% (v/v) de glicerol, 0,02% NaN_3 e aplicado numa coluna de hidroxilapatite (2,5x40cm) pré-equilibrada com tampão de diálise. A coluna foi desenvolvida com um gradiente linear entre 0,05M (200 ml e 0,5M (200ml) de tampão fosfato

de potássio, pH 7,4, em 0,5 mM DTT, 10% (v/v) de glicerol, 0,02% de NaN_3 e as fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas e concentradas para um volume de 2,5 ml.

Cromatografia em DE-52

Este eluato concentrado foi dialisado durante a noite contra 4 litros de tampão HDG contendo 50mM KCl e depois aplicado numa coluna DE-52 (Whatman: (2,5 x 55 cm) pré-equilibrada em tampão HDG contendo 50 mM KCl. A coluna foi desenvolvida com um gradiente linear entre 0,05M (250 ml) e 0,5 M (250 ml) KCl em tampão HDG a 24 ml/h e as fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas e concentradas para um volume de 1 ml.

Cromatografia em gel Affi-Gel Blue

Este eluato concentrado foi dialisado durante a noite contra 4 litros de tampão HDG contendo 50mM KCl e depois aplicado numa coluna de gel Affi-Gel Blue (1,5 x 25 cm) (Bio-Rad) Pré-equilibrada com tampão HDG contendo 50 mM KCl. A coluna foi desenvolvida com um gradiente linear entre 0,05 M (150 ml) e 1M (150 ml) KCl em tampão HDG a 12 ml/h e as fracções contendo actividade de acetiltransferase foram reunidas e concentradas.

Electroforese em gel de Dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida

E FILTRAÇÃO EM GEL

Amostras de acetiltransferase purificada foram aplicadas em gás de SDS-8% de poliacrilamida e sujeitas a electroforase em condições redutoras, conforme des-

crito por Laemmli, U.K., Nature 227: 680-685 (1970). Para a determinação do peso molecular aplicaram-se paralelamente amostras de miosina (205 000), β -galactosidase (116 000), fosforilase (97 000), albumina bovina (66 000), albumina do ovo (45 000) e anidrase carbônica. As bandas de proteína foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R em metanol-ácido acético. A determinação do peso molecular aparente por filtração em gel foi efetuada usando uma coluna de Sepharose Ch-4B (2,5 x 96 m). O tampão de eluição foi tampão HDG contendo 0,2 M KCl e o caudal foi de 20 ml/h. O volume de eluição da acetiltransferase foi determinado pelo ensaio convencional e o peso molecular aparente calculada a partir dos volumes de eluição relativos das proteínas padrão incluindo tiroglobulina (669 000), apoferritina (443 000), β -amilase (2000 000), álcool-desidrogenase (150 000), albumina (66 000) e anidrase carbônica (20 000).

Análise dos aminoácidos e da sequência da proteína

A composição em aminoácidos foi obtida usando um Beckman 6300 Amino Acid Analyzer após 24 h de hidrólise a 110°C em HCl 6N contendo 0,1% de fenol. A análise da sequência da proteína foi efectuada usando um Applied Biosystems 470 A Proteína Sequencer e um Applied Biosystem 120 A Pth Analyzer.

EXEMPLO 2

Clonagem molecular e sequenciação de um cDNA codificador de N α -acetiltransferase de Saccharomyces Cerevisiae

Materiais e métodos

Análise da sequência proteica de N^α-acetiltransferase

N^α-acetiltransferase foi purificada a partir de levedura como previamente descrito. N^α-acetiltransferase (3 mmole) foi reduzida e alquilada, precipitada com clorofórmio/metanol frio, redissolvida em 0,1M NH₄HCO₃, incubada com trepsina tratada com TPCK (EC 3,4,21,4; Cooper Biomedical, Malvern, PA) (120 pmoles) durante 24 h a 37°C, recuperada por liofilização e dissolvida em hidrocloreto de guanidina 6M em 0,1% CF₃COOH para HPLC.

Os peptídeos tripticos foram separados numa coluna de HPLC Vydac fenil (0,46 x 25 cm) e fracções seleccionadas foram recromatografadas isocráticamente uma ou duas vezes (Wong, W.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7711-7715 (1985)). Os picos cromatográficos foram detectados a 214 e 280 nm, colhidos manualmente e liofilizados. Os peptídeos tripticos foram sequenciados por degradação automática de Edman efectuada com um Applied Biosystems 470A Protein Sequencer e um Applied Biosystems 120 Pth Analyzer (Moore, S., In: Chemistry and Biology of peptides, Meienhofer, J. (ed.), Ann. Arbor Science Ann Arbor, MI, pág. 629-652 (1972)).

Construção e despiste da biblioteca de cDNA

Isolou-se RNA de levedura como descrito por Sherman et al. (Sherman, F., et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor NY (1986)). Seleccionou-se RNA poli (A)⁺ numa coluna de oligo (dt)-celulose (Aviv, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci-USA 69 1408-1412 (1972)). O cDNA foi sintetizado a partir de 10 µg de RNA poli (A)⁺ pelo método de Okayama e Berg (Okayama, H.,

et al., Mol Cell Biol. 2: 161-170 (1982)), com forma modificado por Gubler e Hoffman (Gubler., U. et al. Gene 25:263-269 (1983), excepto 10% da segunda cadeia ser marcada com [^{32}P].

O cDNA foi preparado para ligação a barços gt11 usando um método introduzido por Dr. Brian Seed Department of Molecular Biology, MGH. Após os extremos do cDNA serem tornados cegos com DNA-polimerase de T4, o cDNA foi ligado a adaptadores consistindo em dois oligonucleotídeos: 3'CTC TAAAG'5 e 5'ACACGAGATTTC 3'. Este cDNA foi fraccionado num gradiente linear de 5 a 20% de KOAc (50 ml) usando um rotor Beckman SW55 centrifugado durante 3 h a 50 000 rpm a 22°C. As fracções (0,5 ml) foram colhidas a partir do fundo do tubo. O cDNA foi precipitado pela adição de etanol e poliacrilamida linear (20 µg/ml). O tamanho dos cDNA em cada fracção foi determinada num gel de 0,1% de agarose e as fracções contendo cDNAs entre 1 e 8 Kb foram reunidas. Dez microgramas de DNA de gt11 (Young, R.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1194-1198 (1983)) foi digerido com Eco RI e ligado a adaptadores (3'GTGT GACCAGATCCTCTTAA 5' e 5' CTGGTCTAGAG 3') e precipitado com PEG 8000. 600 mg de DNA de gt11 tendo adaptadores foi ligado a 150 mg de cDNA seleccionado por tamanho tendo adaptadores complementares em 2 µl e encapsidado in vitro (Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982) (Stratagene). *Escherichia coli* estirpe y1088 foi infectada com fago recombinante e a biblioteca foi amplificada uma vez. A frequência de recombinantes foi de aproximadamente 82%.

De entre várias sequências peptídicas, escolheram-se dois peptídeos (peptídeos 27-3 e 11-3-2; Figura 12A) para a construção de duas sondas oligonucleotídicas (N_1 e N_2) baseado na utilização de codões mais provável (Lathe, R., J. Mol. Biol. 183: 1-12 (1985)). As sondas de oligonucleotídeos foram sintetizadas com um sintetizador de DNA Applied Biosystems 380A usando o método de fase sólida baseado

em sílica (Matteucci, M.D., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185-3181 (1981)) e o método de nucleosídeo-fosforamídeto activado com protões (Beaucage, S.L., Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862 (1981)). Os oligonucleotídeos purificados foram isolados a partir das misturas sintéticas brutas por PAGE e marcados com uma actividade específica de $2-8 \times 10^8$ cpm/Mg usando [^{32}P]-ATP (New England Nuclear) e polinucleotídeo-cinase de T4 (New England Biolabs) (Zoeller, M., et al., DNA 3:479-488 (1985)).

No despiste inicial, 5000 000 clones recombinantes da biblioteca de cDNA de levedura em gt11 foram semeados em E. coli Y1088. Fizeram-se transferências de duplicados dos clones para nitrocelulose e os filtros foram preparados para hibridação (Zoeller, M., et al., DNA 3: 479-488 (1985)). Em seguida os filtros foram lavados duas vezes à temperatura ambiente em 6x55C (0,15M NaCl/15mM 42 citrato de sódio (NaCl/lit) contendo 0,1% SDS e 0,05% NaPPi), lavado uma vez a 5°C abaixo da t_d mínima (temperatura de dissociação da sonda baseada no teor G/C) e exposto a filme de raios-X durante 2 a 4 dias. As t_d máxima e mínima foram determinadas para dois conjuntos de sondas oligonucleotídicas redundantes (N_3 e N_4) (Sggs, S.U. et al., Em: Developmental Biology Using Purified Genes, Brown, D. (ed). Academic Press. New York. pág.683-693 (1981)).

Sequênciação de DNA e análise de transferência

Os fragmentos de cDNA foram removidos do DNA dos fagos gt11 recombinantes por digestão com EcoRI. Os fragmentos de cDNA foram separados por electroforese em agarose de ponto de fusão baixo. A banda da DNA correcta foi retirada, o gel fundido a 65°C e o DNA extraído com fenol. Os fragmentos de cDNA purificados foram clonados no plasmídeo Bluescript (Stratagene). Ambas as orientações da sequência completa do gene da N^A -acetiltransferase de levedura (AAAl) foram determinadas por delecção com exonuclease III (Henikoff, S.,

Gene 28: 351-359 (1984)), pelo método de terminação de cadeias didesoxi de Sanger (Snager, F., et al., J. Mol. Biol 94: 441-448 (1975)) modificado para sequenciação de cadeia dupla por Guo et al., (Guo, L. H., et al., Nucle. Acids Res 11, 5521-5539 (1983) e iniciação específica com oligonucleotídeos sintéticos. Todas as enzimas de restrição foram adquiridas à New England Biolabs. Os marcadores de RNA e DNA foram adquiridos à Bethesda Research Laboratories. A membrana de nylon Biotrans foi da INC. O RNA poli(A)⁺ foi analisado por hibridação de transferências Northern (Lehrach, H., Biochemistry 16:4743-4751 (1977); Thomas P.S., Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:5201-5202 (1980)). O DNA genómico foi isolado a partir de levedura / Sherman, F., et al Methods in, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986)), digestão com enzimas de restrição e analisado por hibridação de transferências Southern (Southern, E., J. Mol. Biol 98: 503-517 (1975)). O cromossoma portador do gene AAAl foi localizado por hibridação com um cromo-di-hibridizãdor de Saccaromyces) (i.e. uma transferência cromossômica de levedura).

