

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 95.688

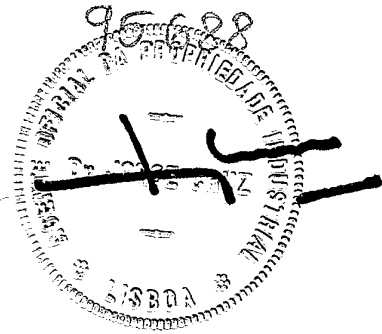
REQUERENTE: THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION. norte-
-americana, industrial. com sede em Fruit
Street, Massachusetts 02114, Estados Unidos
da América do Norte

EPIGRAFE: "CÉLULA QUE EXPRESSA UMA N^α-ACETILTRANSFERASE
ALTERADA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA
MOLECULA RECOMBINANTE CONTENDO UM GENE
AAA1 ALTERADO, E DE UM PEPTIDEO AO QUAL
FALTA UM TERMINAL AMINO N^α-ACETILADO"

INVENTORES: JOHN A. SMITH; FANG-JEN S. LEE

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

25 de Outubro de 1989 sob o No.07/426,381, nos Estados
Unidos da América do Norte



THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

"CÉLULA QUE EXPRESSA UMA N^α-ACETILTRANSFERASE ALTERADA E MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UMA MOLÉCULA RECOMBINANTE CONTENDO UM GENE AAA1 ALTERADO, E DE UM PEPTÍDEO AO QUAL FALTA UM TERMINAL AMINO N^α-ACETILADO"

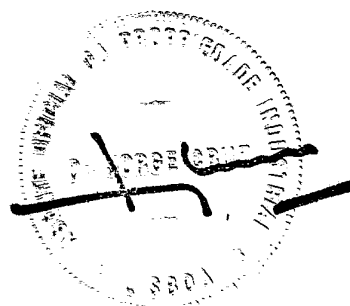
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a uma célula que expressa uma N^α-acetil-transferase alterada, bem como a métodos para a produção de moléculas recombinantes contendo um gene AAA1 alterado e de peptídeos aos quais falta um terminal N^α-acetilado.

Foi identificada e clonada uma mutação definindo um gene para a N^α-acetiltransferase da levedura. As mutações neste gene foram realizadas e usadas para produzir células que são substancialmente incapazes de catalisar a N^α-acetilação da proteína. Essas células são importantes para a determinação da sequência dos amino-ácidos de proteínas não caracterizadas. Essas células são também instrumentos importantes para a expressão de uma proteína recombinante à qual falta um grupo acetilo no seu grupo α-amino.



Referência-Cruzada a Pedidos de Patente Afins:

Este pedido de patente é um pedido continuação-em-parte dos Pedidos de Patente dos E.U.A. Nos. de Série 07/284.344, apresentado em 14 de Dezembro, 1988, e 07/153.361, apresentado em 8 de Fevereiro, 1988, cujos conteúdos são aqui completamente incorporados como referência.

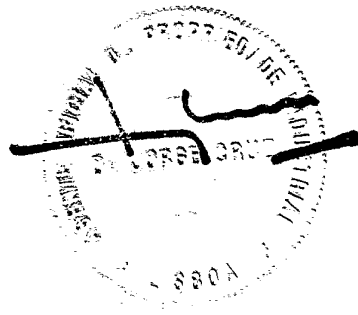
Campo do Invento:

O invento é dirigido ao isolamento, purificação, e caracterização de estirpes da levedura, *Saccharomyces cerevisiae* tendo actividade da N^α-acetiltransferase alterada. O invento também inclui os enzimas N^α-acetiltransferase alterados produzidos por essas estirpes.

Fundamentos do Invento:

A acilação terminal em amino constitui uma importante modificação co-translacional de proteínas de células eucarióticas e procarióticas. Embora o formilo, piruvoilo, α-cetobutirilo, glicosilo, glucuronilo, α-aminoacilo, p-glutamilo, miristoilo, e acetilo sejam grupos de N^α-acetilação bem conhecidos, é evidente que a acetilação é a modificação química mais comum do grupo α-NH₂ das proteínas eucarióticas (Tsunasawa, S., et al., Methods Enzymol 106:165-170 (1984); Driessen, H.P.C., et al. CRC Crit. Rev.Biochem 18:281-325 (1985)).

A N^α-acetilação desempenha um papel na translação e processamento eucarióticos normais (Wold, F., Trends Biochem. Sci. 9:256-257, (1984)), e protege contra a degradação proteolítica (Jornvall, H., J. Theor. Biol. 53:1-12 (1975); Rubenstein, P., et al., J. Biol. Chem. 254:11142-11147 (1979)). Além disso, a



taxa de turnover proteico mediado pelo sistema de degradação dependente da ubiquitin depende da presença de um grupo α -NH₂ livre (Hershko, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7021-7025 (1984); Bachmair, A., et al., Science 234:179-186 (1986)), e esta dependencia indica que a N ^{α} -acetilação pode desempenhar um papel crucial no turnover proteico iminente.

Depois da descoberta de que uma metade acetilo era o grupo de bloqueio N-terminal da proteína de revestimento do virus mosaico do tabaco (Narita, K., et al. Biochim. Biophys. Acta, 28:184-191 (1958)), e peptídeo estimulador do α -melanocito (Harris, J.I., et al., Biochem J. 71:451-459 (1959)), verificou-se que um grande número de proteínas de vários organismos possui resíduos acetilados no N terminal (Brown, J.L., et al., J. Biol. Chem. 251:1009-1014 (1976); Brown, J.L., et al., J. Biol. Chem. 254:1447-1449 (1979)). Por exemplo, células-L do ratinho e células de ascite de Ehrlich apresentam cerca de 80% das suas proteínas solúveis intracelulares N ^{α} -acetiladas (Brown, J.L., et al., J. Biol. Chem. 251:1009-1014 (1976); Brown, J.L., et al., J. Biol. Chem. 254:1447-1449 (1979)). Nos organismos eucarióticos inferiores cerca de 50% das proteínas solúveis são acetiladas (Brown, J.L., Int l. Congr. Biochem. Abstr. (International Union of Biochemistry, Canada) Vol. 11:90 (1979)). Estes dados demonstram que o grupo N ^{α} -acetilo é um grupo bloqueador muito importante. Foi sugerido que a função biológica deste grupo bloqueador pode ser protegida contra prematuro catabolismo proteico (Jornvall, H., J. Theor. Biol. 55:1-12 (1975)) e contra degradação proteolítica proteica (Rubenstein, P. and Deuchler, J., J. Biol. Chem. 254:11142 (1979)). Contudo, em células-L do ratinho essa N ^{α} -acetilação não tem, aparentemente, esta função biológica (Brown, J.L., J. Biol. Chem. 254:1447 (1979)).



Embora não tenha sido avaliada com exactidão uma função geral evidente para a N^{α} -acetilação, foram observados alguns efeitos específicos em relação a um pequeno número de proteínas. A desidrogenase do glutamato específica em relação a NADP não acetilado num mutante de Neurospora crassa é instável em relação ao calor, em contraste com a forma acetilada (Siddig et al., J. Mol. Biol. 137:125 (1980)). Um mutante de Escherichia coli, em que a proteína ribosómica S3 não é acetilada, apresenta termosensibilidade (Cumberlidge, A.G. e Isono, K., J. Mol. Biol. 131:169 (1979)). A N^{α} -acetilação de dois dos produtos da proteína precursora proopiomelanocortina tem um efeito regulador profundo sobre a actividade biológica destes polipeptídeos; a actividade opioide da β -endorfina é completamente suprimida, enquanto que o efeito melanotrópico de α -MSH é aumentado se N^{α} -acetilado (Smyth et al., Nature 279:252 (1970); Smyth, D.G. and Zakarian, S., Nature 288:613 (1980); e Ramachandran, J. and Li, C.H., Adv. Enzymol. 29:391 (1967)). A actina citoplasmática tanto acetilada como não acetilada das células Drosophila de cultura participam na reunião de microfilamentos, esta última, contudo, com menos eficácia (Berger et al., Biochem. Genet. 19:321 (1981)). Mais recentemente, verificou-se que a taxa do turnover da proteína mediada pelo sistema de degradação dependente da ubiquitin depende da presença de um grupo α -NH₂ no terminus-N de uma proteína (Hershko et al., Proc. Nat'l 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 desempenhar um papel no impedimento do turnover da proteína.

A N^{α} -acetilação é mediada por pelo menos uma N^{α} -acetiltransferase, que catalisa a transferência de um grupo acetilo do acetil coenzima A para o grupo α -NH₂ de proteínas e peptídeos. As N^{α} -acetiltransferases foram previamente demonstradas em E. coli (Brot, N., et al., Arch. Biochem. Biophys. 155:475-477 (1973)), fígado do rato (Pestana, A., et al., Biochemistry 14:1397-1403



(1975); pestana, A., et al., Biochemistry 14:1404-1412 (1975); Yamada, R., et al., 1st Symposium of the Protein Society 625:34 (1997)), cérebro do rato (O Donohue, T.L., J. Biol. Chem. 258:2163-2167 (1983)), pituitária do rato (Woodford, T.A., et al., J. Biol. Chem. 254:4993-4999 (1979)); Pease, K.A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 212:177-185 (1981); Gembotski, C.C., J. Biol. Chem. 257:10501-10509 (1982); Chappell, M.C., et al., J. Biol. Chem. 261:1088-1091 (1986)), pituitária bovina (Gembotski, C.C., J. Biol. Chem. 257:10501-10509 (1982)), cristalinos bovinos (Granger, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3010-314 (1976)), oviducto de galinha (Tsunasawa, S., et al., J. Biochem. 87:645-650 (1980)), e germe de trigo (Kido, H., et al., Arch. Biochem. Biophys. 208:95-100 (1981)). Os enzimas N^α-acetiltransferases a partir destas fontes nunca foram, contudo, purificadas mais do que 40 vezes.

Sumário do Invento:

A acetilação é a modificação química que ocorre mais frequentemente do grupo α -NH₂ de proteínas eucarióticas e é catalisada por uma N^α-acetiltransferase. A purificação até à homogeneidade de uma N^α-acetiltransferase a partir de Saccharomyces cerevisiae, e a determinação da especificidade do seu substrato (Lee, F-J.S., Lin L-W., and Smith, J.A., J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1988)), permitiu o isolamento de um cADN com todo o comprimento codificando esta N^α-acetiltransferase da levedura. Este clone de cADN foi submetido a mutagenese e obteve-se uma mutação nula (designada "aaal"). A mutação, embora não letal, leva as células a crescerem lentamente e de um modo heterogéneo. Embora os diploides aaal/AAA1 possam formar quatro esporos inicialmente viáveis, os dois esporos aaal no interior do esporangio deram consistentemente origem a pequenas colónias.



Além disso, os diploides aaal/aaal apresentam defeito na esporulação. Os mutantes aaal são sensíveis em relação ao choque calorífero e não podem entrar na fase estacionária. A mutação aaal também reduz especificamente as funções de reunião em células do tipo de reunião "a". Estes resultados indicam que a N^{α} -acetilação constitui uma modificação química importante das proteínas eucarióticas.

A disponibilidade deste mutante permite a obtenção de outras mutações, e tem aplicação na expressão genética, e na determinação da sequência da proteína.

Em detalhe, o invento proporciona uma célula que expressa uma N^{α} -acetiltransferase alterada. Numa apresentação, o invento refere-se a uma célula da levedura que expressa uma N^{α} -acetiltransferase, e particularmente a uma célula da levedura tendo uma mutação no gene AAA1. De especial interesse para o invento são mutações do gene AAA1 que levam a que a célula apresente uma substancial falta de actividade da N^{α} -acetiltransferase.

O invento também se refere a uma molécula recombinante contendo um gene AAA1 alterado.

O invento também se refere a um método para produzir um peptídeo ou proteína a que falta um terminus amino N^{α} -acetilado que compreende a expressão do peptídeo ou proteína numa célula de levedura tendo um gene AAA1, em que o gene contém uma mutação resultando numa substancial perda de actividade do produto do gene AAA1, e que torna a célula incapaz de catalisar a N^{α} -acetilação do peptídeo ou da proteína.



O invento também se refere a um método para determinar a sequência de amino ácidos de um peptídeo que compreende:

- a. expressão do peptídeo numa célula de levedura tendo um gene AAA1, em que o gene contém uma mutação resultando em perda substancial de actividade do produto do gene AAA1, e torna a célula incapaz de catalisar a N^α-acetilação dos peptídeos;
- b. recuperação do peptídeo; e
- c. determinação da sequência de amino ácidos do peptídeo.

Descrição Resumida das Figuras:

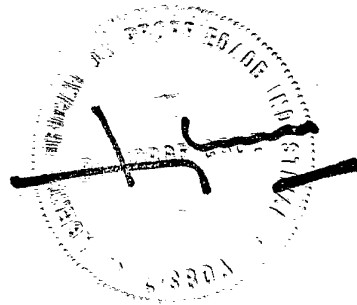
A Figura 1 indica a sequência dos amino ácidos de AAA1 da N^α-acetiltransferase de Saccharomyces cerevisiae, e a sua sequência cADN.