Análise de Peptídeos trípticos da N^α-acetiltransferase

O método adoptado para a identificação e clonagem das sequências de cDNA derivado de mRNA de N^α-acetiltransferase utiliza sondas oligonucleotídicas que foram construídas com base nas sequências de aminoácidos de peptídeos trípticos de N^α-acetiltransferase purificados e nos dados de frequência de utilização de codões (Lathe, R., J. Mol. Biol 183:1-12 (1985)). Os péptidos trípticos da N^α-acetiltransferase de levedura, foram separados por HPLC de fase reversa e colhidos em 62 conjuntos representando picos distintos ou patamares (Figura 11). Três nanomoles de N^α-acetiltransferase foi reduzido alquilado, digerido com tripsina e cromatografado numa coluna de HPLC Uydac fenil 0,46 x 25cm com 0,1% de CF₃COOH num gradiente linear de 0-60% de CH₃CN durante 2 h. Após uma

ou duas separações isocráticas adicionais por HPLC para resolver outros peptídeos tripticos individuais sequenciáveis (Wong, W.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 82:7711-7715 (1985)), determinaram-se as sequências de 16 peptídeos, compreendendo aproximadamente 30% de toda a molécula de N^K-acetiltransferase.

Síntese das sondas oligonucleotídicas

Dois oligonucleotídeos sintéticos baseados na utilização de códons com 57 bases (N1) e 48 bases (N2), correspondendo à sequência de um peptídeo de 19 (peptídeo 27-3) e 16 resíduos (peptídeo 11-3-2), respectivamente, foram usados no despiste inicial da biblioteca de cDNA (Figura 12A). Em adição, duas sondas oligonucleotídicas degeneradas de 23 (5'CCXTTGACYTTY TTR CAAGATAA 3') e 20 bases (3'TCRTCRGCATYTG RAART A' 5') com 64 e 32 vezes de redundância, designadas N₃ e N₄, foram sintetizadas com base nos dados de sequenciação dos peptídeos, 29-1 e 10-3-1, respectivamente. A utilização de quatro sondas oligonucleotídicas derivadas de quatro sequências de aminoácidos discretas permitiu a identificação inequívoca dos clones de cDNA codificadores de N^K-acetiltransferase. As análises das sequências proteicas foram completadas com rendimentos repetitivos entre 87% e 93% para 100-200 nmoles de cada peptídeo.

Clonagem do cDNA de N^K-acetiltransferase de levedura

Após despiste inicial de 500 000 clones recombinantes de cDNA da biblioteca de cDNA de levedura em λ gt11, onze clones hibridaram com ambos os oligonucleotídeos N1 e Nr. Estes clones designados N¹ a N¹¹, também hibridaram com os oligonucleotídeos N3 e N4 e as suas inserções de cDNA foram analisados por digestões com enzimas de restrição e análise de transferências Southern. A digestão com EcoRI revelou inserções sem os locais EcoRI internos e variando entre

2,0 a 2,7 Kb. As seis inserções de cDNA maiores foram subclonadas como fragmentos Eco RI no plasmídeo Bluescript e efectuaram-se mapeamentos com enzimas de restrição adicionais, análises de transferências Southern e análise de sequências de nucleotídeos. Os seis clones de cDNA (pBN1, pBN3, pBN7, pBN9, pBN10 e pBN11) apresentaram mapas de restrição idênticos. (Figura 12B).

Análise da sequência dos clones de cDNA

A sequência de nucleotídeos completa, ambas as orientações, do pBN1 foi determinada usando deleções com exonuclease III e o método de terminação de cadeias didesoxi para cadeias duplas. A sequência da proteína traduzida a partir da sequência da inserção de cDNA de 2,71 Kb do pBN1 continha sequências idênticas às determinadas a partir da análise de sequência proteica de 16 peptídeos tripticos (Figura 12C). No entanto, houve um codão de paragem situado nos nucleotídeos 1409-1411 e a fase de leitura putativa mudou depois desta codão de paragem. Assim, as sequências de nucleotídeos dentro da região correspondente dos outros 5 clones de cDNA foram determinadas usando iniciadores oligonucleotídicos sintéticos. Estes 5 clones tinham cada um, um T adicional que mantinha uma grelha de leitura aberta. É evidente que o codão de terminação no pBN1 foi introduzido por deleção de um T no nucleotídeo 1410, presumivelmente resultando de uma ausência de fidelidade para a reação da transcriptase reversa durante a síntese de cDNA.

A sequência de nucleotídeos completa do cDNA de N^α-acetiltransferase de levedura está apresentada na Figura 12C. O sítio de iniciação da tradução foi determinado inequivocamente, porque existe apenas um codão ATG (nucleotídeo 22-24), que é precedido por um codão de terminação em fase (nucleotídeos 13-15), situado a montante e na mesma grelha de leitura da sequência de DNA codificadora de um peptídeo triptico (resíduos 61-82) que precede a metionina seguinte.

te na sequência situada no resíduo 101. Existe uma grelha de leitura aberta de 2562 nucleotídeos codificando os 845 resíduos de aminoácidos da N^α-acetiltransferase, um codão de terminação (TAG) nos nucleotídeos 2584-2586 e um sinal de poliadenilação (ATAAAA) situado 18 nucleotídeos a montante de cauda poli(A).

Comparação dos dados de sequenciação de DNA e proteína para o cDNA de N^α-acetiltransferase de levedura com as bases de dados de sequências de DNA e de proteína

O "EMBL Nucleic Acid Database" revelou uma identidade de 842 bases entre uma região 3' do cDNA codificador de N^α-acetiltransferase, começando no nucleotídeo 1858 e terminando no nucleotídeo 2699 e a sequência de DNA genómica e montante do extremo 5' do gene STR2 situado no cromossoma 4 (resultados não publicados de Shore, D., et al. (Shore, D., et al., EMBO J. 3: 2817-2823 (1984)) e depositada no "EMBL Nucleic Acid Database"). As comparações entre a sequência de proteína da N -acetiltransferase de levedura e a colina-acetiltransferase de fígado de galinha (Deguchi, T. et al., J. Biol. Chem 263: 7528-7533 (1988)) revelou uma semelhança percentual de 10%, 12%, 12%, 14%, e 15%, respectivamente, se bem que haja sequências de 6 a 16 resíduos de aminoácidos que têm semelhanças percentuais entre 44% e 83% (Devereux, J. et al.; Nucl. Acids. Res. 12:387-395

Análises de transferências Northern, Southern e Cromossónicas

A análise de transferências Northern de mRNA poli(A)⁺ de levedura usando uma sonda de cDNA de N^α-acetiltransferase de levedura marcada com [³²P]

(pBN1) revelou uma banda de RNA de 2,7 kb. O DNA de levedura (10 ug) foi digerido com as enzimas de restrição indicadas. Os fragmentos de restrição foram sujeitos a electroforese em 0,8% de agarose em tampão Tris-borato. O DNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridado com cDNA de AAAl marcado com ^{32}P (derivado de pBN1) durante 24 horas e lavado (Southern, E., J. Mol Biol. 98: 503-517 (1975)).

A análise de transferência Southern de DNA genómico de levedura digerido com enzimas de restrição revelou que os tamanhos dos fragmentos eram semelhantes aos tamanhos dos fragmentos de restrição do cDNA de N-acetiltransferase de levedura (pBN1) (Figura 12B). O RNA poli(A)⁺ de levedura (10 mg) foi sujeito a electroforese num gel de 1,2% de agarose/formaldeído (Maniatis, T., et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982). O mRNA foi transferido para uma membrana de nylon e hibridado com cDNA de AAAl marcado com ^{32}P (derivado de pBN1) durante 24 horas e lavado (Lehrach, H., Biochemistry 16:4743-4751 (1977); Thomas, P.S. Proc. Natl. Acad. Sci USA 77:5201-5202 (1980)). A faixa de gel contendo os marcadores de RNA foi cortada, corada com brometo de etídico e usada para determinação do peso molecular do mRNA poli(A)⁺ de levedura.

A análise de transferência cromossónica com a sonda indica que o gene da N-acetiltransferase de levedura (AAAl) está situado no cromossoma IV. Um gel de agarose do DNA cromossómico de levedura foi hibridado com cDNA de AAAl marcado ao acaso com ^{32}P (derivado do pBN1) durante 24 horas e lavado de acordo com as recomendações do fabricante.

Perfil de hidrofobicidade da N^α-acetiltransferase de levedura

O perfil de hidrofobicidade na Figura 13 foi determinado usando o algoritmo de kyte e Doolittle (kyte, J. et al., J. Mol Biol 157:105-132 (1982)) com um tamanho de janela de 9 (Figura 13). A proteína é rica em aminoácidos com carga, incluindo 96 resíduos de lisina, 37 de arginina 59 de ácido aspártico e 60 de ácido glutâmico. Em adição, existe uma região hidrofílica prolongada entre os resíduos 508 e 720, que é rica em resíduos associados às conformações B (Chem, P.Y. et al., Em: Peptides:Proceedings of the Fifth American Peptide Syuposium, Goodman, M. et al., (eds), Jhon Wileu and Sons, New York, pág. 284-287 (1977)).

Se bem que o que foi descrito se refira a realização particulares preferidas, compreende-se que o presente invento não lhes está limitado. As pessoas famialia rizadas com a matéria ocorrerá que várias modificações podem ser feitas às realizações divulgadas e que tais modificações são para serem incluídas no âmbito do presente invento.

REIVINDICAÇÕES

1a. - Método para a recuperação de N α -acetiltransferase substancialmente purificada a partir de uma amostra contendo N α -acetiltransferase, caracterizado por compreender; os passos seguintes:

- (a) recuperação de N α -acetiltransferase bruta a partir de uma amostra contendo, a referida N α -acetiltransferase;
- (b) sujeição da referida N α -acetiltransferase bruta do passo (a) a cromatografia de permuta iónica para se obter fracções activas de N α -acetiltransferase definida como 1 pmole de resíduos acetilo incorporados na hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) nas condições de ensaio padrão;
- (c) aplicação das referidas fracções activas de N α -acetiltransferase do passo (b) a cromatografia de adsorção com hidroxapatite para se obter N α -acetiltransferase parcialmente purificada; e
- (d) purificação de N α -acetiltransferase até à homogeneidade através da aplicação da referida N α -acetiltransferase parcialmente purificada do passo (c) a uma cromatografia de afinidade e eluição da N α -acetiltransferase substancialmente purificada, tendo as seguintes características:
 - (a) um peso molecular de aproximadamente 180 000;
 - (b) duas subunidades peptídicas tendo pesos moleculares de aproximadamente 95 000 cada;
 - (c) pH óptimo 9,0;
 - (d) actividade máxima nas temperaturas entre 30° e 42°C em que uma unidade de actividade é definida como 1 pmole de resíduos acetilo incorporados em hormonas adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) nas condições padrão;

- (e) inibida por catiões divalentes Cu^{2+} e Zn^{2+} ; e
- (f) especificidade do substracto dependente do residuo amino-terminal.

2a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma N α -acetiltransferase tendo actividade enzimática superior a 100 em que uma unidade de actividade é definida como 1 pmole de residuos acetilo incorporados na hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) em condições de ensaio padrão.

3a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma N α -acetiltransferase tendo ~~tendo~~ actividade enzimática superior a 300 em que uma unidade de actividade é definida como 1 pmol de residuos acetilo incorporados na hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) nas condições de ensaio padrão.

4a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma N α -acetiltransferase tendo actividade enzimática superior a 1000 em que uma unidade de actividade é definida como 1 pmole de residuos acetilo incorporados na hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) em condições de ensaio padrão.

5a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma N~~K~~-acetiltransferase se tendo actividade enzimática superior a 7000 em que uma unidade de actividade é definida como 1 pmole de residuos acetilo incorporados na hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (aminoácidos 1-24) em condições de ensaio padrão.

6a. - Processo para a preparação de uma molecula de DNA recombinante, caracterizado por se incorporar na referida molécula uma sequência genética codificadora do N~~K~~-acetiltransferase tendo a sequencia de aminoácidos mostrada na Figura seguinte:

22	ATG	TCT	AGG	AAA	AGA	AGT	ACT	AAG	CCC	AAG	CCA	GCA	GCT	AAA	ATA	GCT	TTG	AAA	AAA	GAA	AAT	GAC	CAG
1	M	S	R	K	R	S	T	K	P	K	P	A	A	K	I	A	L	K	K	E	N	D	Q
91	TTC	CTC	GAG	GCA	TTG	AAA	CTA	TAC	GAA	GGG	AAG	CAA	TAC	AAA	AAA	TCT	CTC	AAG	CTG	CTA	GAC	GCA	ATT
24	F	L	E	A	L	K	L	Y	E	G	K	Q	Y	K	K	S	L	K	L	L	D	A	I
160	TTG	AAA	AAA	GAC	GGT	AGT	CAC	GTT	GAT	TCC	TTG	GCT	TTA	AAG	GGT	CTT	GAT	TTA	TAT	TCT	GTA	GGT	GAG
47	L	K	K	D	G	S	H	V	D	S	L	A	L	K	G	L	D	L	Y	S	V	G	E
229	AAA	GAT	GAC	GCT	GCT	TCC	TAC	GTG	GCT	AAT	CCC	ATC	AGA	AAA	ATT	GAA	GGC	GCT	TCA	GCA	TCA	CCA	ATC
70	K	D	D	A	A	S	Y	V	A	N	A	I	R	K	I	E	G	A	S	A	S	P	I
298	TGC	TGT	CAT	GTA	TTA	GCT	ATC	TAC	ATC	AGA	AAC	ACC	AAA	GAG	TAC	AAA	GAA	TCT	ATT	AAA	TGG	TTC	ACG
93	C	C	H	V	L	G	I	Y	M	R	N	T	K	E	Y	K	E	S	I	K	W	F	T
367	GCA	GCT	TTG	AAC	AAT	GGC	TCC	ACT	AAC	AAG	CAA	ATA	TAT	AGA	GAC	TTA	GCA	ACT	TTG	CAA	TCA	CAA	ATT
116	A	A	L	N	N	G	S	T	N	K	Q	I	Y	R	D	L	A	T	L	Q	S	Q	I
436	GGC	GAT	TTT	AAA	AAT	GCT	TTA	GTG	TCC	AGG	AAA	AAA	TAT	TGG	GAA	GCA	TTT	CTT	GCT	TAC	CCT	GCC	AAC
139	G	D	F	K	N	A	L	V	S	R	K	K	Y	W	E	A	F	L	G	Y	R	A	N
505	TGC	ACA	TCA	TTG	GCT	GTG	GCA	CAA	GAT	GTG	AAC	GGT	GAG	AGG	CAA	CAA	GCT	ATT	AAC	ACT	TTA	TCT	CAG
162	W	T	S	L	A	V	A	Q	D	V	N	G	E	R	Q	Q	A	I	N	T	L	S	Q
574	TTT	CAA	AAA	CTC	GCT	GAG	GGA	AAA	ATA	TCT	GAT	TCC	GAG	AAA	TAT	GAA	CAC	AGC	GAG	TGT	TTA	ATG	TAC
185	F	E	K	L	A	E	G	K	I	S	D	S	E	K	Y	E	H	S	E	C	L	M	Y
643	AAA	AAC	GAC	ATT	ATG	TAT	AAA	GCT	GCC	AGT	GAT	AAC	CAA	GAC	AAG	TTA	CAA	AAT	GTA	TTG	AAA	CAT	TTG
208	K	N	D	I	M	Y	K	A	A	S	D	N	Q	D	K	L	Q	N	Y	L	K	H	L
712	AAT	GAT	ATC	GAG	CCA	TGC	GTC	TTT	GAT	AAA	TTT	GGT	TTA	TTA	GAG	AGA	AAA	GCA	ACT	ATT	TAC	ATG	AAA
231	N	D	I	E	P	C	V	F	D	K	F	G	L	L	E	R	K	A	T	I	Y	M	K
781	TTG	GGT	CAA	TTG	AAA	GAC	GGC	TCC	ATT	GTT	TAT	AGA	ACT	CTG	ATC	AAG	AGA	AAT	CCA	GAT	AAT	TTT	AAG
254	L	G	Q	L	K	D	A	S	I	V	Y	R	T	L	I	K	R	N	P	D	N	F	K
850	TAC	TAC	AAA	TTA	CTG	CAA	GTA	TCC	TTG	GGA	ATC	CAA	AGT	GAC	AAT	AAA	TTG	AAG	AAG	GCT	TTG	TAT	GGA
277	Y	Y	K	L	L	E	V	S	L	G	I	Q	G	D	N	K	L	K	K	A	L	Y	G
919	AAA	CTT	GAA	CAA	TTT	TAT	CCA	AGA	TGC	GAA	CCA	CCC	AAA	TTT	ATT	CCA	TTA	ACT	TTT	CTT	CAA	GAC	AAA
300	K	L	E	Q	F	Y	P	R	C	E	P	P	K	F	I	P	L	T	F	L	Q	D	

1333 GCT GCA ATT TTG GAG GAA GGT AGG CAA CTT GAT TTG CAG GAT AGA TTT ATC AAC TGT AAA ACG GTT AAG
438 A G I L E E G R Q L D L Q D R F I M C K T V K

1402 TAC TTT TTA ACG GCT AAC AAT ATC GAC AAG GCG GTG GAA GTC GCG TCC CTT TTC ACC AAA AAC GAT GAT
461 Y F L R A N N I D K A V E V A S L F T K N D D
-----15-1-1-----

1471 TCT GTT AAT GGT ATT AAG GAC TTA CAC CTT GTG GAA GCT TCT TCG TTC ATC GTA GAA CAG GCA GAA GCC
484 S V N G I K D L H L V E A S W F I V E Q A E A

1540 TAT TAT AGA CTA TAC CTG GAT AGA AAA AAG AAA TTA GAC GAT TTA GCA TCG CTA AAA AAA CAG CTT GAA
507 Y Y R L Y L D R K K K L D D L A S L K K E V E

1609 AGT CAT AAA ACC GAA CAA ATT GCG AAT GAT ATC AAA GAA AAC CAA TCG CTT GTT CCG AAA TAT AAA GGT
530 S D K S E Q I A N D I K E N Q W L V R K Y K G

1678 TTG CCG CTG AAA AGA TTC AAC GCT ATT CCA AAG TTT TAT AAA CAA TTC GAA GAT GAC CAG TTG GAT TTC
553 L A L K R F N A I P K F Y K Q F E D D Q L D F

1747 CAT TCA TAC TGT ATG AGA AAA GGT AGG CCA AGA GCC TAT CTG GAC ATG TTA GAA TCG GCA AAG GCT CTT
576 H S Y C M R K G T P R A Y L E M L E W G K A L
-----27-1-----

1816 TAT ACC AAA CCC ATG TAT GTT CCG GCA ATG AAG CAA GCA TCA AAG CTT TAC TTT CAA ATG CAT GAT GAT
599 Y T K P M Y V R A M K E A S K L Y F Q M H D D
-----9-2-2-----

1885 CCG TTA AAA ACA AAG TCC GAT TCT TTA GAT GAA AAT TCA GAT GAA ATC CAA AAT AAT GCC CAA AAT ACT
622 R L K R K S D S L D E N S D E I Q N M G Q N S
-----10-3-1-----

1954 ACC AGC CAA AAG AAA AAA GCT AAG AAG GAA GCA GCC GCT ATG AAC AAA CCG AAA GAA ACT GAA GCC AAG
645 S S Q K K K A K K E A A A M N K R K E T E A K

2023 AGT GTT GCT GCT TAT CCG ACT GAT CAA GAT AAC GAT GTA TTC GCG GAA AAG TTG ATT GAA ACC TCC ACT
668 S V A A Y P S D Q D N D V F G E K L I E T S T
-----11-3-2-----

2092 CCA ATG GAG GAC TTC GCT ACC GAA TTT TAT AAT AAC TAC TCC ATC CAA CTC AGA GAA GAC GAA AGG GAT
691 P M E D F A T E F Y N N Y S M Q V R E D E R D
-----35-2, 39-1-----

2161 TAT ATT TTG GAC TTT GAA TTT AAC TAC AGA ATT GGA AAG TTA GCT TTG TCG TTT GCT TCT CTA AAC AAA
714 Y I L D F E F N Y R I G K L A L C F A S L N X

2230 TTC GCT AAG AGA TTT GCG ACC ACG AGC GGT TTA TTT GGT AGT ATG GCC ATT GTT TTG TTA CAT GCC ACA
737 F A K R F G T T S G L F G S M A I V L L H A T

2299 AGA AAC GAC ACC CCC TTT GAT CCA ATT TTG AAG AAA GTA GTC ACC AAG AGC CTT GAA AAA GAG TAT TCT
760 R N D T P F D P I L K K V V T K S L E K E Y S

2368 GAA AAT TTC CCA TTA AAC CAA ATA TCT AAC AAT AGC TTC GAT TCG CTG AAT TTC TAC CAA GAA AAA TTC
783 E N F P L N E I S N M S F D W L M F Y Q E K F

2437 GGT AAG AAT GAT ATA AAT CCG CTG CTA TTT CTG TAT CCG TAT CCG GAT GAT GTT CCG ATC GCA AGC TCT
806 G K N D I N G L L F L Y R Y R D D V P I G S S

2506 AAT TTG AAA GAA ATG ATT ATT ACC AGT CTT TCT CCC TTG CAG CTT CAC TCC CAG AAC GAA ATT CTA CAG
829 N L K E M I I S S L S P L E P H S Q N E I L Q

2575 TAT TAC TTG TAG CCGCAACTCCTCAATGCTCAATTAACTCTTACTTAATTATGTATATATTTTATGTATATGCTTATATGCA
852 Y V L

2662 TGCCCATATGCTCATAAAACATACATTGTTATAGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA....3'

7ª. - Veículo de expressão, caracteriza-
do por ser um vector de DNA recombinante que contém a molécula de
DNA recombinante preparada de acordo com a reivindicação 6.