A Figura 2 indica um mapa de restrição do gene AAA1. (a) indica o comprimento total do clone AAA1 (pBN9) (linha escura é cADN, linha tracejada é Bluescript); (b) a eliminação do fragmento 3' HindIII de pBN9 (pBHN9), e (c) a inserção do fragmento hisG-URA3-hisG 3.8 kb no sítio EcoRV de pBNH9 (pBNHU9).

A Figura 3 indica a sensibilidade ao choque de calor das estirpes aaal. As células são feitas crescer até à última fase log em meio YDP, diluídas em meio SD, e incubadas a 54°C. A percentagem de sobrevivência foi determinada em cada tempo indicado. Os genótipos das estirpes são indicados no Quadro 2.

Descrição das Apresentações Preferidas:

A N^α-acetiltransferase de Saccharomyces cerevisiae foi purificada até homogeneidade aparente (4.600 vezes) e caracterizada como uma proteína dimérica, cuja subunidade M_r era de 95.000, e que transferia efectivamente um grupo acetilo para



vários substratos peptídicos sintéticos (incluindo ACTH (1-24), dismutase superóxido humana (1-24), e desidrogenase do álcool da levedura (1-24) (Lee, F.-J.S., et al., J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1988), Requerimentos da Patentes dos E.U.A. Séries Nos. 07/284.344, e 07/153.361, cujas referências são aqui incorporadas como referência).

Além disso, foi demonstrado que este enzima não transfere um grupo acetilo para o grupo ϵ -amino de resíduos lisilo em vários substratos peptídicos e histonas. O enzima N^{α} -acetiltransferase é codificado por um único gene (AAA1, amino-terminal, α -amino, acetiltransferase) que se encontra localizado no cromossoma IV de Saccharomyces cerevisiae.

A purificação do enzima N^{α} -acetiltransferase permitiu a elucidação desta sequência de amino ácidos. Esta elucidação permitiu a identificação e clonagem da sequência cADN que codifica o enzima na levedura. A clonagem de cADN da levedura permite uma investigação da função biológica e regulação da N^{α} -acetilação na síntese e degradação da proteína eucarióticas.

Especificamente, a disponibilidade desta molécula de cADN permite a construção de alelos de mutantes do gene da N^{α} -acetiltransferase de Saccharomyces cerevisiae, e a introdução desses alelos alterados na levedura e células de plantas a fim de produzir células que expressem enzimas N^{α} -acetiltransferase alterados. A construção e utilização desses mutantes é descrita por Lee, F.-J., Lin, L.-W. and Smith, J.A., J. Bacteriol. 171 (11) (Novembro 1989), cuja referência é aqui incorporada como referência.

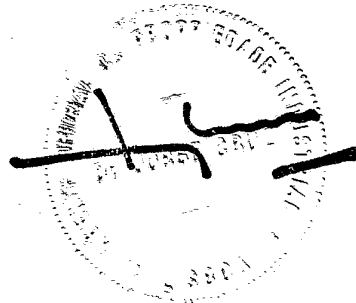
Um aspecto do presente invento refere-se assim a Saccharomyces cerevisiae e a estirpes de plantas tendo actividade



da N^{α} -acetiltransferase alterada. Tal como é aqui usada, a expressão "alterada" pretende referir-se a uma comparação entre as características das actividades de N^{α} -acetiltransferase do presente invento e as do enzima normal (isto é não mutante ou do "tipo selvagem" de Saccharomyces cerevisiae. Métodos para o isolamento, purificação e ensaio da N^{α} -acetiltransferase normal de Saccharomyces cerevisiae, e as características deste enzima (isto é especificidade do substrato, actividade específica, estabilidade, etc.) são descritos nos Requerimentos da Patente dos E.U.A. Nos. 07/284.344, e 07/153.361, cujas referências são aqui incorporadas como referência.

As actividades da N^{α} -acetiltransferase alteradas do presente invento podem ter, por exemplo, uma actividade específica inferior (unidades de actividade por unidade de peso) à encontrada em células normais. Por exemplo, uma mutação "nula" (tal como a mutação *aaal* discutida mais abaixo) pode ser produzida e usada para construir uma célula a cuja N^{α} -acetiltransferase falte substancialmente toda a actividade da N^{α} -acetiltransferase associada à proteína normal. Quando um tal alelo é introduzido numa célula de levedura, características celulares básicas tais como sensibilidade a temperaturas elevadas, passagem para a fase estacionária, e funções de reunião são afectadas. Este resultado indica que a N^{α} -acetilação constitui uma modificação química importante de proteínas eucarióticas e afecta várias funções biológicas não afins em células eucarióticas.

O presente invento também inclui estirpes de Saccharomyces cerevisiae tendo um nível aumentado de N^{α} -acetiltransferase (isto é elevado no que se refere ao nível normal). O invento inclui ainda estirpes de Saccharomyces cerevisiae tendo actividade da N^{α} -acetiltransferase com características de especificidade, estabilidade alteradas (isto é, não-normais).

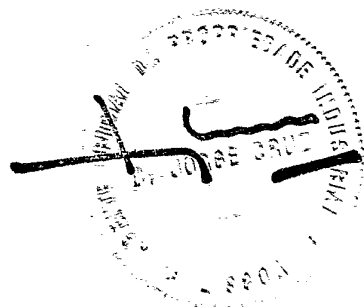


O presente invento também se refere ao enzima N^{α} -acetiltransferase do presente invento, ou às suas variantes, que é "substancialmente puro" ou que foi "substancialmente purificado". Tal como são aqui usadas, as expressões "substancialmente pura" ou "substancialmente purificada" pretendem ser equivalentes, e descrever uma N^{α} -acetiltransferase que se apresente substancialmente livre de um composto normalmente associado ao enzima no seu estado natural, isto é, uma proteína, hidrato de carbono, lípido, etc. A expressão pretende ainda descrever uma N^{α} -acetiltransferase que é homogênea por um ou mais dos ensaios de pureza ou homogeneidade usados pelos especialistas nesta técnica. Por exemplo, uma N^{α} -acetiltransferase substancialmente pura irá mostrar características constantes e reproduzíveis com desvios experimentais padrão para parâmetros tais como os que se seguem: peso molecular, técnicas cromatográficas, etc. Contudo, a expressão "substancialmente pura", não pretende excluir misturas artificiais ou sintéticas do enzima com outros compostos. A expressão também não pretende excluir a presença de impurezas que não interfiram com a actividade biológica do enzima, e que podem estar presentes, por exemplo, devido a uma purificação incompleta.

I. Engenharia Genética da N^{α} -Acetiltransferase

A. Sequência da N^{α} -acetiltransferase

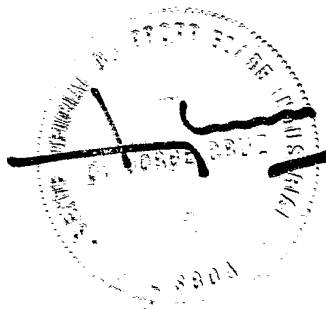
Os inventores completaram a clonagem molecular e determinaram a análise sequencial completa de cADN de um gene de N^{α} -acetiltransferase eucariótico (Lee, F.-J.S., et al., J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1988), Requerimentos da Patente dos E.U.A. Nos. 07/284.344, e 07/153.361). A proteína de



N^{α} -acetiltransferase da levedura é codificada por um quadro de leitura aberto de 2562 bases e consiste em 854 amino ácidos. O seu peso molecular calculado a partir da sua composição em amino ácidos é de 98.575 daltons, e este peso molecular está de acordo com a subunidade M_r , avaliada em 95.000 ± 2.000 . A análise da sequência proteica da proteína natural revelou que era bloqueada terminalmente em N, sendo provável que após a clivagem do resíduo Met N-terminal o penúltimo resíduo serilo fosse acilado (possivelmente acetilado). Embora o enzima não seja considerado uma glicoproteína, ele contém 6 sítios putativos de N-glicosilação (isto é, sequências Asn-X-Ser (ou Thr)) nos resíduos 120-122, 161-163, 643-645, 702-704, 761-763, 792-793. A região hidrofílica, extensa, entre os resíduos 508 e 720 constitui uma característica estrutural não usual da molécula, embora não seja claro se esta região desempenha um papel funcional na regulação ou localização do enzima. Uma comparação das sequências de N^{α} -acetiltransferase na proteína com outras acetiltransferases não revela uma semelhança percentual apreciável entre elas, embora certas sequências curtas tenham uma semelhança superior a 50%. Estas são regiões possíveis onde as mutações específicas em relação ao sítio devem ser introduzidas em tentativas precoces para identificar resíduos envolvidos na catálise. A sequência da N^{α} -acetiltransferase de Saccharomyces cerevisiae e do seu cADN é indicada na Figura 1.

B. O Gene da N^{α} -acetiltransferase

Os resultados das hibridizações do Norte e do Sul indicam que existe um gene que codifica esta N^{α} -acetiltransferase. Contudo, não é claro se a levedura contém ou não ainda outras acetiltransferases capazes de modificar o grupo $\alpha\text{-NH}_2$ das proteínas. Além disso, estudos prévios sobre a especificidade do



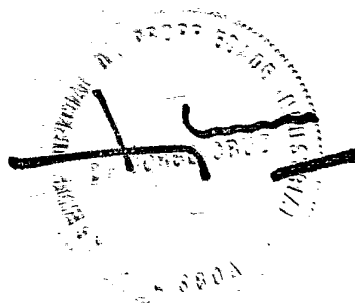
substrato da N^{α} -acetiltransferase da levedura demonstraram claramente que este enzima não é capaz de desacetilar grupos ϵ - NH_2 em substratos peptídicos ou em histonas, embora tenha sido demonstrada uma acetiltransferase específica em relação à histona na levedura (Travis, G.H. *et al.*, J. Biol. Chem. 259:14406-14412 (1984)).

O gene AAA1 é localizado no cromossoma IV e é colocado numa posição imediatamente adjacente à sequência ladeadora 5' do gene SIR2. Visto SIR2 e três outros genes SIR não ligados afectarem a repressão trans da transcrição dos genes HMR e HML, que estão envolvidos na determinação do tipo de reunião da levedura haploide, não existe uma relação evidente entre a função destes genes e AAA1.

A clonagem do gene AAA1 da levedura permite que sejam determinados os detalhes moleculares do papel da N^{α} -acetilação na separação e degradação das proteínas eucarióticas.

C. Formação de Mutante e de Alelos alterados da Sequência Genética da N^{α} -acetiltransferase

Variantes da sequência de amino ácidos da N^{α} -acetiltransferase podem ser preparadas introduzindo mutações na sequência de cADn da N^{α} -acetiltransferase clonada. Essas variantes incluem, por exemplo, eliminações de, ou inserções ou substituições de, resíduos na sequência de amino ácidos indicada na Figura 1. Pode ser feita qualquer combinação de eliminação, inserção, e substituição. obviamente, a não ser que se desejem mutantes nulos, as mutações a serem feitas no ADN codificando a variante não devem colocar a sequência fora do quadro de leitura e de preferência não irão criar regiões complementares que possam

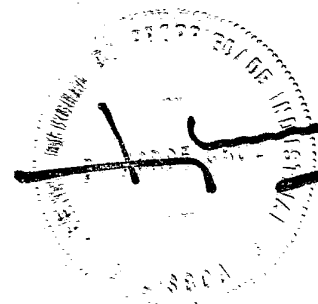


produzir estrutura mARN secundário (ver Publicação de requerimento de Patente EP No. 75.444).

Ao nível genético, estas variantes são habitualmente preparadas por mutagenese de nucleótidos dirigida ao sítio no ADN codificando a variante, e expressando em seguida o ADN na cultura de células recombinantes.

Embora o sítio para a introdução de uma variação da sequência de amino ácidos possa ser determinado previamente, a mutação per se não precisa de ser predeterminada. Por exemplo, a fim de otimizar a performance de uma mutação num determinado sítio, pode-se realizar uma mutagenese ao acaso no codão ou região alvo sendo as variantes expressas da N^á-acetiltransferase avaliadas em relação à combinação óptima da actividade desejada. Técnicas para realizar mutações de substituição em sítios predeterminados no ADN tendo uma sequência conhecida são bem conhecidas, por exemplo, mutagenese específica do sítio.

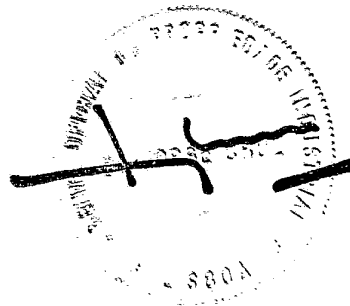
A preparação de uma variante da N^á-acetiltransferase de acordo com o que foi aqui dito é de preferência realizada por mutagenese específica em relação ao sítio de ADN que codifica uma variante preparada previamente ou uma versão não variante da proteína. A mutagenese específica em relação ao sítio permite a produção de variantes da N^á-acetiltransferase pela utilização de sequências específicas de oligonucleótido que codificam a sequência de ADN da mutação desejada, assim como um número suficiente de nucleótidos adjacentes, a fim de proporcionar uma sequência de primeros com tamanho e complexidade de sequência suficientes para formar um duplex estável em ambos os lados da junção de eliminação a ser atravessada. Tipicamente, é preferido um primero com cerca de 20 a 25 nucleótidos de comprimento, com cerca de 5 a 10 resíduos em ambos os lados da junção da sequência a ser alterada.



Em geral, a técnica de mutagenese especifica em relação ao sítio é bem conhecida nesta técnica, tal como é exemplificado por publicações tais como Adelman et al., DNA 2:183 (1983), cuja apresentação é aqui incorporada como referência.