8a. - Celula hospedeira caracterizada por ser transformada com o veiculo de expressão da reivindicação 7.

9a. - Método para a produção de uma planta com acetilação aumentada caracterizado por compreender a transformação de uma planta com a sequência genética codificadora da molecula de DNA recombinante da reivindicação 6.

Lisboa, 3 de Fevereiro de 1989



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial de Propriedade Industrial
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.^a
1200 LISBOA

11

1/10

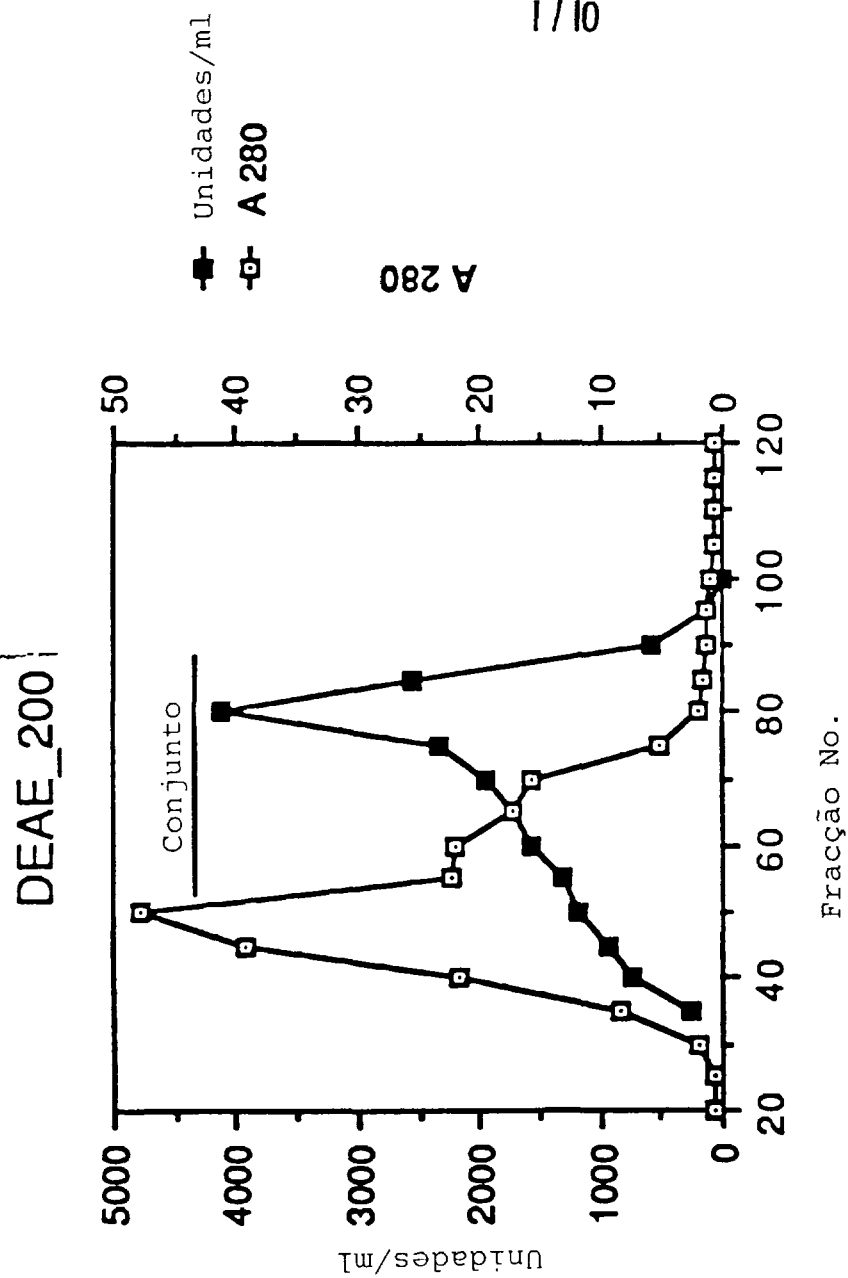
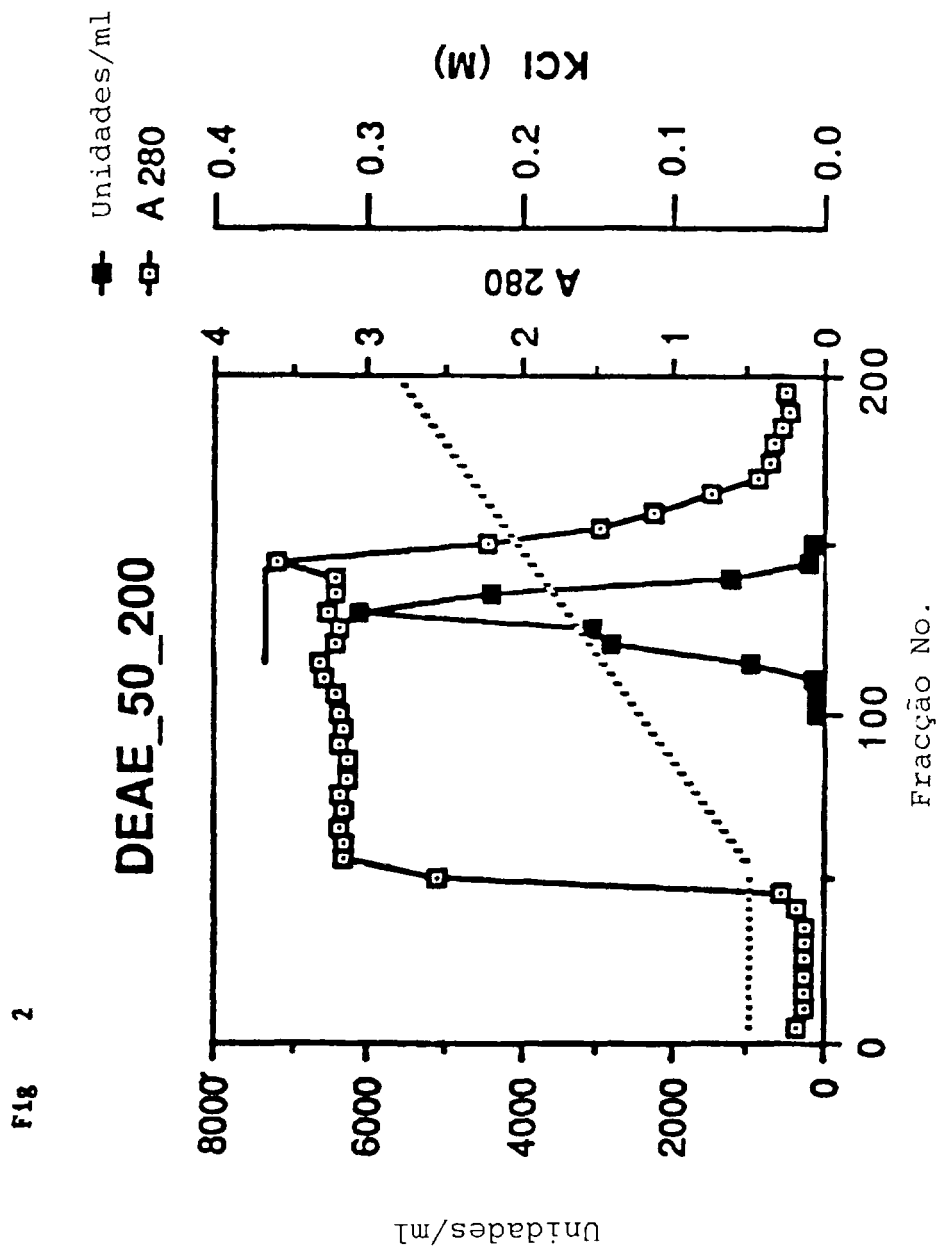


Fig 1

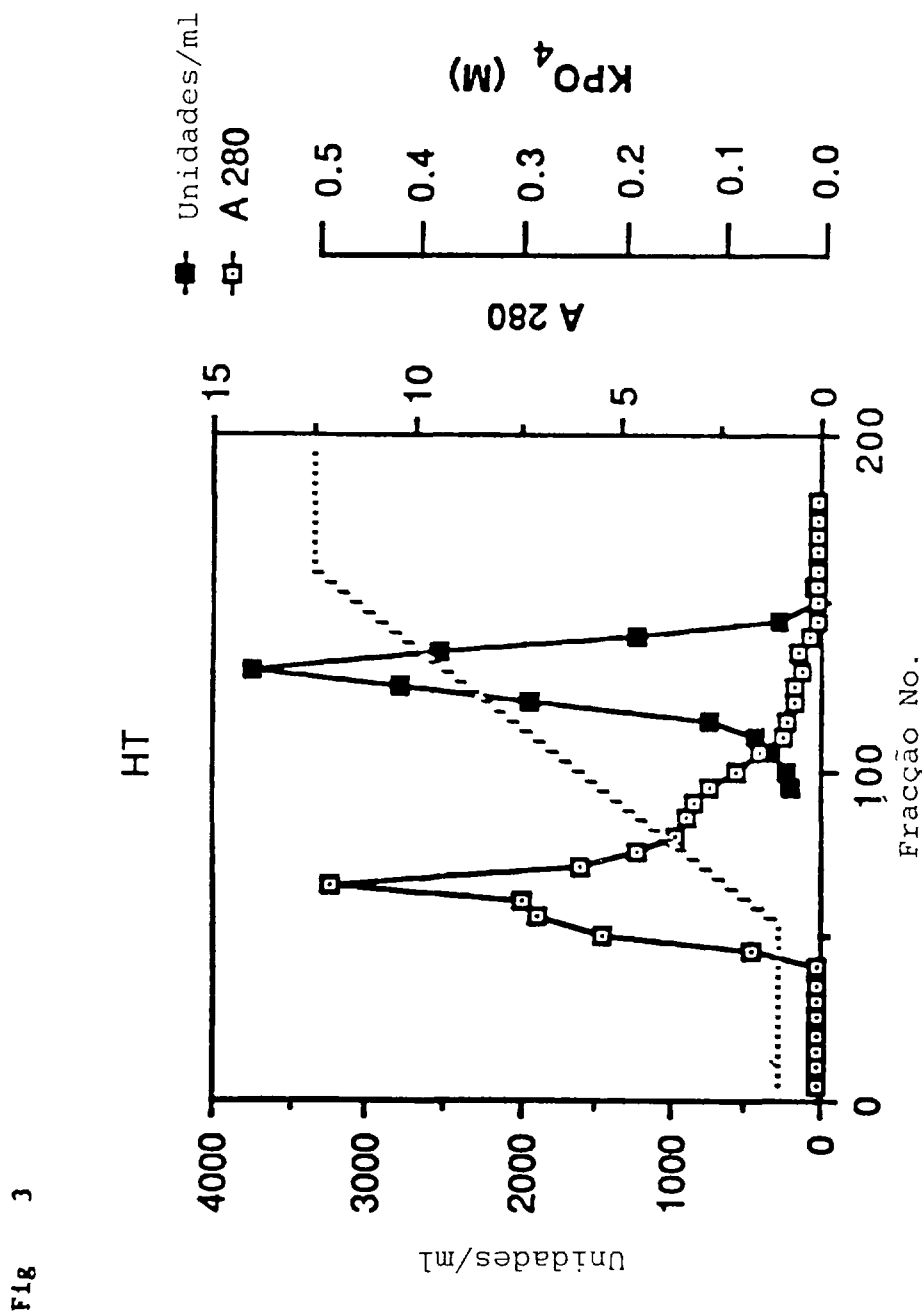
[Handwritten signature]

2/10

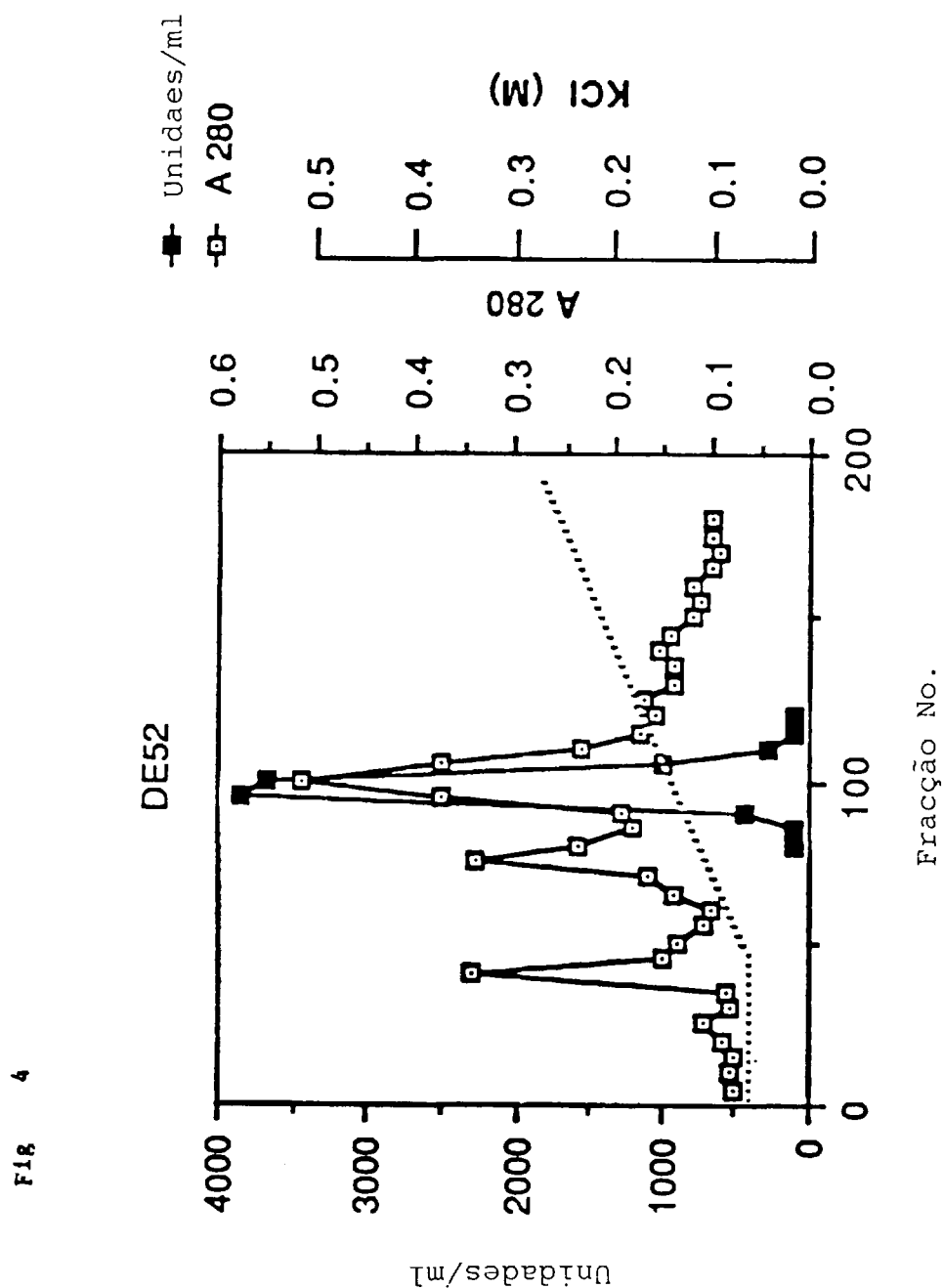


11

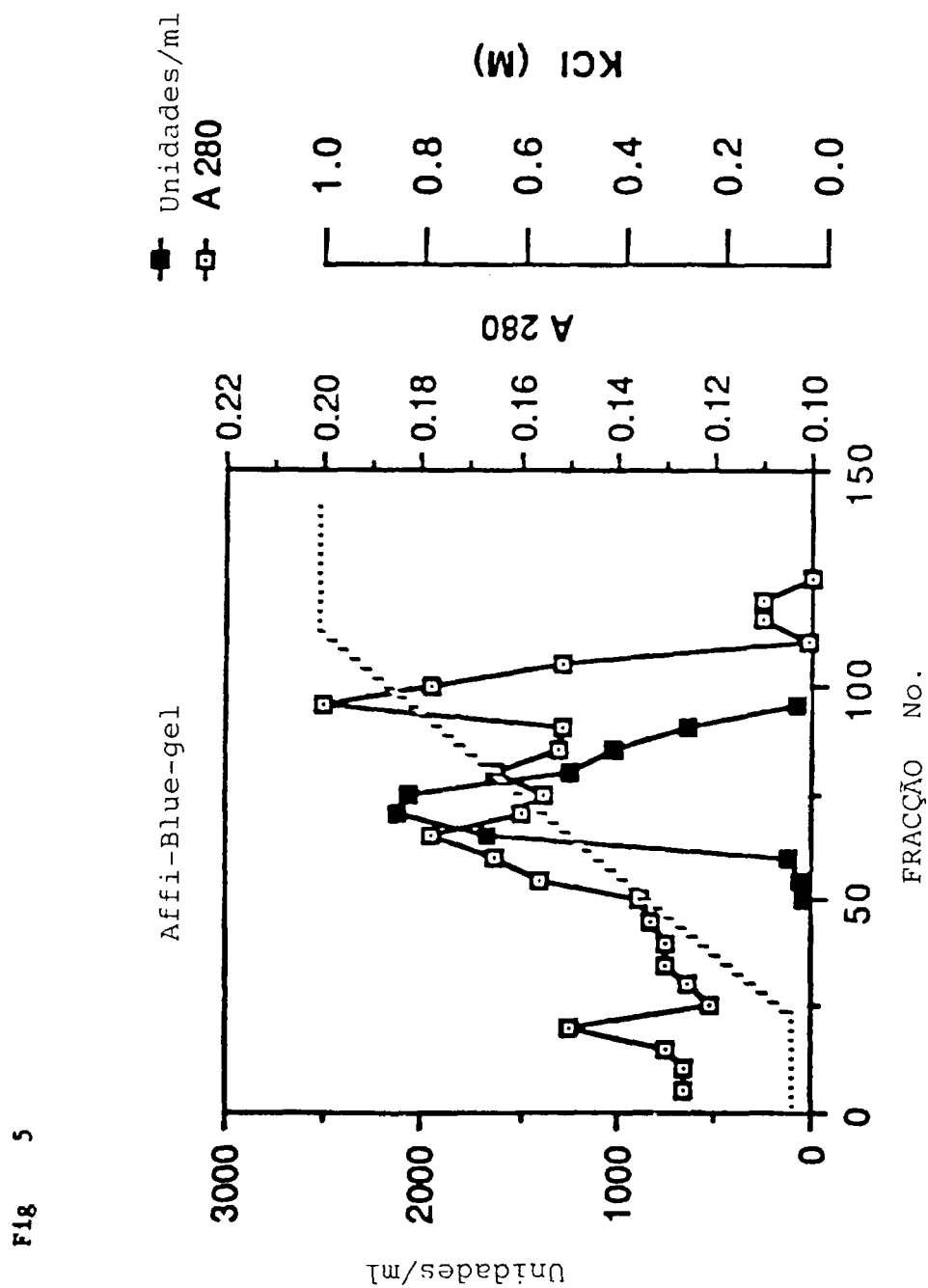
3/10



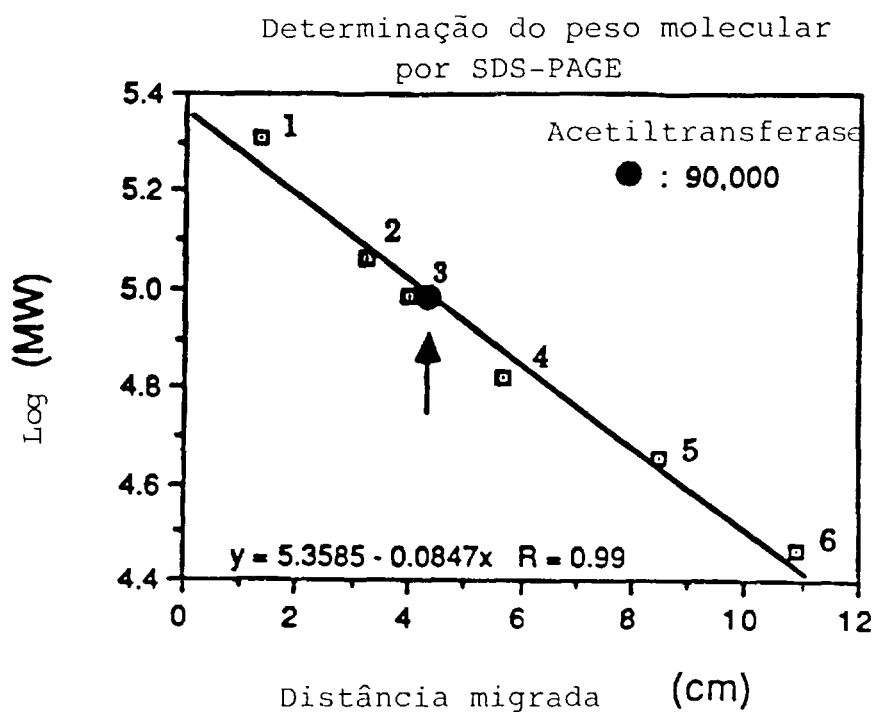
4/10



5 / 10



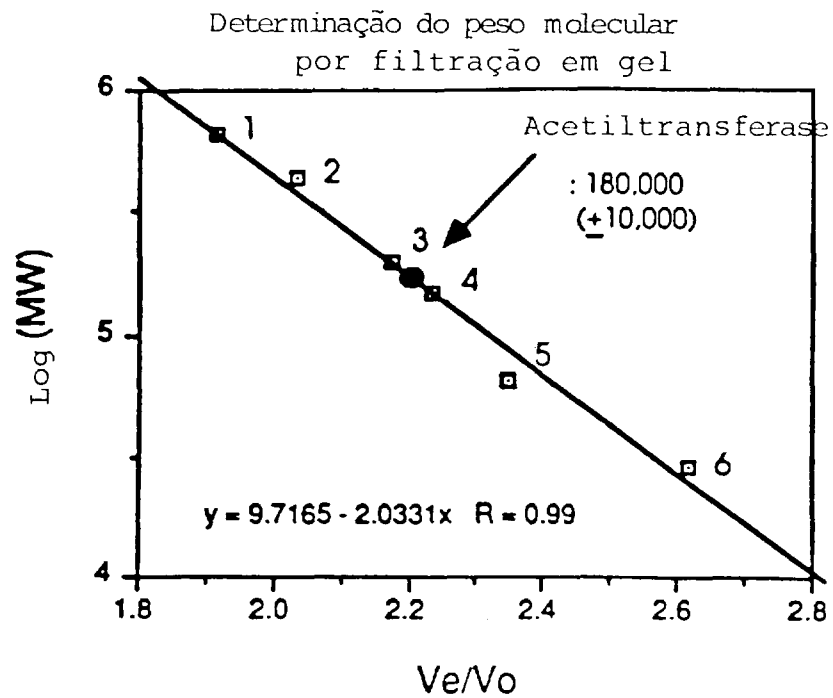
6 / 10



- 1: miosina (205,000)
- 2: β -galactosidase (116,000)
- 3: Fosforilase (97,400)
- 4: Albumina bovina (66,000)
- 5: Album.do ovo (45,000)
- 6: Anidrase carbônica (29,000)