Como será tomado em consideração, a técnica de mutagenese especifica em relação ao sítio utiliza um vector fágico que existe sob uma forma tanto de hélice simples como de hélice dupla. Vectores típicos úteis na mutagenese dirigida ao sítio incluem vectores tais como o elemento fágico M13, por exemplo, tal como é indicado por Messing, J. et al., 3rd Cleveland Symp. Macromolecules Recombinant DNA, Editor A. Walton, Elsevier, Amsterdam (1981), cuja apresentação é aqui incorporada como referência. Estes elementos fágicos encontram-se comercializados e a sua utilização é geralmente bem conhecida pelos especialistas nesta técnica. Alternativamente, vectores plasmídeos que contêm uma fase de hélice simples origem de replicação (Vieira et al., Meth. Enzymol. 133:3 (1987)) podem ser utilizados para se obter ADN de hélice simples.

Em geral, a mutagenese dirigida ao sítio de acordo com o que foi aqui dito é realizada obtendo primeiro um vector de hélice simples que inclua na sua sequência uma sequência de ADN que codifique a proteína importante. É preparado, geralmente sinteticamente um primeiro oligonucleótido tendo a desejada sequência com a mutação desejada, por exemplo, pelo método de Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 75:5765 (1978). Este primeiro é então recozido com o vector contendo sequência proteica com hélice simples, e submetido a enzimas de polimerização do ADN tais como fragmento Klenow da polimerase I da E. coli, a fim de completar a síntese da hélice que transporta a mutação. Assim, uma sequência submetida a mutação e a segunda hélice tem a mutação desejada. Este vector heteroduplex é então usado para



transformar células apropriadas tais como células JM101 sendo seleccionados clones que incluem vectores recombinantes tendo o arranjo sequencial com mutação.

Depois de se ter seleccionado esse clone, a região proteica que sofreu mutação pode ser removida e colocada num vector apropriado para produção de proteína, geralmente um vector de expressão do tipo que pode ser utilizado para transformação de um hospedeiro apropriado.

As eliminações na sequência de amino ácidos variam geralmente entre cerca de 1 e 30 resíduos, com maior preferência 1 e 10 resíduos, e são tipicamente (embora não necessariamente) contiguas.

As inserções na sequência de amino ácidos incluem fusões de amino e/ou carboxilo terminal variando de um resíduo a polipeptídeos com um comprimento essencialmente não restringido, assim como inserções na intrasequência de resíduos amino ácidos únicos ou múltiplos. As inserções intrasequenciais (isto é, inserções no interior da sequência de codificação completa da N^{α} -acetiltransferase) podem variar geralmente entre cerca de 1 e 10 resíduos, com maior preferência entre 1 e 5. Um exemplo de uma inserção terminal inclui uma fusão de uma sequência assinalada, quer heteróloga quer homóloga em relação à célula hospedeiro, a um terminus-N de uma N^{α} -acetiltransferase para facilitar a secreção de N^{α} -acetiltransferase em maturação a partir de hospedeiros recombinantes.

O terceiro grupo de variantes são aquelas em que pelo menos um resíduo amino ácido na N^{α} -acetiltransferase, e de preferência, apenas um, foi removido sendo um resíduo diferente inserido no seu lugar. Essas substituições são feitas de

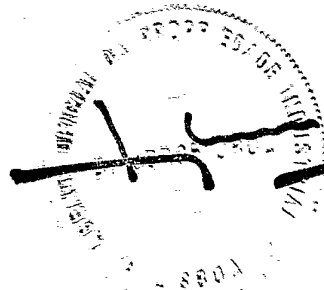


preferência de acordo com o Quadro I que se segue quando é desejado modular finamente as características da N^{ra}-acetiltransferase.

QUADRO 1

SUBSTITUIÇÕES DE AMINO ACIDOS

<u>Residuo Original</u>	<u>Substituições Exemplificativas</u>
Ala	gly; ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	ala; pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln; glu
Met	leu; tyr; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu



São realizadas alterações substanciais na identidade funcional ou imunológica seleccionando substituições que são menos conservativas do que as do Quadro 1, isto é, seleccionando resíduos que diferem mais significativamente no seu efeito sobre a manutenção de (a) a estrutura da espinha dorsal do polipeptideo na zona da substituição, por exemplo, com uma configuração plana ou helicoidal, (b) a carga ou hidrofobicidade da molécula no sítio alvo, ou (c) a massa da cadeia lateral. As substituições que em geral são esperadas são aquelas em que (a) glicina e/ou prolina é substituída por outro amino ácido ou eliminada ou inserida; (b) um resíduo hidrofílico, por exemplo, serilo ou treonilo, substituído ou é substituído por um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo, ou alanilo; (c) um resíduo cisteína substituído ou é substituído por um outro resíduo; (d) um resíduo tendo uma cadeia lateral electropositiva, por exemplo, lisilo, arginilo, ou histidilo, substituído ou é substituído por um resíduo tendo uma carga electronegativa, por exemplo, glutamilo ou aspartilo; ou (e) um resíduo tendo uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, substituído ou é substituído por um que não tenha uma tal cadeia lateral, por exemplo, glicina.

Não se espera que a maior parte das eliminações e das inserções, e substituições em particular, produzam alterações radicais nas características da molécula. Contudo, quando é difícil prever o efeito exacto da substituição, eliminação ou inserção antes da sua realização, qualquer especialista nesta técnica considerará que o efeito irá ser avaliado por ensaios de avaliação de rotina. Por exemplo, é realizada tipicamente uma variação por mutagenese específica em relação ao sítio do ácido nucleico natural que codifica a N^{ac}-acetiltransferase, expressão da variante ácido nucleico em cultura de células recombinantes, e, facultativamente, purificação a partir da cultura de células,

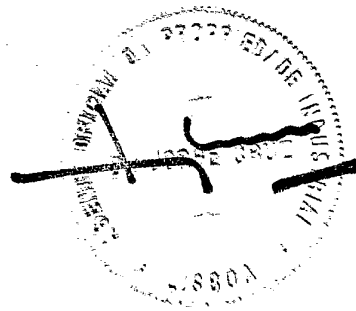


por exemplo, por adsorção de imunoafinidade, adsorção numa coluna anti-N^α-acetiltransferase (para absorver a variante ligando-a a pelo menos um epitopo imunitário restante).

A actividade do lisado de células ou da variante purificada de N^α-acetiltransferase é então avaliada num ensaio de avaliação apropriado para a característica desejada. Por exemplo, uma alteração no carácter imunológico da N^α-acetiltransferase alterada, tal como afinidade em relação a um determinado anticorpo, é medida por meio de um imunensaio do tipo competitivo. Modificações das propriedades dessa proteína tais como oxidação-redução ou estabilidade térmica, hidrofobicidade, susceptibilidade a degradação proteolítica ou a tendência para agregação com veículos ou em multímeros são ensaiadas por métodos bem conhecidos pelos técnicos especializados.

A fim de identificar N^α-acetiltransferases variantes às quais falta substancialmente actividade de N^α-acetiltransferase, clones da N^α-acetiltransferase (isto é activa) podem ser submetidos a mutação, e introduzidos num mutante nulo (aaa1). Visto que a maior parte dos transformantes irão então apresentar actividade da N^α-acetiltransferase, os clones aos quais falta actividade da N^α-acetiltransferase podem ser identificados rapidamente.

De um modo análogo, é possível identificar clones tendo actividade da N^α-acetiltransferase aumentada ou alterada. Os clones com alelo nulo (tendo uma substituição ou eliminação de 1-10 amino ácidos) podem ser mutagenizados e introduzidos numa célula que seja deficiente em actividade da N^α-acetiltransferase (tal como um mutante nulo). Os clones que, devido a mutagenese receberam uma mutação "correctora" ou "compensadora" irão, após introdução na célula, expressar actividade da



N^α-acetiltransferase. Esta actividade pode ser ensaiada (do modo descrito anteriormente) e podem ser obtidas as variantes alteradas desejadas.

D. A Clonagem do Gene da N^α-acetiltransferase

Pode utilizar-se qualquer um de uma série de processos para a clonagem do gene da N^α-acetiltransferase de Saccharomyces cerevisiae. Um desses métodos implica a análise de uma livraria de vector de vai-vém de inserção de cADN (derivado de uma célula que expressa N^α-acetiltransferase) em relação à presença de uma inserção que contem o gene da N^α-acetiltransferase. Essa análise pode ser efectuada por transfecção de células com o vector e em seguida fazendo um ensaio em relação à expressão de N^α-acetiltransferase. O método preferido para a clonagem deste gene consiste em determinar a sequência de amino ácidos do enzima N^α-acetiltransferase e em usar estas sequências para criar dispositivos capazes de hibridização com cADN codificador de N^α-acetiltransferase. Para realizar esta tarefa, faz-se a sequência da proteína purificada da N^α-acetiltransferase ou de fragmentos desta proteína (obtida, por exemplo, com brometo de cianogénio, ou com proteases tais como papaina, cromotripsina ou tripsina (Oike, Y. et al., J. Biol. Chem. 257:9751-9758 (1982); Liu, C. et al., Int. J. Pept. Protein Res. 21:209-215 (1983)). De preferência, essa sequenciação é realizada usando sequenciadores automáticos. Se se sequenciarem peptideos com mais de 10 amino ácidos, a informação sequencial é geralmente suficiente para permitir que se clone um gene tal como o gene para N^α-acetiltransferase.

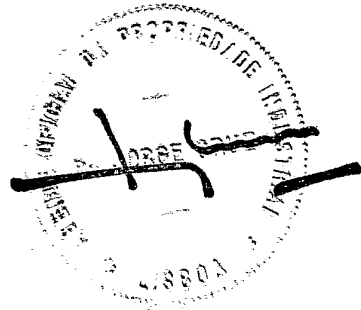
Uma vez a molécula completa, ou que um ou mais fragmentos peptídicos apropriados da molécula, tenha(m) sido



sequenciado(s), as sequências de ADN capazes de os codificar são examinadas. Porque o código genético é degenerado, pode ser usado mais de um código para codificar um amino ácido particular (Watson, J.D., In: Molecular Biology of the Gene, 3rd Ed., W.A. Benjamin, Inc., Menlo Park, CA (1977), pp. 356-357). Os fragmentos peptídicos são analisados para identificar sequências de amino ácidos que podem ser codificados por oligonucleótidos tendo o grau mínimo de degeneração. Isto é de preferência realizado identificando sequências que contêm amino ácidos que são codificados por apenas um único código. Embora ocasionalmente essas sequências de amino ácidos possam ser codificadas por apenas um único oligonucleótido, frequentemente a sequência de amino ácidos pode ser codificada por qualquer um de um grupo de oligonucleótidos semelhantes. De um modo importante, embora todos os membros do grupo contenham oligonucleótidos que são capazes de codificar o fragmento peptídico e, assim, contêm potencialmente a mesma sequência de nucleótidos que o gene que codifica o fragmento peptídico, apenas um membro do grupo contém uma sequência de nucleótidos que é idêntica à sequência de nucleótidos deste gene. Porque este membro está presente no grupo, e é capaz de hibridizar o ADN mesmo na presença de outros membros do grupo, é possível utilizar o grupo não fraccionado de oligonucleótidos do mesmo modo pelo qual se utiliza um único oligonucleótido para clonar o gene que codifica o peptídeo.

De um modo exactamente análogo ao descrito anteriormente, pode-se utilizar um oligonucleótido (ou grupo de oligonucleótidos) que têm uma sequência de nucleótidos que é complementar da sequência ou grupo de sequências de oligonucleótidos que é capaz de codificar o fragmento peptídico.

Um oligonucleotido, ou grupo de oligonucleótidos apropriado(s) que é (sejam capaz(es) de codificar um fragmento de



gene de N^α-acetiltransferase (ou que é complementar desse oligonucleótido, ou desse grupo de oligonucleótidos) é identificado (usando o processo descrito anteriormente), sintetizado, e hibridizado, por meios bem conhecidos na técnica, em relação a ADN ou, com maior preferência, uma preparação de cADN derivada de células de levedura que são capazes de expressar sequências genéticas da N^α-acetiltransferase. Técnicas de hibridização de ácido nucleico são apresentadas por Maniatis, T. et al., In: Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1982), e por Hames, B.D. and Higgins, S.J., In: Nucleic Acid Hybridization, a Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985), cujas referências são aqui incorporadas como referência. A fonte de ADN ou de cADN terá de preferência sido enriquecida em relação a sequências de N^α-acetiltransferase. Esse enriquecimento pode ser obtido mais facilmente a partir de cADN obtido extraíndo ARN de células cultivadas em condições que são caracterizadas por expressão de N^α-acetiltransferase.

Técnicas tais como, ou semelhantes às descritas anteriormente permitiram realizar com sucesso a clonagem de genes para desidrogenases de aldeído humanas (Hsu, L.C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3771-3775 (1985)), fibronectina (Suzuki, S. et al., Eur. Mol. Biol. Organ. J. 4:2519-2524 (1985)), o gene receptor do estrogênio humano (Walter, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7889-7893 (1985)), activador do plasminogênio do tipo tissular (Pennica, D. et al., Nature 301:214-221 (1983)) e ADN complementar da fosfatase alcalina da placenta de termo humana (Kam, W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8715-8719 (1985)).