Fig 6

7 / 10



- 1: Tiroglobulina (669.000)
- 2: Apoferritina (443.000)
- 3: β-amilase (200.000)
- 4: Álcool-desidrogenase (150.000)
- 5: Albumina (66.000)
- 6: Anidrase carbónica (29.000)

Fig 7

8 / 10

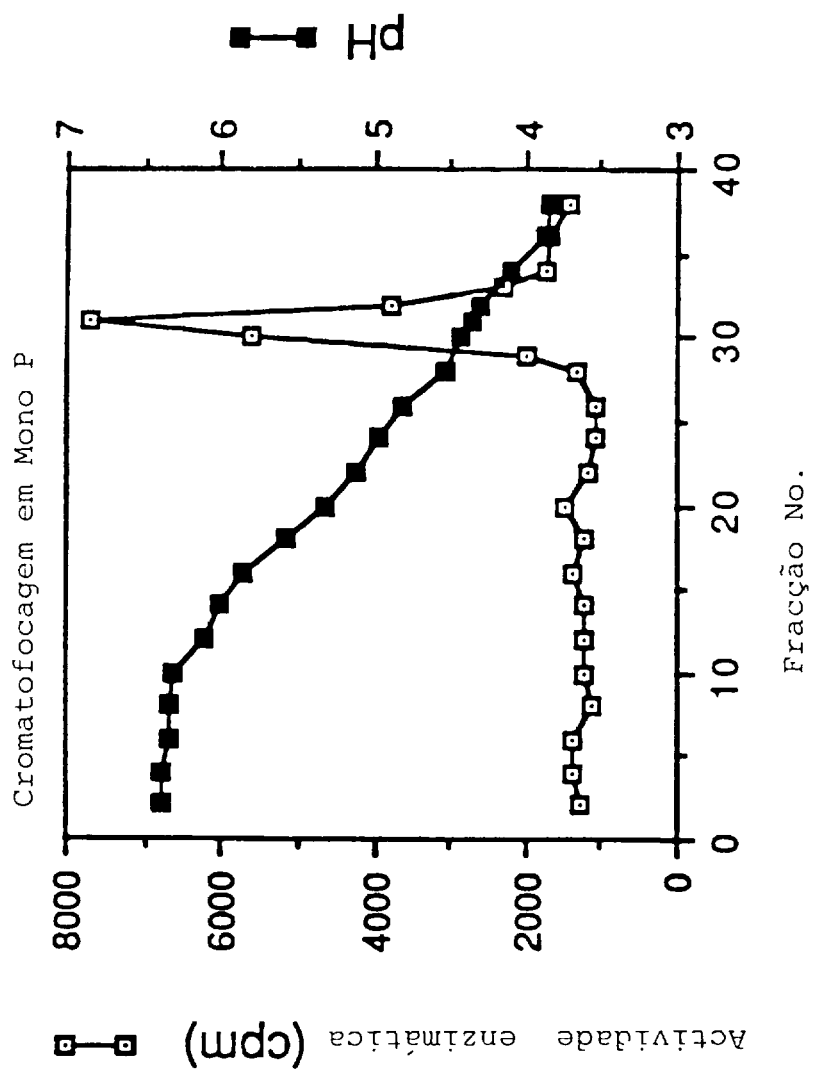


Fig 8

Handwritten signature or mark.

9 / 10

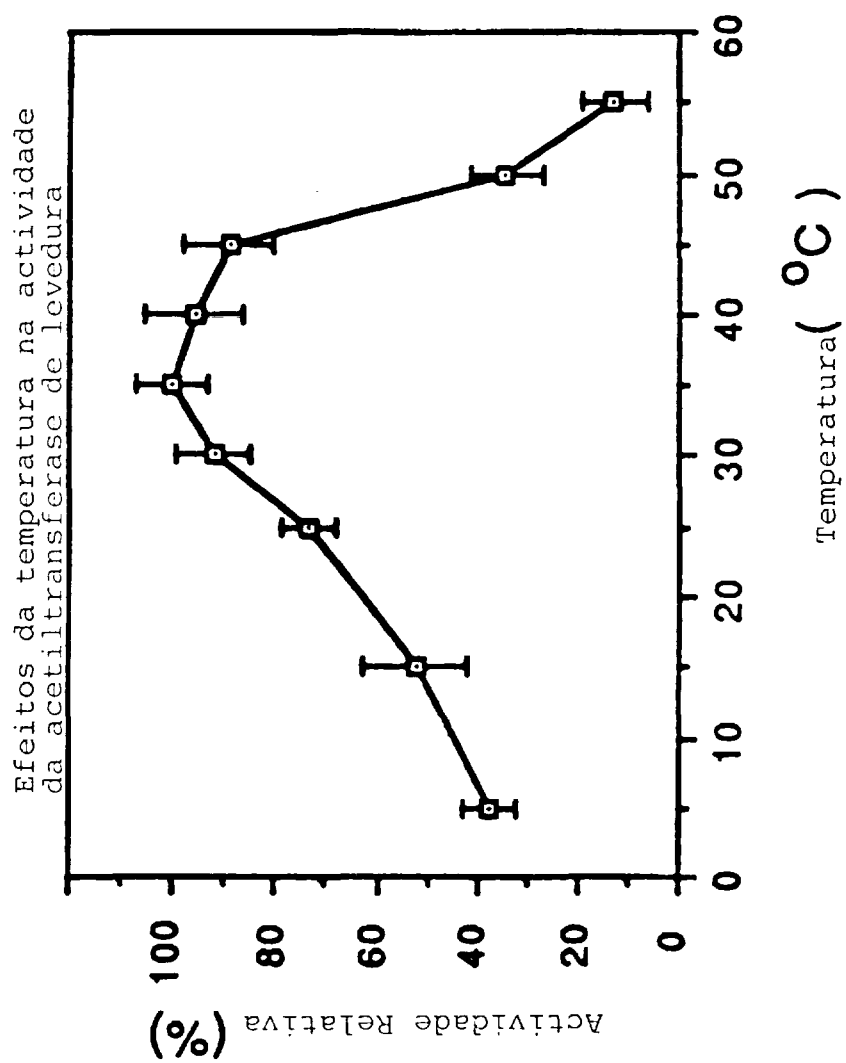
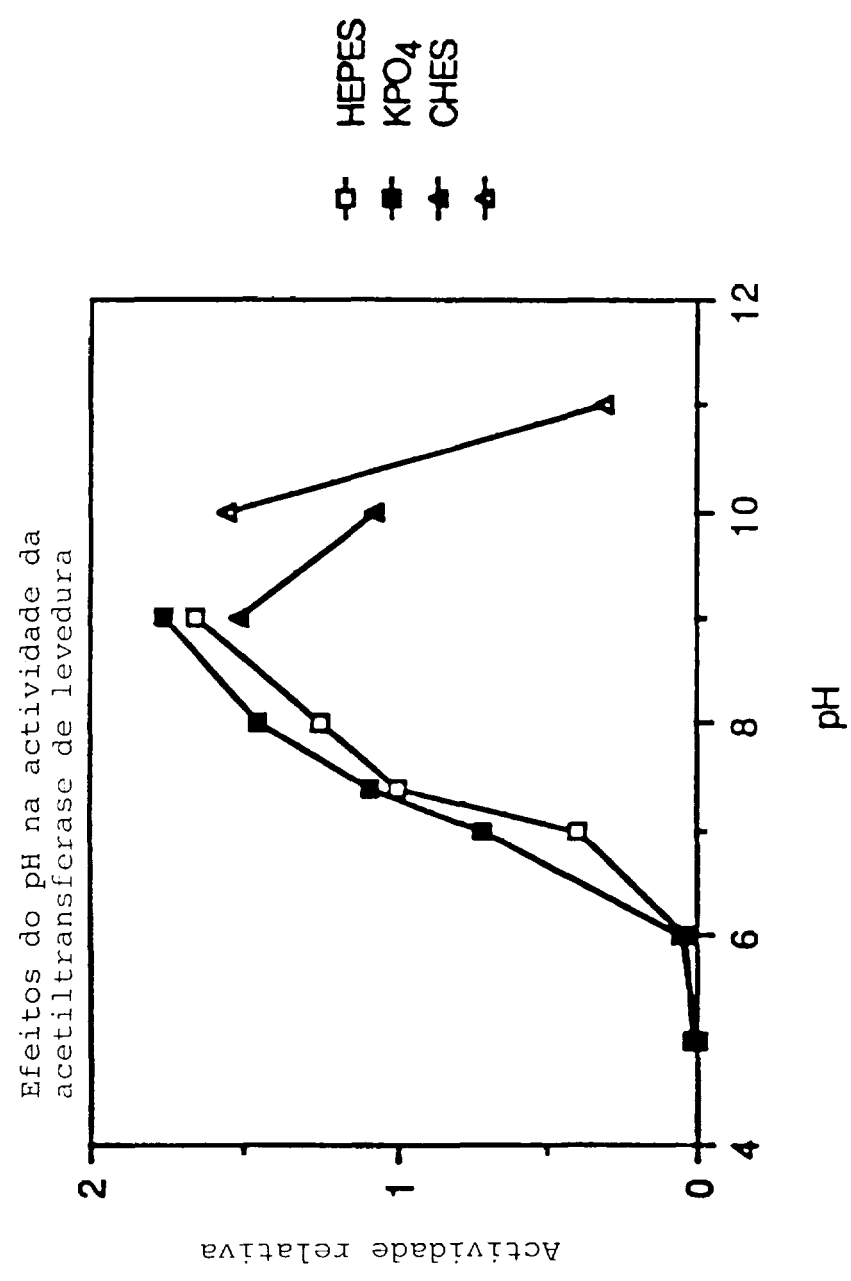


Fig 9

10 / 10

Fig 10



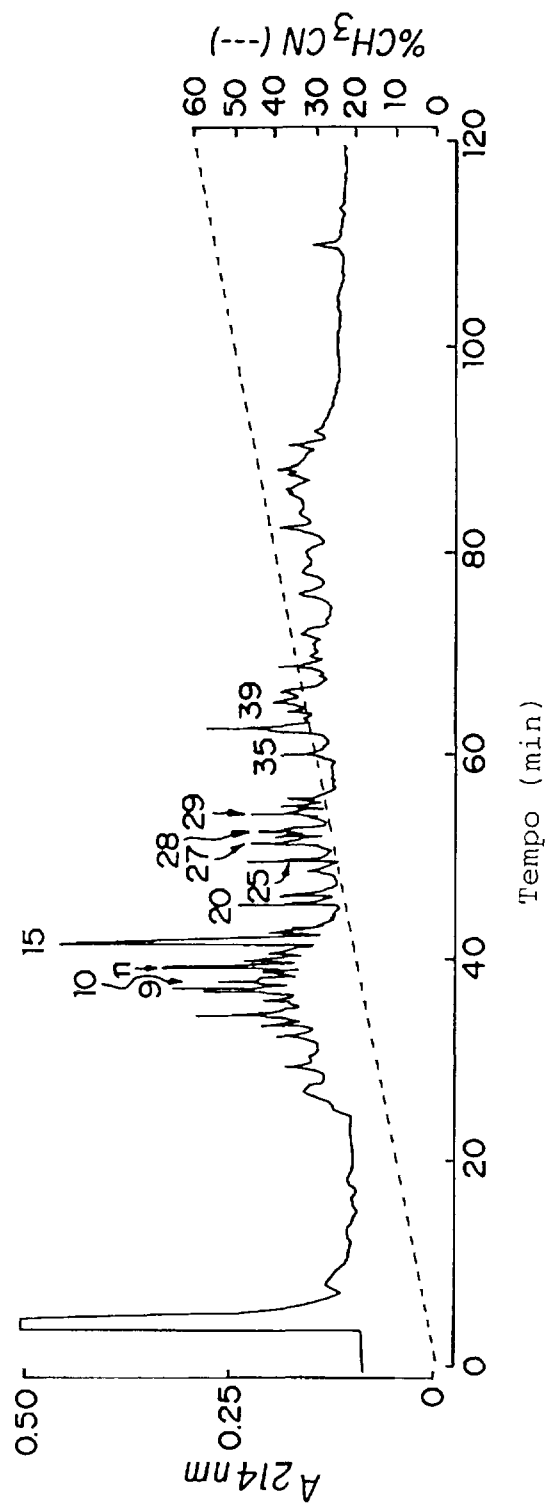


FIG.11

A

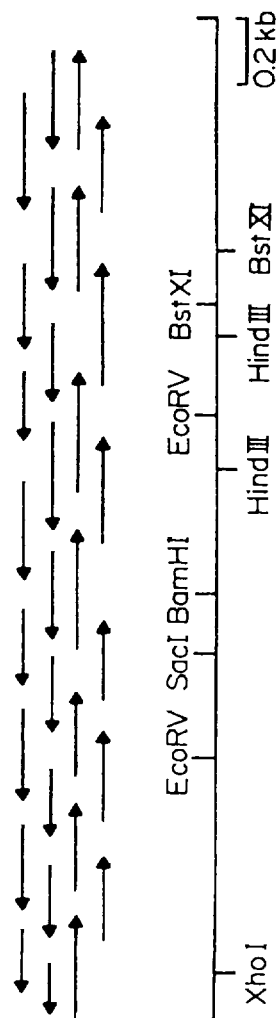
[illegible]

FIG. 12A

C

5' TTTCCAGGACCCTAACGAAGT

22 ATG TCT AGG AAA AGA AGT ACT AAG CCC AAG CCA GCA GCT AAA ATA GCT TTG AAA AAA GAA AAT GAC CAG
 1 M S R K R S T K P K P A A K I A L K K E N D Q
 91 TTC CTC GAG GCA TTG AAA CTA TAC GAA GGG AAG CAA TAC AAA AAA TCT CTC AAG CTG CTA GAC GCA ATT
 24 F L E A L K L Y E G K Q Y K K S L K L L D A I
 160 TTG AAA AAA GAC GGT AGT CAC GTT GAT TCC TTG GCT TTA AAG GGT CTT GAT TTA TAT TCT GTA GGT GAG
 47 L K K D G S H V D S L A L K G L D L Y S V G E
 229 AAA GAT GAC GCT TCC TAC CTG GCT AAT GCC ATC AGA AAA ATT GAA GGC GCT TCA GCA TCA CCA ATC
 70 K D D A A S Y V A N A I R K I E G A S A S P I
 298 TGC TGT CAT GTA TTA GGT ATC TAC ATG AGA AAC ACC AAA GAG TAC AAA GAA TCT ATT AAA TGG TTC ACG
 93 C C H V L G I Y M R N T K E Y K E S I K W F T
 367 GCA GCT TTG AAC AAT GGG TCC ACT AAC AAG CAA ATA TAT AGA GAC TTA GCA ACT TTG CAA TCA CAA ATT
 116 A A L N N G S T N K Q I Y R D L A T L Q S Q I
 436 GGC GAT TTC AAA AAT GCT TTA GTG TCC AGG AAA AAA TAT TGG GAA GCA TTC CTT GGT TAC CGT GCC AAC
 139 G D F K N A L V S R K K Y W E A F L G Y R A N
 505 TGG ACA TCA TTG GCT GTG GCA CAA GAT GTG AAC GGT GAG AGG CAA CAA GCT ATT AAC ACT TTA TCT CAG
 162 W T S L A V A Q D V N G E R Q Q A I N T L S Q
 574 TTT GAA AAA CTC GCT GAG GGA AAA ATA TCT GAT TCC GAG AAA TAT GAA CAC AGC GAG TGT TTA ATG TAC
 185 F E K L A E G K I S D S E K Y E H S E C L M Y
 643 AAA AAC GAC ATT ATG TAT AAA GCT GCC AGT GAT AAC CAA GAC AAG TTA CAA AAT GTA TTG AAA CAT TTG
 208 K N D I M Y K A A S D N Q D K L L Q N Y L K H L

FIG.12B

FIG. 12C

11

FIG. 12D

C 1333 GCT CGA ATT TTG GAG GAA GGT AGG CAA CTT GAT TTG CAG GAT AGA TTT ATC AAC TGT AAA ACG GTT AAG
438 A G I L E E G R Q L D L Q D R F I N C K T V K

1402 TAC TTT TTA AGG GCT AAC AAT ATC GAC AAG GCG GTG GAA GTC GCG TCC CTT TTC ACC AAA AAC GAT GAT
461 Y F L R A N N I D K A V E V A S L F T K N D D

1471 TCT GTT AAT GGT ATT AAG GAC TTA CAC CTT GTG GAA GCT TCT TGG TTC ATC GTA GAA CAG GCA GAA GCC
484 S V N G I K D L H L V E A S W F I V E Q A E A

1540 TAT TAT AGA CTA TAC CTG GAT AGA AAA AAG AAA TTA GAC GAT TTA GCA TCG CTA AAA AAA GAG GTT GAA
507 Y Y R L Y L D R K K L D L A S L K K E V E

1609 AGT GAT AAA AGC GAA CAA ATT GCG AAT GAT ATC AAA GAA AAC CAA TGG CTT GTT CGC AAA TAT AAA GGT
530 S D K S E Q I A N D I K E N Q W L V R K Y K G

1678 TTG GCG CTG AAA AGA TTC AAC GCT ATT CCA AAG TTT TAT AAA CAA TTC GAA GAT GAC CAG TTG GAT TTC
553 L A L K R F N A I P K F Y K Q F E D D Q L D F

1747 CAT TCA TAC TGT ATG AGA AAA GGT ACG CCA AGA GCC TAT CTG GAG ATG TTA GAA TGG GCA AAG GCA CTT
576 H S Y C M R K G T P R A Y L E M L E W G K A L

1816 TAT ACC AAA CCC ATG TAT GTT CCG GCA ATG AAG GAA GCA TCA AAG CTT TAC TTT CAA ATG CAT GAT GAT
599 Y T K P M Y V R A M K E A S K L Y F Q M H D D

1885 CGC TTA AAA AGA AAG TCC GAT TCT TTA GAT GAA AAT TCA GAT GAA ATC CAA AAT AAT GCC CAA AAT AGT
622 R L K R K S D S L D E N S D E I Q N N G Q N S