Num modo alternativo preferido de clonagem do gene da N^α-acetiltransferase, é preparada uma livraria de vectores de expressão por clonagem de ADN ou, com maior preferência de cADN,



a partir de uma célula capaz de expressar a N^{α} -acetiltransferase num vector de expressão. A livraria é então analisada em relação a membros capazes de expressar uma proteína que se ligue a um anticorpo anti- N^{α} -acetiltransferase, e que tenha um sequência de nucleótidos que seja capaz de codificar polipeptídeos que têm a mesma sequência de amino ácidos como N^{α} -acetiltransferase ou fragmentos de N^{α} -acetiltransferase.

O gene da N^{α} -acetiltransferase clonado, obtido pelos métodos descritos anteriormente, pode ser ligado de um modo operatório a um vector de expressão, e introduzido em células bacterianas, ou eucarióticas a fim de produzir a proteína de N^{α} -acetiltransferase. Técnicas para essa manipulação são apresentadas por Maniatis, T. et al., supra, e são bem conhecidos neste campo.

A codificação da sequência de ADN para a N^{α} -acetiltransferase pode ser derivada de uma série de fontes. Por exemplo, mRNA codificado para N^{α} -acetiltransferase pode ser isolado a partir de tecidos de quaisquer espécies que produzam o enzima, usando o método da mancha Northern (Alwine et al., Method Enzymol. 68:220-242 (1979)), e dispositivos de oligonucleótidos marcados. O mRNA pode ser convertido em cADn por técnicas conhecidas pelos especialistas neste campo.

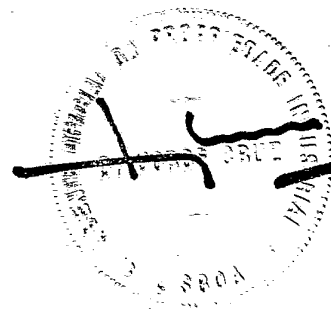
O dispositivo de ADN pode ser marcado com um grupo detectável. Esse grupo detectável pode ser qualquer material apresentando uma propriedade física ou química detectável. Esses materiais têm sido bem desenvolvidos no campo de imunensaio e em geral a maior parte de quaisquer marcadores úteis nesses métodos pode ser aplicada ao presente invento. Particularmente úteis são grupos enzimaticamente activos, tais como enzimas (ver Clin. Chem. 22:1243 (1976)), substratos enzimáticos (ver Espec.



Pat. Britânica 1.548.741), coenzimas (ver Patentes dos E.U.A. Nos. 4.230.797 e 4.238.565) e inibidores de enzima (ver Patente dos E.U.A. No. 4-134.792); agentes de fluorescência (ver Clin. Chem. 25:353 (1979)); cromóforos; agentes de luminescência tais como agentes de quimioluminescência e agentes de bioluminescência (ver Clin. Chem. 25:512 (1979)); ligandos especificamente ligáveis; pares interactuantes próximos; e radioisótopos tais como ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{125}I e ^{14}C . Esses marcadores e pares marcadores são detectados tendo como base as suas próprias propriedades físicas (por exemplo, agentes de fluorescência, cromóforos e radioisótopos) ou as suas propriedades reactivas ou de ligação (por exemplo, enzimas, substratos, coenzimas e inibidores). Por exemplo, um dispositivo cofactor-marcado pode ser detectado adicionando o enzima em relação ao qual o marcador é um cofactor e um substrato para o enzima. Por exemplo, pode-se usar um enzima que actue sobre um substrato a fim de dar origem a um produto com uma propriedade física mensurável. Exemplos deste último incluem, mas não se limitam a, beta-glicosidase, fosfatase alcalina e peroxidase.

E. Expressão das Sequências do gene da
N^α-acetiltransferase

As moléculas de ADN ou de cADN que codificam o enzima N^α-acetiltransferase podem ser ligadas de um modo operável a um vector de expressão e introduzidas numa célula hospedeiro para permitir a expressão do enzima N^α-acetiltransferase por essa célula. é referido que duas sequências de ADN (tais como sequência de região promotora e uma sequência de codificação do enzima desejado) são ligadas de um modo operável se a natureza da ligação entre as duas sequências de ADN não (1) resultar na introdução de uma mutação deslocada no quadro, (2) interferir com

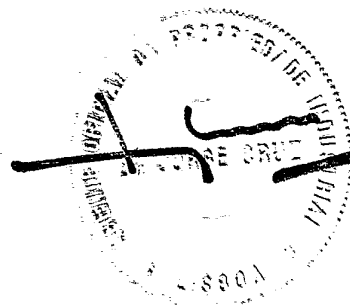


a capacidade da sequência da região promotora para dirigir a transcrição da sequência do gene codificador do enzima desejado, ou (3) interferir com a capacidade da sequenciado gene do enzima desejado ser transcrito pela sequência da região promotora.

Uma sequência de ADN codificando N^A -acetiltransferase pode ser recombinada com vector ADN de acordo com técnicas convencionais, incluindo terminus plano ou em ziguezague para ligação, digestão enzimática com restrição para proporcionar termini apropriados, obturação das extremidades coesivas como seja apropriado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar reunião indesejável, e ligação com ligases apropriadas.

O presente invento abrange a expressão do enzima desejado em quaisquer células procarióticas ou eucarióticas. Numa apresentação, utiliza-se um vector que é capaz de integrar as sequências do gene desejado no cromossoma da célula hospedeira. Células que integraram estávelmente o ADN introduzido nos seus cromossomas podem ser seleccionadas introduzindo também um ou mais marcadores que permitem a selecção de células hospedeiras que contêm o vector de expressão. O marcador pode proporcionar como complemento uma auxotrofia no hospedeiro (tal como leu2, ou ura3, que são marcadores auxotróficos comuns da levedura), resistência biocida, por exemplo, antibióticos, ou metais pesados, tais como cobre, etc. O marcador seleccionável do gene pode ser ou directamente ligado às sequências do gene do ADN a ser expresso, ou introduzido na mesma célula por co-transfecção.

Numa apresentação preferida, a sequência introduzida irá ser incorporada num plasmídeo ou vector viral capaz de replicação autónoma no hospedeiro recipiente. Pode-se utilizar para esta finalidade qualquer um de uma série de vectores. Factores importantes para a selecção de um plasmídeo ou vector



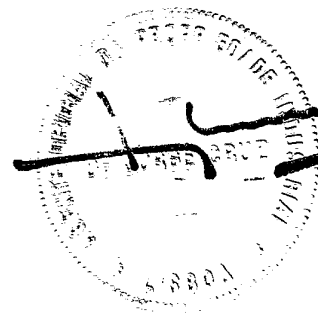
viral incluem: a facilidade com que as células recipientes que contêm o vector podem ser reconhecidas e seleccionadas de entre as células recipientes que não contêm o vector; o número de cópias do vector que são desejadas num determinado hospedeiro; e se é desejável que o vector faça (vai-vem) entre células hospedeiras de espécies diferentes.

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

1. Expressão em Células procarióticas

Hospedeiros procarióticos preferidos incluem bacterias tais como E. coli, Bacillus, Streptomyces, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, etc. O hospedeiro procariótico mais preferido é E. coli. Os hospedeiros bacterianos de particular interesse incluem E. coli K12 estirpe 294 (ATCC 31446), E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli W3110 (F⁻, lambda⁻, prototrófico (ATCC 27325)), e outras enterobacterium tais como Salmonella typhimurium ou Serratia marcescens, e várias espécies Pseudomonas. O hospedeiro procariótico deve ser compatível com as sequências de replicação e de controlo no plasmídeo de expressão.

Para expressar o enzima desejado numa célula procariótica (tal como, por exemplo, E. coli, B. subtilis, Pseudomonas, Streptomyces, etc.), é necessário ligar de um modo operável a sequência de codificação do enzima desejado a um promotor procariótico funcional. Esses promotores podem ser quer constitutivos quer, com maior preferência, reguláveis (isto é, induzível ou desrepressível). Exemplos de promotores constitutivos incluem o



promotor int do bacteriófago λ , e o promotor bla do gene β -lactamase de pBR322, etc. Exemplos de promotores procarióticos induzíveis incluem os principais promotores direitos e esquerdos do bacteriófago λ (P_L e P_R), os promotores trp, recA, lacZ, lacI, gal, e tac de E. coli, a α -amilase (Ulmanen, I., et al., J. Bacteriol. 162: 176-182 (1985)) e os promotores σ -28-específicos de B. subtilis (Gilman, M.Z., et al., Gene 32:11-20 (1984)), os promotores de bacteriófagos de Bacillus (Gryczan, T. J., In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, Inc., NY (1982)), e promotores de Streptomyces (Ward, J.M., et al., Mol. Gen. Genet. 203:468-478 (1986)). Os promotores procarióticos são revistos por Glick, B.R., (J. Ind. Microbiol. 1:277-282 (1987)); Cenatiempo, Y. (Biochimie 68:505-516 (1986)); e Gottesman, S. (Ann. Rev. Genet. 18:415-442 (1984)).

A expressão apropriada numa célula procariótica também requer a presença de um sítio de ligação ao ribossoma para cima da sequência codificadora do gene. Esses sítios de ligação ao ribossoma são indicados, por exemplo, por Gold, L., et al., (Ann. Rev. Microbiol. 35:365-404 (1981)).

A sequência de codificação do enzima desejado e um promotor ligado de um modo operável podem ser introduzidos num recipiente célula procariótica ou eucariótica ou como molécula de ADN de não-replicação (ou ARN), que pode ser ou uma molécula linear ou, com maior preferência, uma molécula circular covalente fechada. Visto que essas moléculas são incapazes de replicação autônoma, a expressão do enzima desejado pode ocorrer através de expressão transitória da sequência introduzida. Alternativamente, pode ocorrer expressão permanente através da integração da sequência introduzida no cromossoma hospedeiro.

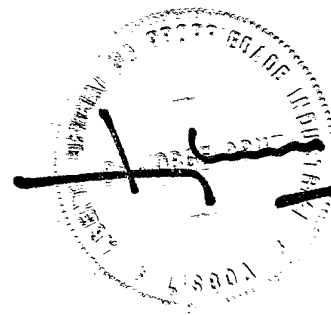


Vectores procarióticos preferidos incluem plasmídeos tais como os capazes de replicação em E. coli (tais como, por exemplo, pBR322, ColE1, pSC101, pACYC 184, π VX. Esses plasmídeos são, por exemplo, apresentados por Miniatis, T., et al. (In: Molecular Cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)). Plasmídeos Bacillus incluem pC194, pC221, pT127, etc. Esses plasmídeos são apresentados por Gryczan, T. (In: The Molecular Biology of the Bacilli, Academic Press, NY (1982), pp. 307-329). Plasmídeos Streptomyces apropriados incluem pIJ101 (Kendall, K.J., et al., J. Bacteriol. 169:4177-4183 (1987)), e bacteriófagos streptomyces tais como ϕ C31 (Chater, K.F., et al., In: Sixth International Symposium on Actinomycetales Biology, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary (1986), pp. 45-54). Os plasmídeos pseudomonas são revistos por John, J.F., et al., (Rev. Infect. Dis. 8:693-704 (1986)), e Izaki, K. (Jpn. J. Bacteriol. 33:792-742 (1978)).

Uma vez o vector ou a sequência de ADN contendo os elementos idealizados, preparados para expressão, os elementos idealizados de ADN podem ser introduzidos num hospedeiro apropriado. Podem ser utilizadas várias técnicas, tais como fusão protoplástica, precipitação de fosfato de cálcio, electroporação ou outras técnicas convencionais. Após a fusão, as células são feitas crescer em meios e são analisadas quanto a actividades apropriadas. A expressão da sequência resulta na produção do substrato-aminopeptidase específica.

2. Expressão em Células Eucarióticas

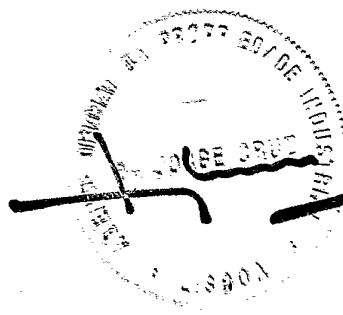
Os hospedeiros eucarióticos preferidos incluem levedura, fungos (especialmente Aspergillus), células de mamíferos



(tais como, por exemplo, células humanas ou de primatas) e células de plantas quer in vivo, quer em cultura de tecidos.

A expressão do enzima desejado em hospedeiros eucarióticos requer a utilização de regiões reguladoras eucarióticas. Essas regiões, incluirão, em geral, uma região promotora suficiente para dirigir a iniciação da síntese do ARN. Promotores eucarióticos preferidos incluem o promotor do gene I de metalotioneína do ratinho (Hamer, D., et al., J. Mol. Appl. Gen. 1:273-288 (1982)); o promotor TK do vírus Herpes (McKnight, S., Cell 31:355-365 (1982)); o promotor precoce SV40 (Benoit, C., et al. Nature (London) 290:304-310 (1981)); o promotor do gene gal4 da levedura (Johnston, S.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79:6971-6975 (1982); Silver, P.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:5951-5955 (1984)).