1954 AGC AGC CAA AAG AAA GCT AAG AAG GAA GCA GCC GCT ATG AAC AAA CGG AAA GAA ACT GAA GCC AAG
645 S S Q K K A K A K E A A M N K R K E T E A K

2023 AGT GTT GCT GCT TAT CCG ACT GAT CAA GAT AAC GAT GTA TTC GGC GAA AAG TTG ATT GAA ACC TCC ACT
668 S V A A Y P S D Q D N D V F G E K L I E T S T

2092 CCA ATG GAG GAC TTC GCT ACC GAA TTT TAT AAT AAC TAC TCC ATG CAA GTC AGA GAA GAC GAA AGG GAT
691 P M E D F A T E F Y N N Y S M Q V R E D E R D

2161 TAT ATT TTG GAC TTT GAA TTT AAC TAC AGA ATT GGA AAG TTA GCT TTG TGC TTT GCT TCT CTA AAC AAA
714 Y I L D F E F N Y R I G K L A L C F A S L N K

---9-2-2--->|
---11-3-2--->|
---35-2, 39-1--->|
---15-1-1--->|
---27-1--->|
---10-3-1--->|

C 2230 TTC GCT AAG AGA TTT GGC ACC ACG AGC GGT TTA TTT GGT AGT ATG GCC ATT GTT TTG TTA CAT GCC ACA
737 F A K R F G T S G L F G S M A I V L L H A T

2299 AGA AAC GAC ACC CCC TTT GAT CCA ATT TTG AAG AAA GTA GTC ACG AAG AGC CTT GAA AAA GAG TAT TCT
760 R N D T P F D P I L K K V V T K S L E K E Y S

2368 GAA AAT TTC CCA TTA AAC GAA ATA TCT AAC AAT AGC TTC GAT TGG CTG AAT TTC TAC CAA GAA AAA TTC
783 E N F P L N E I S N N S F D W L N F Y Q E K F

2437 GGT AAG AAT GAT ATA AAT GGC CTG CTA TTT CTG TAT CGC TAT CGC GAT GAT GTT CCG ATC GGA AGC TCT
806 G K N D I N G L L F L Y R Y R D D V P I G S S

2506 AAT TTC AAA GAA ATG ATT ATT AGC AGT CTT TCT CCC TTG GAG CCT CAC TCC CAG AAC GAA ATT CTA CAG
829 N L K E M I I S S L S P L E P H S Q N E I L Q

2575 TAT TAC TTG TAG CCTGCAACTCCTCAATGTGTCAATTAACTCTTACTTAATTATGTATATATTTTATGTATATGCTTATATGCA
852 Y Y L *

2662 TGCGCATATGCTCATAAAGATACATTGTTATAGGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....3'

FIG. 12E

FIG. 12E

11

C 2230 TTC GCT AAG AGA TTT GGC ACC ACG AGC GGT TTA TTT GGT AGT ATG GCC ATT GTT TTG TTA CAT GCC ACA
737 F A K R F G T S G L F G S M A I V L L H A T
2299 AGA AAC GAC ACC CCC TTT GAT CCA ATT TTG AAG AAA GTA GTC ACG AAG AGC CTT GAA AAA GAG TAT TCT
760 R N D T P F D P I L K K V V T K S L E K E Y S
2368 GAA AAT TTC CCA TTA AAC GAA ATA TCT AAC AAT AGC TTC GAT TCG CTG AAT TTC TAC CAA GAA AAA TTC
783 E N F P L N E I S N N S F D W L N F Y Q E K F
2437 GGT AAG AAT GAT ATA AAT GGC CTG CTA TTT CTG TAT CGC TAT CGC GAT GAT GTT CCG ATC GGA AGC TCT
806 G K N D I N G L L F L Y R Y R D D V P I G S S
2506 AAT TTC AAA GAA ATG ATT ATT AGC AGT CTT TCT CCC TTG GAG CCT CAC TCC CAG AAC GAA ATT CTA CAG
829 N L K E M I I S S L S P L E P H S Q N E I L Q
2575 TAT TAC TTG TAG CCTGCAACTCCTCAATGTGTC AATTA ACTCTTACTTAATTTATGTATATATTTTATGTATATGCTTATATGCA
852 Y Y L *
2662 TCGGCATATGCTCATATAAAGATACATTGTTATAGGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA.....3'

11

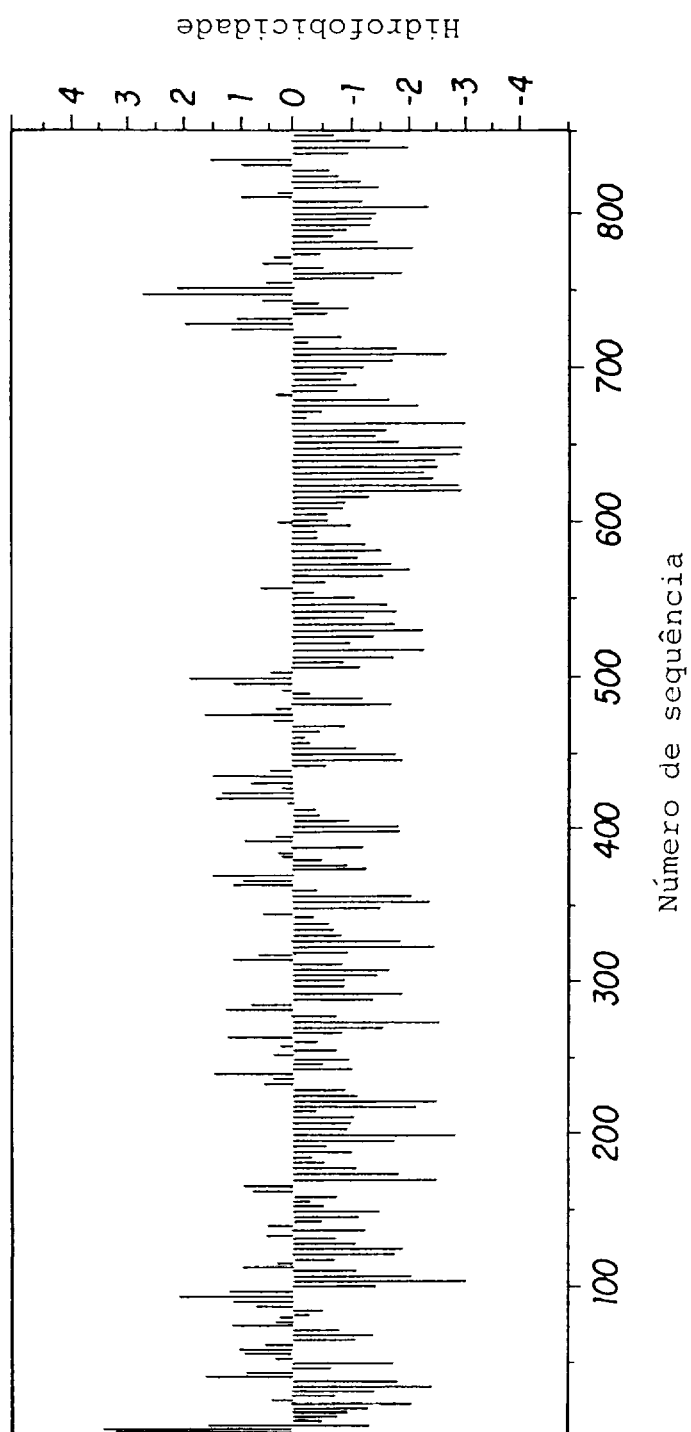


FIG. 13

11

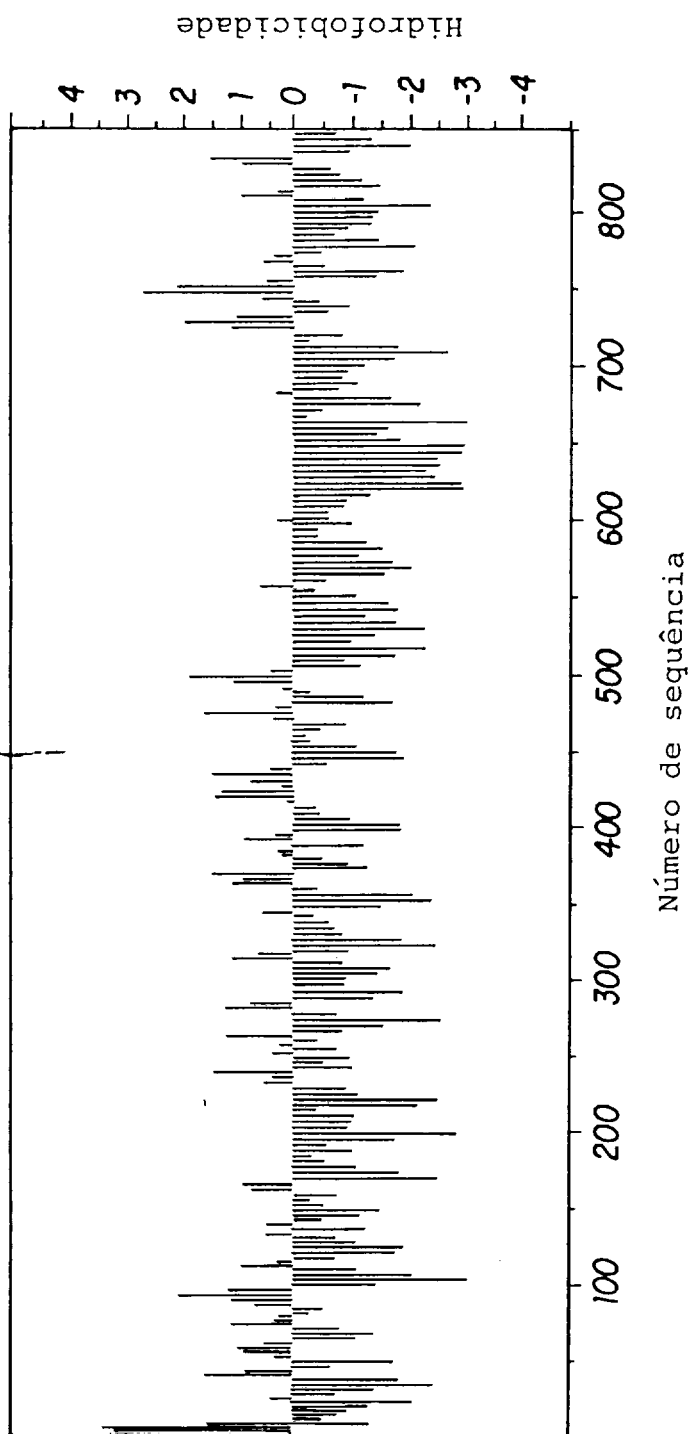


FIG. 13