Como é amplamente sabido, a translação de mRNA eucariótico é iniciada no códon que codifica a primeira metionina. Por esta razão, é preferível assegurar que a ligação entre um promotor eucariótico e uma sequência de ADN que codifica o enzima desejado (ou um seu derivado funcional) não contem quaisquer códon interferentes que são capazes de codificar uma metionina (isto é, AUG). A presença desses códon resulta ou numa formação de uma proteína de fusão (se o códon AUG se situar no mesmo quadro de leitura que a sequência de ADN de codificação do enzima) ou uma mutação de desvio no quadro (se o códon AUG não se situar no mesmo quadro de leitura que a sequência de codificação do enzima desejado).



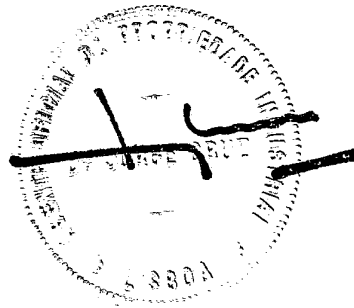
a. Expressão na Levedura

As células da levedura são hospedeiros preferidos do presente invento. A utilização da levedura proporciona vantagens substanciais pelo facto da levedura poder também apresentar modificações peptídicas pós-translacionais incluindo glicosilação. Pode ser utilizado um certo número de estratégias de ADN recombinante que utilizam sequências promotoras fortes e elevado número de cópias de plasmídeos que podem ser utilizados para produção das proteínas desejadas na levedura. A levedura reconhece sequências leader nos produtos do gene de mamífero clonado e segrega peptídeos tendo sequências leader (isto é, prépeptídeos).

Podem ser utilizados quaisquer uns de uma série de sistemas de expressão genética da levedura. Exemplos desses vectores de expressão incluem o círculo de 2 microns da levedura, os plasmídeos de expressão YEP13, YCP e YRP, etc., ou seus derivados. Esses plasmídeos são bem conhecidos nesta técnica (Botstein, D., et al., Miami Wntr. Symp. 19:265-274 (1982); Broach, J.R., In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 445-470 (1981); Broach, J.R., Cell 28:203-204 (1982)). YEP13 é o vector preferido do presente invento.

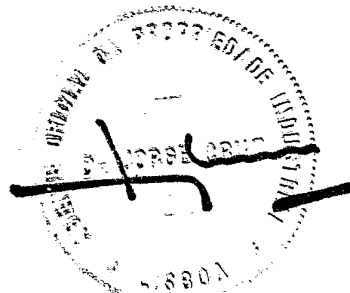
b. Expressão em Células de Mamíferos

As células dos mamíferos proporcionam modificações pós-translacionais às moléculas proteicas incluindo dobragem correcta ou glicosilação nos sítios correctos. As células de mamíferos que podem ser úteis como hospedeiros incluem células de



origem fibroblástica tais como VERO ou CHO-KI, e seus derivados. Para um hospedeiro mamífero, existem vários sistemas vectores possíveis disponíveis para a expressão do enzima desejado. Pode-se utilizar uma ampla série de sequências reguladoras transcricionais e translacionais, dependendo da natureza do hospedeiro. Os sinais reguladores transcricionais e translacionais podem ser derivados de fontes virais, tais como adenovírus, vírus do papiloma bovino, vírus Simian, etc., onde os sinais reguladores se encontram associados a um gene particular que tem um elevado nível de expressão. Alternativamente, podem ser utilizados promotores de expressão de mamíferos, tais como actina, colagénio, miosina, etc. Podem ser seleccionados sinais reguladores de iniciação transcricional que permitem a repressão ou activação, de modo a que a expressão dos genes possa ser modulada. Apresentam interesse os sinais regulatórios que são sensíveis à temperatura de tal modo que ao variar a temperatura, a expressão pode ser reprimida ou iniciada, ou que são submetidos a regulação química, por exemplo, metabolito.

Para um hospedeiro mamífero, encontram-se disponíveis para expressão vários sistemas vectores possíveis. Uma classe de vectores utiliza elementos de ADN que proporcionam plasmídeos extracromossómicos de replicação autónoma, derivados de vírus de animais tais como vírus do papiloma bovino, vírus do papiloma, adenovírus, ou vírus SV40. Uma segunda classe de vectores apoia-se na integração das sequências genéticas desejadas no cromossoma hospedeiro. As células que integraram estávelmente o ADN nos seus cromossomas podem ser seleccionadas introduzindo também um marcador que permite a selecção de células hospedeiras que contêm o vector de expressão. O marcador pode proporcionar prototropia a um hospedeiro auxotrópico, resistência biocida, por exemplo antibióticos, ou metais pesados, tais como cobre, etc. O marcador seleccionável do gene pode ser ou directamente ligado às



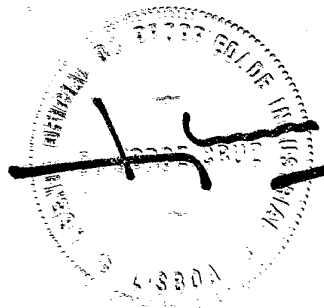
sequências de ADN a ser expressas, ou introduzido na mesma célula por cotransformação. Elementos adicionais podem também ser necessários para síntese óptima de mRNA. Estes elementos podem incluir sinais de união, assim como promotores de transcrição, agentes favorecedores, e sinais de terminação. Os vectores de expressão de cADN incorporando esses elementos incluem os descritos por Okayama, H., Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983), e outros.

c. Expressão em Células de Plantas

A N^á-acetiltransferase pode ser introduzida numa planta por técnicas de engenharia genética para aumentar a taxa de acetilação. É sabido que certos herbicidas são inactivados por acetilação. Assim, é possível produzir uma planta que seja mais tolerante em relação ao herbicida. Nesta outra apresentação deste invento, o gene da N^á-acetiltransferase é utilizado para transformar uma planta para aumentar a tolerância herbicida da planta.

A região de codificação para um gene da N^á-acetiltransferase que pode ser usada neste invento pode ser homóloga ou heteróloga em relação à célula da planta ou planta a ser transformada. É necessário, contudo, que a codificação da sequência genética para a N^á-acetiltransferase seja expressa, e produzida, como uma proteína ou polipeptídeo funcional na célula da planta resultante. Assim, o invento compreende plantas contendo genes da N^á-acetiltransferase homóloga ou da N^á-acetiltransferase heteróloga que expressa o enzima.

Numa apresentação deste invento, a N^á-acetiltransferase compreende uma N^á-acetiltransferase da planta que é homóloga em relação à planta a ser transformada. Numa outra apresentação deste invento, a N^á-acetiltransferase compreende um enzima que é



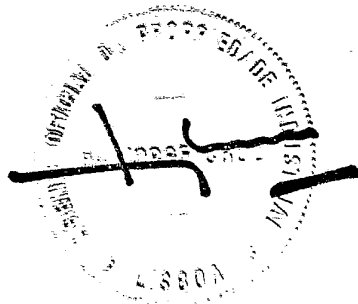
heterólogo em relação à planta a ser transformada. Além disso, pode ser usado neste invento ADN de ambos os ADN e cADN genómico codificando um gene da N^α-acetiltransferase. E ainda, um gene da N^α-acetiltransferase pode ser construído parcialmente de um clone de cADN e parcialmente de um clone genómico. Além disso, a codificação de ADN para o gene da N^α-acetiltransferase pode compreender porções de várias espécies.

Existe uma série de apresentações abrangidas no conceito amplo do invento. Numa destas apresentações, este invento compreende sequências genéticas quiméricas:

(a) uma primeira codificação de sequência genética para uma N^α-acetiltransferase a qual após expressão do gene numa determinada célula de planta é funcional para N^α-acetiltransferase;

(b) uma ou mais sequências genéticas adicionais ligadas de um modo operável em qualquer um dos lados da região de codificação da N^α-acetiltransferase. Estas sequências genéticas adicionais contêm sequências para promotor(es) ou terminador(es). As sequências reguladoras das plantas podem ser heterólogas ou homólogas em relação à célula do hospedeiro.

Numa apresentação 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 de planta eficiente que pode ser usado é um promotor de superprodução da planta. Este promotor em ligação operável com a sequência genética para a N^α-acetiltransferase deve ser capaz de promover a expressão da referida N^α-acetiltransferase de tal modo que a planta transformada tenha tolerância aumentada a um herbicida. Os promotores de superprodução da planta que podem ser usados neste invento incluem o promotor da pequena subunidade (ss) da carboxilase ribulose-1,5-bifosfato a partir da soja (Berry-Lowe et al.,



J. Molecular and App. Gen., 1:483-498 (1982)), e o promotor da proteína de ligação a/b da clorofila. Estes dois promotores são conhecidos por serem induzidos pela luz nas células de plantas eucarióticas (ver, por exemplo, genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective, A. Cashmore, Plenum, New York 1983, pages 29-38; Corruzi, G. et al., J. of Biol. Chem. 258:1399 (1983); e Dunsmuir, P. et al., J. of Mol. and Applied Genet., 2:285 (1983)).

Além disso, numa outra apresentação preferida, a expressão da sequência genética quimérica compreendendo o gene da N^a-acetiltransferase é ligado de um modo operável em quadro de leitura correcto com um promotor de planta e com uma sequência de sinal de secreção do gene.

A sequência genética quimérica compreendendo um gene de N^a-acetiltransferase ligado de um modo operável a um promotor da planta, e na apresentação preferida com as sequências de sinal de secreção, pode ser ligada a um vector de clonagem apropriado. Em geral, são usados plasmídeo ou vectores virais (bacteriofagos) contendo sequências de replicação e de controlo derivadas de espécies compatíveis com as células hospedeiro. O vector de clonagem apresentará tipicamente uma origem de replicação, assim como genes específicos que são capazes de proporcionar marcadores de selecção fenotípica em células hospedeiro transformadas, tipicamente resistência a antibióticos. Os vectores de transformação podem ser seleccionados por estes marcadores fenotípicos após transformação numa célula hospedeira.

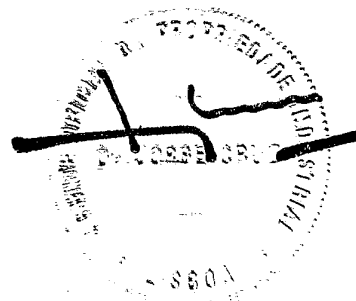
As células hospedeiras que podem ser usadas neste invento incluem procaríotas, incluindo hospedeiros bacterianos tais como E. coli, S. typhimurium e Serratia marcescens.



Hospedeiros eucarióticos tais como leveduras ou fungos filamentosos podem também ser usados neste invento.

O vector de clonagem e a célula hospedeira transformada com o vector são usados neste invento tipicamente para aumentar o número de cópias do vector. Com um número de cópias aumentado, os vectores contendo o gene da N^{ac}-acetiltransferase podem ser isolados e, por exemplo, usados para introduzir as sequências genéticas quiméricas nas células das plantas. O material genético contido no vector pode ser microinjectado directamente para células da planta pela utilização de micropipetas que transferem mecânicamente o ADN recombinante. O material genético pode também ser transferido para a célula da planta usando polietilene glicol que forma um complexo de precipitação com o material genético que é fixado pela célula. (Faszkowski et al., EMBO J. 3:2717-22 (1984)).

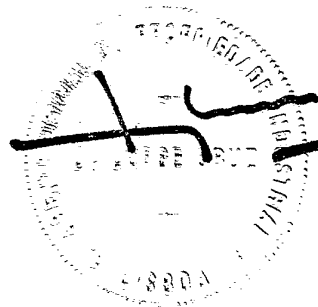
Numa apresentação alternativa deste invento, o gene da N^{ac}-acetiltransferase pode ser introduzido nas células da planta por electroporação. (Fromm et al., "Expressio og Genes Transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation," Proc. Nat l. Acad. Csi. U.S.A. 82:5824 (1985)). Nesta técnica, os protoplastos da planta são electroporados na presença de plasmídeos contendo o elemento idealizado genético da N^{ac}-acetiltransferase. Os impulsos eléctricos de elevada energia de campo permeabilizam reversivelmente as biomembranas permitindo a introdução de plasmídeos. Os protoplastos da planta electroporada reformam a parede celular, dividem, e formam o calo da planta. A selecção das células de plantas transformadas com N^{ac}-acetiltransferase expressa pode ser realizada usando os marcadores fenotípicos tal como foi descrito anteriormente.



Um outro método para introduzir o gene da N^a-acetiltransferase em células de plantas consiste em infectar a célula da planta com com Agrobacterium tumefaciens transformada com o gene da N^a-acetiltransferase. Em condições apropriadas conhecidas na técnica, as células da planta transformadas são feitas crescer para formar rebentos, raízes, e para desenvolver ainda plantas. As sequências genéticas da N^a-acetiltransferase podem ser introduzidas em células de plantas apropriadas, por exemplo, por meio do plasmídeo Ti de Agrobacterium tumefaciens. O plasmídeo Ti é transmitido a células de plantas por infecção por Agrobacterium tumefaciens e é estávelmente integrado no genoma da planta. (Horsch et al., "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants," Science 233:496-498 (1984); Fraley et al., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 80:4803 (1983)).

Os plasmídeos Ti contêm duas regiões essenciais para a produção de células transformadas. Uma delas, chamada ADN de transferência (T DNA), induz a formação de tumor. A outra, chamada região virulenta, é essencial para a formação mas não a manutenção de tumores. A região de ADN de transferência, que faz a transferência do genoma da planta, pode ser aumentada de tamanho pela inserção da sequência genética do enzima sem que a sua capacidade de transferência seja afectada. Por remoção dos genes causadores do tumor de modo a não continuarem a interferir, o plasmídeo Ti modificado pode então ser usado como um vector para a transferência dos elementos idealizados para o gene do invento para uma célula de planta apropriada.

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



Existem presentemente dois modos diferentes de transformar células de plantas com Agrobacterium:

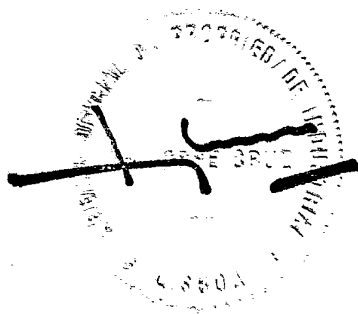
- (1) co-cultura de Agrobacterium com protoplastos isolados de cultura, ou
- (2) transformação de células ou tecidos com Agrobacterium.

O método (1) requer um sistema de cultura estabelecido que permita a cultura de protoplastos e a regeneração da planta a partir de protoplastos de cultura.

O método (2) requer (a) que as células ou tecidos das plantas possam ser transformados por Agrobacterium e (b) que as células ou tecidos transformados possam ser induzidos para se regenerarem em plantas totais. No sistema binário, para ter infecção, são necessários dois plasmídeos: um plasmídeo contendo T-DNA e um plasmídeo vir.

Após transformação da célula da planta ou planta, essas células de plantas ou plantas transformadas pelo plasmídeo Ti de modo ao enzima ser expressado, podem ser selecionadas por meio de um marcador fenotípico apropriado. Estes marcadores fenotípicos incluem, mas não se limitam a, resistência ao antibiótico. Outros marcadores fenotípicos são conhecidos na técnica e podem ser usados neste invento.

Todas as plantas a partir das quais os protoplastos podem ser isolados e cultivados para darem origem a plantas regeneradas totais podem ser transformadas pelo presente invento de modo a serem recuperadas plantas totais que contenham o gene da N^a-acetiltransferase. Algumas plantas apropriadas incluem, por exemplo, espécies dos gêneros fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manicot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus,



Sinapsis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersion,
Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium,
Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum,
Hemerocallis, Nemesia, pelargonium, Fanicum, Pennisetum,
Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browallia, Glycine,
Lolium, Zea, Triticum, Sorghum, e Datura.

Existe cada vez maior evidência de que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos em cultura, incluindo mas não se limitando a todas as espécies principais de cereais, cana do açúcar, beterraba, algodão, árvores de fruta e outras árvores, saladas e legumes. Presentemente existe um conhecimento limitado sobre o facto de todas as plantas poderem ser transformadas por Agrobacterium. As espécies que são plantas hospedeiras naturais para Agrobacterium podem ser transformáveis in vitro. As plantas monocotiledóneas, e em particular, os cereais e as relvas, não são hospedeiros naturais para Agrobacterium. Tentativas para as transformar usando Agrobacterium não têm sido até há pouco coroadas de êxito. (Hooykas-Van Slogteren et al., Nature 311:763-764 (1984)). Existe actualmente cada vez maior evidência de que certos monocotos podem ser transformados por Agrobacterium. Usando novas técnicas experimentais que se tornaram actualmente disponíveis espécies de cereais e de relvas podem ser transformáveis.

Gêneros de plantas adicionais que podem ser transformados por Agrobacterium incluem Ipomoea, Passiflora, Cyclamen, Malus, Prunus, Rosa, Rubus, Populus, Santalum, Allium, Lilium, Narcissus, Ananas, Arachis, Phaseolus, e Pisum.

A regeneração da planta a partir de protoplastos de cultura é descrita em Evans et al., "Protoplast Isolation and Culture," em Handbook of Plant Cell Culture 1:124-176 (McMillan

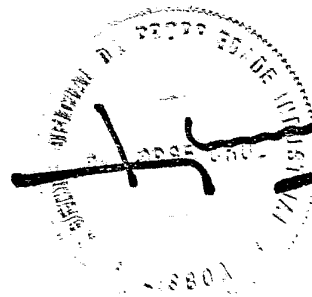


Publishing Co., New York, 1983); M.R. Davey, "Recent Developments in the Culture and regeneration of Plant Protoplasts,-" Protoplasts, 1983 - Lecture Proceedings, pp. 19-29 (Birkhauser, Basel, 1983); P.J. Dale, "Protoplast Culture and Plant regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops," in Protoplasts 1983 - Lecture Proceedings, pp. 31-41 (Birkhauser, Basel, 1983); e H. Binding, "Regeneration of Plants," in Plant Protoplasts, pp. 21-37 (CRC Press, Boca Raton, 1985).

A regeneração varia de espécie para espécie de plantas, mas geralmente é proporcionada em primeiro lugar uma suspensão de protoplastos transformados contendo múltiplas cópias do gene da N^a-acetiltransferase. A formação de embriões pode então ser induzida a partir de suspensões de protoplasto, até ao estadio de amadurecimento e de germinação como embriões naturais. Os meios de cultura conterão geralmente vários amino ácidos e hormonas, tais como auxina e citoquininas. É também vantajoso adicionar ácido glutâmico e prolina ao meio, especialmente para espécies tais como milho e alfalfa. Rebentos e raízes normalmente desenvolvem-se simultaneamente. A regeneração eficiente irá depender do meio, do genotipo, e da história da cultura. Se estas três variáveis forem controladas, então a regeneração será completamente reproduzível e repetível.

As plantas em maturação completa, feitas crescer a partir das células de plantas transformadas, são caracterizadas a fim de produzirem uma planta reproduzida. A planta reproduzida produz sementes contendo o gene para a N^a-acetiltransferase aumentada. Estas sementes podem ser feitas crescer para produzirem plantas que têm uma taxa aumentada de acetilação.

As plantas reproduzidas de acordo com este invento podem ser usadas para desenvolver híbridos tolerantes em relação



ao herbicida. Neste método, uma linhagem de plantas reproduzidas tolerantes em relação ao herbicida é cruzada com outra linhagem de plantas reproduzidas a fim de produzir o híbrido.

Partes obtidas a partir da planta regenerada, tais como flores, sementes, folhas, ramos, frutos, etc são abrangidas pelo invento contanto que estas partes compreendam as células tolerantes em relação ao herbicida. A descendência e variantes, e mutantes das plantas regeneradas são também incluídos no âmbito deste invento.

Em plantas diploides, tipicamente um ascendente pode ser transformado pela sequência genética da N^{α} -acetiltransferase e o outro ascendente é do tipo selvagem. Após cruzamento dos ascendentes, os híbridos da primeira geração (F1) irão revelar uma distribuição de $1/2 N^{\alpha}$ -acetiltransferase/tipo selvagem: $1/2 N^{\alpha}$ -acetiltransferase/tipo selvagem. Estes híbridos de primeira geração (F1) são caracterizados de modo a produzirem híbridos da segunda geração (F2). A distribuição genética dos híbridos F2 é $1/4 N^{\alpha}$ -acetiltransferase/ N^{α} -acetiltransferase: $1/2 N^{\alpha}$ -acetiltransferase/tipo selvagem : $1/4$ tipo selvagem/tipo selvagem. Os híbridos F2 com a estrutura genética de N^{α} -acetiltransferase/ N^{α} -acetiltransferase são escolhidos como as plantas tolerantes em relação ao herbicida.

Tal como é aqui usada, variante descreve alterações fenotípicas que são estáveis e hereditárias, incluindo variação hereditária que é sexualmente transmitida à descendência das plantas, contanto que a variante ainda compreenda uma planta tolerante em relação ao herbicida por meio de taxa aumentada de acetilação. Também, como é aqui usado, mutante descreve variação como um resultado de condições ambientais, tais como radiação, ou como resultado de variação genética em que um traço é transmitido

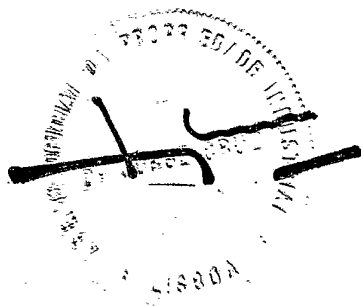


meioticamente de acordo com leis da hereditariedade bem estabelecidas. Contudo, a planta mutante, deve ainda apresentar uma tolerância em relação ao herbicida por meio de taxa aumentada de acetilação de acordo com o invento.

II. Utilização de estirpes do presente invento e suas N^{α} -Acetiltransferases

Tal como foi discutido anteriormente, o presente invento proporciona um meio para produzir enzimas N^{α} -acetiltransferases alterados, e para introduzir sequências genéticas que codificam estes enzimas nos diversos hospedeiros.

Células a que falta a actividade da N^{α} -acetiltransferase (isto é que expressam uma N^{α} -acetiltransferase alterada a que falta substancialmente actividade da N^{α} -acetiltransferase) são altamente desejáveis para facilitar a determinação da sequência de amino ácidos de proteínas. Tal como foi discutido anteriormente, a presença de grupos N^{α} -acetilo nos amino ácidos das proteínas dificulta grandemente os esforços para determinar a sequência de amino ácidos dessas moléculas. Como uma célula à qual falta actividade da N^{α} -acetiltransferase não irá catalisar a transferência de grupos acetilo para o terminus amino de proteínas, uma proteína produzida numa dessas células pode ser rapidamente sequenciada. Assim, por exemplo, uma célula com uma mutação nula no seu gene da N^{α} -acetiltransferase (tal como a mutação aaal-i de Saccharomyces cerevisiae) pode ser usada para produzir proteínas da levedura endógenas a que falta N^{α} -acetilação. Essas células, por exemplo, podem ser usadas para expressar uma proteína ou peptídeo recombinante a que falta um grupo acetilo no grupo α -amino da proteína (ou do peptídeo). Essas proteínas podem ser facilmente sequenciadas utilizando métodos conhecidos.



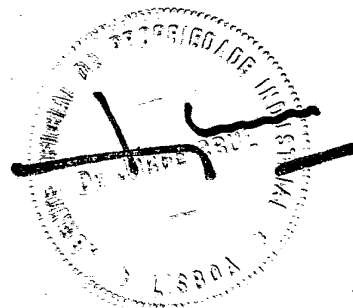
De um modo semelhante, essa célula mutante nula pode ser usada como um hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas (isto é proteínas não naturalmente ou normalmente produzidas por essas células) a fim de facilitar a elucidação da sequência de amino ácidos dessas proteínas.

A capacidade para produzir células mutantes cuja N^{α} -acetiltransferase seja mais activa, ou seja produzida em níveis mais elevados, do que a N^{α} -acetiltransferase normal, é desejável quando se pretende produzir proteínas apresentando N^{α} -acetilação aumentada. Tal como foi discutido anteriormente, essas proteínas são desejáveis por serem mais estáveis do que as proteínas não acetiladas.

A capacidade para alterar a actividade da N^{α} -acetiltransferase de acordo com uma actividade desejada (tal como especificidade do substrato aumentada ou diminuída, estabilidade térmica, etc.) é útil para permitir o desenvolvimento de células hospedeiras capazes de produzir proteínas apresentando características de N^{α} -acetilação alteradas.

Os enzimas N^{α} -acetiltransferases alterados podem ser purificados e usados in vitro do mesmo modo que foi descrito anteriormente para células hospedeiras mutantes.

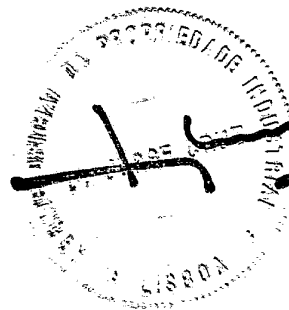
Tendo agora descrito em geral este invento, este último será melhor compreendido tendo como referência exemplos específicos, que são aqui incluídos tendo finalidades apenas ilustrativas, e que não pretendem ser limitativos a não ser que especificado de um modo diferente.



EXEMPLO 1

CRESCIMENTO DE CÉLULAS DA LEVEDURA

Os meios de cultura da levedura foram preparados, tal como foi descrito por Sherman et al. (Sherman, F., et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986)): YDP continha 1% de extracto de levedura-Bacto, 2% de peptona-Bacto, e 2% de glucose; YGP continha 1% de extracto de levedura-Bacto, 2% de peptona-Bacto, e 3% de glicérol; SD continha 0,7% de base de azoto da levedura Difco sem amino ácidos e 25 de glucose; e agentes nutritivos essenciais para estirpes auxotróficas foram fornecidos em concentrações especificadas (Sherman, F., et al., Methods in Yeast genetics, Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986)).



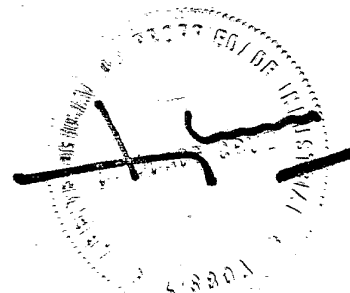
EXEMPLO 2

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E ENSAIO DE N^α-ACETILTRANSFERASE

Um método preferido para purificar a N^α-acetiltransferase normal ou alterada do presente invento é o de Lee, F.-J.S., et al., (J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1988), cuja referência é aqui incorporada integralmente como referência). Resumidamente, os métodos isolam N^α-acetiltransferase tratando células da levedura com liticase e em seguida homogeneizando os resultantes esferoplastos num tampão hipotônico. A N^α-acetiltransferase da levedura é libertada a partir do lisado das células por meio de agitação suave. A N^α-acetiltransferase pode ser concentrada, por exemplo por ultrafiltração com membrana PM-30, e dialisada durante a noite usando, por exemplo, tampão HDG (HEPES 20 mM-K⁺, pH 7,4, DTT 0,5 mM, 10% (v/v) de glicerol e 0,02% de NaN₃) contendo KCl 0,2 M. A meia vida das preparações de N^α-acetiltransferase da levedura pode ser estabilizada pela adição de 10% de glicerol.

A preparação de N^α-acetiltransferase pode facultativamente ser ainda purificada por remoção de biomateriais celulares residuais no produto flutuante. Pode utilizar-se para este processo a permuta iônica. A cromatografia em DEAE-Sepharose com eluição constante com sal (KCl 0,2 M) constitui um processo preferido.

Se desejado, a N^α-acetiltransferase pode ser ainda purificada reunindo e concentrando fracções de pico a partir de cromatografia de permuta iônica, dialisando com tampão apropriado (tal como tampão HDG contendo KCl 0,05 M), e carregando numa coluna de resina de permuta iônica (por exemplo, DEAE-Sepharose) com eluição com um gradiente salino contínuo (por exemplo, KCl 0,05 a 0,5M). A reunião de acetiltransferase a partir desta



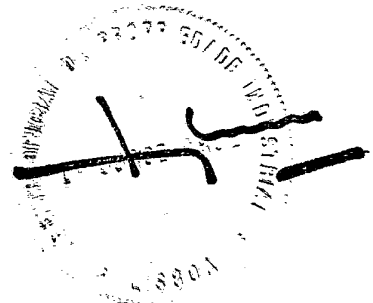
coluna pode ser concentrada, dialisada e analisada em relação à actividade da acetiltransferase.

As fracções de pico a partir da coluna de permuta iónica podem ser ainda purificadas pela utilização de uma coluna de adsorção usando hidroxilapatite. Como é sabido nesta técnica, uma coluna de hidroxilapatite irá adsorber selectivamente proteínas para íões de cálcio sob a forma de hidroxifosfato de cálcio. A coluna de hidroxilapatite é de preferência eluída com um gradiente linear de sal e as fracções activas podem ser identificadas e reunidas.

Se desejado, as fracções de pico a partir da coluna de hidroxilapatite podem ser reunidas, concentradas, dialisadas com tampão apropriado (tal como tampão HDG contendo KCl 0,05 M), e carregadas numa coluna de permuta iónica, de preferência celulose-DE52, com um gradiente contínuo de sal.

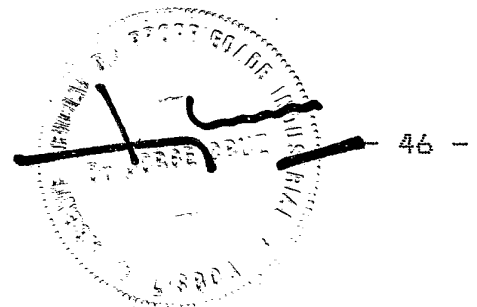
As fracções de pico a partir da coluna de DE52-celulose podem ser ainda purificadas, se desejado, reunindo as fracções activas, concentrando a actividade da N^A -acetiltransferase, dialisando com tampão apropriado (tal como tampão HDG contendo KCl 0,05 M), e aplicando numa coluna de afinidade, tal como Affi-Blue gel, com uma eluição de gradiente contínuo de sal (tal como KCl 0,05 a 1,0 M). é gerado um único pico de actividade que se centrou a KCl 0,6 M.

Usando estas séries de passos de cromatografia, a acetiltransferase da levedura pode ser purificada aproximadamente 4.400 vezes a partir do extracto celular com um rendimento de 27%. A actividade da N^A -acetiltransferase pode ser medida como se segue: foram preparados lisados crus de levedura, e a actividade da N^A -acetiltransferase foi determinada tal como foi previamente



descrito (Lee, F-J.S., et al., J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1989)). Porções alíquotas do lisado foram adicionadas a tubos de Eppendorf com 0,5 ml contendo a mistura da reação de HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 150 mM, DTT 1 mM, [³H] acetil coenzima A 25 μM (0,5 μCi) e ACTH 50 μM (1-24) com um volume final ajustado de 100 μl. A mistura do ensaio foi incubada a 30°C durante 30 minutos. A reação foi interrompida adicionando ácido acético 0,5 M e arrefecendo num banho de gelo. As amostras da reação foram filtradas através de discos de membrana SP (Cuno), sendo em seguida lavadas com ácido acético 0,5 M numa máquina para amostras de repetição Millipore 1225. As membranas parcialmente secas foram colocadas num cocktail de cintilação e contadas com um contador de cintilação Beckman LS 3801. A radioatividade no controle representando acetilação dos compostos endógenos é subtraída de cada determinação de amostra. Uma unidade de actividade é definida como 1 pmol de resíduos de acetilo incorporado em ACTH (1-24) em condições de ensaio padrão.

Tal como é aqui usada, a expressão "substancialmente pura" ou "substancialmente purificada" pretende descrever N^α-acetiltransferase que se apresenta substancialmente livre de qualquer composto normalmente associado ao enzima no seu estado natural, isto é, livre de proteína e de componentes hidratados de carbono. A expressão pretende ainda descrever N^α-acetiltransferase que é homogênea em relação a uma ou mais características de pureza ou de homogeneidade usadas pelos especialistas nesta técnica. Por exemplo, uma N^α-acetiltransferase substancialmente pura apresentará características constantes e reproduzíveis com desvios experimentais padrão para parâmetros tais como os que se seguem: peso molecular, técnicas de cromatografia, e outros parâmetros. A expressão, contudo, não pretende excluir misturas artificiais ou sintéticas dos enzimas com outros compostos. A expressão também não pretende excluir a presença de impurezas

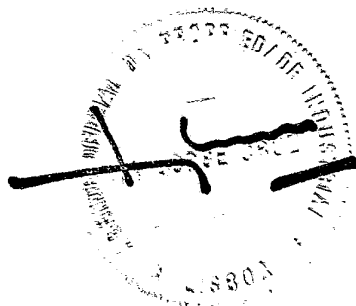


secundárias que não interferem com a actividade biológica da enzima, e que podem estar presentes, por exemplo, devido a purificação incompleta.

EXEMPLO 3

ESPECIFICIDADE COMPARATIVA DAS N^α-ACETILTRANSFERASES

Verificou-se que o mutante aaal possuía uma segunda N^α-acetiltransferase até agora não suspeitada. Esta segunda N^α-acetiltransferase é uma actividade da N^α-acetiltransferase da metionina, e é designada como "M-N^α-AT". Esta segunda N^α-acetiltransferase é o assunto do Requerimento da Patente dos E.U.A. de John A. Smith and Fang-Jen S. Lee, registado em 25 de Outubro, 1989, com o título "IDENTIFICAÇÃO DA N^α-ACETILTRANSFERASE DA METIONINA" que é aqui incorporado como referência. A fim de comparar a especificidade e a actividade relativas da AAA1 N^α-acetiltransferase ("N^α-AT") do presente invento com a actividade da N^α-acetiltransferase da metionina (M-N^α-AT) do Requerimento da Patente dos E.U.A. de John A. Smith and Fang-Jen S. Lee, registado em 25 de Outubro, 1989, com o título "IDENTIFICAÇÃO DA N^α-ACETILTRANSFERASE", foram preparados peptídeos sintéticos. Estes peptídeos foram avaliados quanto à sua capacidade para servirem como substratos para os dois enzimas. Os resultados desta experiência são indicados nos Quadros 2 e 3. No Quadro 2, é investigado o efeito do amino ácido do amino terminal; no Quadro 3, é investigado o efeito do amino ácido do penúltimo amino sobre a actividade.



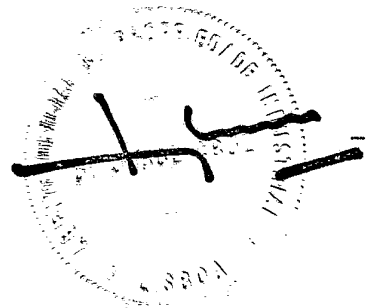
QUADRO 2

ACTIVIDADE RELATIVA DAS ACETILTRANSFERASES N^α-AT E M-N^α-AT PARA A N^α-ACETILAÇÃO DOS PEPTÍDEOS SINTÉTICOS: INFLUÊNCIA DO RESÍDUO TERMINAL AMINO

Substrato	Actividade (%) (actividade média ± S.D.) N ^α -ATM-N ^α -AT
ACTH (Humano) S-Y-S-M-E-H-F-R-W-G-K-P-V-G-K-K-R-R-P-V-K-V-Y-P	100±500
DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) S-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P	102±50
[A ¹] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) A-I-F-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P	00
[R ¹] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) R-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P	00
[N ¹] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) N-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P	00
[D ¹] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) D-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P	00
[C ¹] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) C-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P	00
[Q ¹] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	00



Q-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[e ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	00
E-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[G ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	23±30
G-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[I ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	00
I-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[L ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	00
L-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[H ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	19±20
H-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[K ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	00
K-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[M ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	15±20
M-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[F ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	9±20
F-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[P ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	70±40
P-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[T ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	103±50
T-I-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P		
[W ¹]	DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura)	00



[N²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 116±5 0
S-N-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[D²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 171±9 0
S-D-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[C²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 136±7 0
S-C-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[Q²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 134±7 0
S-Q-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[E²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 121±6 0
S-E-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[G²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 84±5 0
S-G-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[L²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 126±5 0
S-L-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[H²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 125±6 0
S-H-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[K²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 151±6 0
S-K-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[M²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 140±7 0
S-M-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P

[F²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 118±6 0
S-F-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P



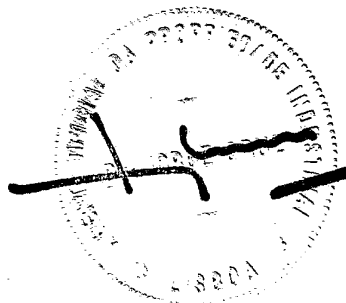
- [P²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 0 0
S-F-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P
- [S²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 140±6 0
S-S-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P
- [T²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 144±8 0
S-T-F-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P
- [W²] DESHIDROGENASE I DO ALCOOL (1-24) (Levedura) 91±5 0
S-W-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P
- [Y²] DESHIDROGENASE I DO ^AALCOOL (1-24) (Levedura) 169±8 0
S-Y-P-E-T-Q-K-G-V-I-F-Y-E-S-H-G-K-L-E-Y-K-D-I-P
- [V²] DESHIDROGENASE I DO ^AALCOOL (1-24) (Levedura) 123±7 0

EXEMPLO 4

ROTURA DO GENE AAA1

Um fragmento HindIII foi removido da extremidade 3' do gene AAA1, eliminando desse modo aproximadamente 45% do gene, e 3,8 kb do gene hisG-URA3-hisG foi inserido num sitio EcoRV (Figura 2A). Um fragmento de ADN contendo a sequênçia aaa1-1-hisG-URA3-hisG foi então transformado numa levedura diploide ura3/ura3 (Estirpe MBD502) (Quadro 4) (Ito et al., *J. Bacteriol.*, 153:163-168 (1983)). Estes passos foram realizados do modo que se segue.

O plasmideo pBNH9 foi construído eliminando a extremidade 3' de AAA1 a partir do sitio HindIII na inserção AAA1 no



sítio HindIII no Bluescript (Stratagene) sendo então auto-ligado. O fragmento 3,8 kb de ADN contendo o gene URA3 da levedura e duas sequências repetidas hisG foi extirpado do plasmídeo pNKY51 (Alani, E., et al., Genetics 116:541-545 (1987)) por digestão com BglIII e BamHI, e as suas extremidades viscosas foram preenchidas com fragmento Klenow. O plasmídeo pBNH9 foi aberto cortando com EcoRV, e o fragmento contendo 3,8 kb de hisG-URA3-hisG foi ligado com extremidade cega a pBNH9 resultando em pBNHU9.

A fim de estudar o significado biológico da N^α-acetilação das proteínas, foi feita uma mutação com eliminação por rotura por meio de transposição do gene num passo único (Rothstein, R.J. Met. Enzymol. 101:202-211 (1983), cuja referência é aqui incorporada como referência). Basicamente, um fragmento 4,9 kb de ADN foi libertado de pBNHU9 por digestão com XhoI, e este fragmento foi usado para transformar várias estirpes. Foram seleccionados prototrofos de uracilo.

A eliminação do gene URA3 e um hisG repetido foi realizada aplicando Ura⁺, estirpe aaa⁻ (AB18-a) em placas de 5-FOA (ácido 5-fluoro-orótico), que são selectivas para estirpes ura3 (uracilo mais 5-FOA), tal como foi descrito previamente (Boeke, J.D., et al., Mol. Gen. Genet. 197:345-346 (1984)). Assim, AB18-ap (aaa1::hisG, ura3), uma estirpe resistente 5-FOA, foi derivada de AB18-a.

Os transformantes Ura⁺ foram isolados e esporulados, e os asci resultantes foram dissecados em esporos individuais para análise tétrada. A maior parte dos diploides deram origem a esporos peludos viáveis. Contudo, cada tétrada completa (20 tétradas) consistia em duas colónias com tamanho do tipo selvagem e duas colónias pequenas. A caracterização de tétradas completas



indicou que as colónias grandes eram compostas por células ura⁻ e que as colónias pequenas eram formadas por células ura⁺.

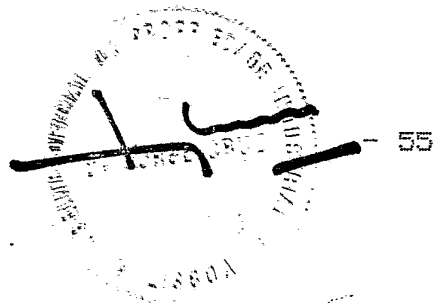
As tétradas foram analisadas por técnicas de mancha de ADN. Para estas técnicas, todos os enzimas de restrição foram adquiridos a New England Biolabs. Os marcadores de ADN foram obtidos nos Bethesda Research Laboratories. A membrana GeneScreen Plus foi fornecida por NEN. O ADN genómico da levedura foi isolado (Sherman, F., et al., Methods in Yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)), digerido com enzimas de restrição, submetido a electroforese em 0,8% de agarose em tampão Tris-borato, transferido para membrana GeneScreen Plus, e hibridizado com um fragmento preparado ao acaso, [³²P]-XhoI/BamHI de AAA1 (derivado de pBN9) durante 24 horas, lavado, e autoradiografado (Southern, E., J. Mol. Biol. 98:503-517 (1975)).

Esta análise de mancha de ADN de tétradas confirmou que esporos ura⁻ continham o fragmento 1,1 kb XhoI/BamHI ou 2,5 kb XhoI/SphI correspondente à versão do tipo selvagem de AAA1, enquanto que os esporos ura⁺ continham o fragmento de gene 3,8 kb URA3 adicional (Figura 2B). Porque as estirpes haploides e diploides eram viáveis quando continham apenas a rotura aaal-1::URA3, é evidente que AAA1 não é um gene essencial. Confirmação posterior de que o marcador URA3 define agora o gene aaal foi obtida por ensaio do enzima N^a-acetiltransferase (Lee, F.-J.S., et al., J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1988)).

O ensaio do enzima dos extractos de proteína a partir de células confirmou que os esporos ura⁺ não continham actividade detectável da N^a-acetiltransferase, enquanto que o diploide não transformado (+/+), o diploide heterozigoto (+/aaal 1), e os esporos ura⁻ apresentavam actividade enzimática normal. Um fragmento de ADN contendo a sequência aaa 1::URA3 foi também



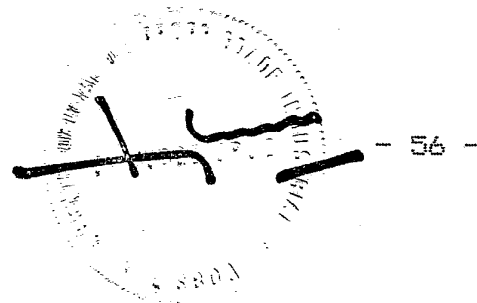
transformado em estirpes de levedura haploides ura3 (AB18, T3A) (Quadro 4). Foram isolados os transformantes ura destas estirpes haploides. A análise de mancha de ADN e o ensaio enzimático também confirmaram que o gene AAA1 tinha sido submetido a rotura.



QUADRO 4

ESTIRPES DE LEVEDURA

<u>Estirpe</u>	<u>Genotipo^a</u>
MGD502	<u>MATa/MATα+/ade2, arg4/+, cyh^r/cyh^s, his3+, leu2/leu2 trp1/trp1, ura3/ura3</u>
MGD502a	<u>MATa/MATα+/ade2, arg4/+, cyh^r/cyh^s, his3+, leu2/leu2 trp1/trp1, ura3/ura3, aaal-1/AAA1</u>
MGD5022a	<u>MATa/MATα+/ade2, arg4/+, cyh^r/cyh^s, his3+, leu2/leu2 trp1/trp1, ura3/ura3, aaal-1/aaal-1</u>
MGD502.4b	<u>MATa, arg4, cyh^r, his3, leu2, trp1, ura3, AAA1</u>
MGD502.4a	<u>MATa, arg4, cyh^r, his3, leu2, trp1, ura3, aaal-1</u>
MGD502.4c	<u>MATα ade2, cyh^s, leu2, trp1, ura3, AAA1</u>
MGD502.4d	<u>MATα ade2, cyh^s, leu2, trp1, ura3, aaal-1</u>
AB18	<u>MATa ade2-a, his5, lys2, trp1, ura3, aaal-1</u>
AB18-ap	<u>MATa ade2-1, his5, lys2, trp1, ura3, aaal-2</u>
T3A	<u>MATα his3, leu2, ura3, AAA1</u>
T3A-a	<u>MATα his3, leu2, ura3, aaal-1</u>
MS	<u>MATa/MATα ade2-1/+, his5/his3, +/-leu2, b lys2/+trp1/+, ura3/ura3</u>
MS-a	<u>MATa/MATα ade2-1/+, his5/his3, +/-leu2, c lys2/+trp1/+, ura3/ura3, aaal-1/AAA1</u>
MS-2a	<u>MATa/MATα ade2-1/+, his5/his3, +/-leu2, d lys2/+trp1/+, ura3/ura3, aaal-1/aaal-1</u>
F676	<u>MATa ade2, his6, met1, sst1-3, ural, rem1</u>



^a aaal-1 representa aaal::hisG-URA-hisG; aaal-2 representa aaal::hisG, tal como foi descrito em materiais e Métodos.

^b Diploide a partir de um cruzamento de AB1B e T3A.

^c Diploide a partir de um cruzamento de AB1B-a e T3A.

^d Diploide a partir de um cruzamento de AB1B-a e T3A-a.

EXEMPLO 5

FENOTIPO E ESTIRPES AAA1

O fenotipo das estirpes AAA1 foi examinado do modo que se segue. A morfologia da colônia foi examinada fazendo crescer as estirpes testadas em meio YPD a 30°C durante 3 dias e colocando então as células em placas com YPD. O tamanho e a morfologia das colônias foram avaliados após 5 dias de crescimento.

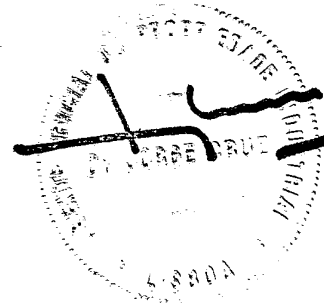
Taxas de crescimento específicas das estirpes testadas foram obtidas fazendo crescer células em meio YPD a 30°C, 200 rpm, e os valores OD_{600} foram determinados com intervalos de tempo específicos.

A entrada na fase estacionária foi determinada pelos três métodos que se seguem: (i) determinação da percentagem de células germinadas em culturas com 3 dias de idade feitas crescer em meio YPD, misturando uma porção alíquota da cultura com volume igual de 10% de formaldeído, sonicando com brevidade, e contando as células germinadas e não germinadas com um hemocitômetro (cerca de 1.000 células por determinação); (ii) determinação da percentagem de sobrevivência na fase estacionária (as células foram mantidas em meio SD a 30°C durante 5 dias, e após diluição

as células foram colocadas em placas com YPD, e após 2 dias contou-se o número de colónias); e (iii) determinação da acumulação de glicogénio invertendo placas com culturas com 5 dias sobre cristais de iodo num recipiente herméticamente fechado durante 3 a 5 minutos e registando a aparição de colónias castanho escuras contendo glicogénio.

A esporulação foi realizada tal como foi previamente descrito (Sherman, F., et al., Methods in Yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986)). As placas de pré-esporulação continham 0,5% de levedura-Bacto, 0,5% de peptona-Bacto, 1% de glucose e 2% de agar-Bacto. As células foram feitas crescer nestas placas durante 1 dia antes de serem transferidas para placas de esporulação, contendo 1% de acetato de potássio, 0,1% de extracto de levedura-Bacto, 2% de agar-Bacto, e agentes nutritivos auxotróficos apropriados. As células foram feitas crescer a 30°C a não ser que indicado de um modo diferente. A transformação da levedura foi feita pelo método do acetato de lítio (Ito, H., et al., J. Bacteriol. 153:163-168 (1983)). Foram usadas técnicas padrão para construção diploide e dissecação tétrada (sherman, F., et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986)). Os plasmídeos foram construídos por protocolos padrão tal como foi descrito por Maniatis et al. (maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)).

A eficiência da esporulação foi testada como se segue: as células foram feitas crescer em placas com YPD, foram transferidas para meio de esporulação (1% de acetato de potássio, 0,1% de extracto de levedura-Bacto, 0,05% de dextrose) com agentes nutritivos auxotróficos apropriados a 25°C, 250 rpm durante 1 dia. As células foram recolhidas por centrifugação (1.200 x g



durante 5 minutos a 20°C), e suspensas de novo em meio de esporulação mínima (acetato de potássio aquoso a 1%) com agentes nutritivos auxotróficos apropriados e incubadas durante 2 dias. A percentagem de células esporuladas foi determinada contando >500 células.

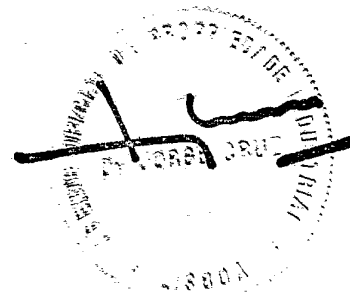
A sensibilidade ao calor foi determinada fazendo crescer as células até à fase log tardia em meio YPD a 30°C, diluindo até cerca de 1×10^5 por ml em meio SD, e com choque de calor a 54°C. Foram removidas porções alíquotas nos tempos indicados, que foram arrefecidas num banho de gelo, e após diluição, as células foram colocadas em placas com YPD. Três dias mais tarde, foram contadas as colónias, e foram determinadas as percentagens de sobrevivência.

EXEMPLO 6

MORFOLOGIA DAS ESTIRPES AAA1

As colónias pequenas formadas por células ura⁺ por análise tétrada proporcionaram evidência genética de que as células crescendo lentamente poderiam ter sofrido de rotura aaa1-1. Foi determinada a taxa de crescimento específico de cada célula haploide (tipo selvagem e mutante aaa1). Os dados demonstraram claramente que os mutantes aaa1 apresentam uma diminuição de 40-60% na sua taxa de crescimento específico (Quadro 5).

A fim de determinar se a mutação aaa1 vai afectar a entrada da célula numa fase estacionária, foram examinadas a taxa de células germinadas, a percentagem de sobrevivências estacionárias, e a acumulação de glicogénio. As culturas de cada uma das oito estirpes (Quadro 5) foram feitas crescer em meio YPD durante 3-5 dias a 30°C, até não se detectar posterior aumento no número



de células. O Quadro 5 indica que culturas de células aaal de qualquer dos tipos de reunião apresentavam taxas de células germinadas e não germinadas características de culturas de crescimento exponencial, enquanto que as estirpes do tipo selvagem apresentavam taxas de germinação características de culturas de fase estacionária. Além disso, sítios múltiplos e germinação aberrante foram frequentemente observados para as células mutantes. A percentagem de sobrevivência na fase estacionária foi determinada fazendo crescer cada uma das oito estirpes em meio SD durante 5 dias a 30°C. Esta experiência revelou que culturas não proliferativas de estirpes aaal perderam a viabilidade mais rapidamente do que culturas do tipo selvagem (Quadro 5). A acumulação de glicogénio foi determinada após colocação de cada uma das oito estirpes em placa com YPD durante 5 dias. Estas culturas em placas sem crescimento foram tratadas com curta exposição a vapor de iodo. Apenas o tipo selvagem se tornou castanho escuro devido a acumulação de glicogénio de armazenamento quando a célula entrou na fase estacionária. Os resultados apresentados anteriormente indicaram que a N^a-acetiltransferase é necessária para que as células entrem na fase estacionária.

Quando culturas com 3 dias foram colocadas em placas com YPD, verificou-se que as colónias aaal variavam de tamanho e apresentavam deformações, observando-se que aproximadamente 80% tinham um tamanho menor do que as de células do tipo selvagem. Colónias mutantes múltiplas foram colhidas, feitas crescer em YPD durante 3 dias, e colocadas em placas com YPD. Estas colónias mutantes aaal também apresentavam variações do tamanho e apresentavam deformações.



QUADRO 5

EFEITO DE AAA1 SOBRE A TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICO
E ENTRADA NA FASE ESTACIONÁRIA

<u>Estirpe</u>	<u>Taxa Crescimento Específico^a (hr⁻¹)</u>	<u>Células Germinadas (%)</u>	<u>Sobrevivência em Fase Estacionária(%)</u>	<u>Acumulação Glicogénio</u>
MGD502.4b (AAA1)	0.439	8	71	+
MGD502.4a (aaal-1)	0.169	45	9	-
MGD502.4c (AAA1)	0.435	10	62	+
MGD502.4d (aaal-1)	0.179	48	6	-
AB18 (AAA1)	0.421	7	56	+
AB18-a (aaal-1)	0.172	46	6	-
T3A (AAA1)	0.496	10	73	+
T3A-a (aaal-1)	0.302	54	10	-

^aAs células são feitas crescer em meio YPD a 30°C, 200 rpm e OD₆₀₀ foi determinado em vários intervalos de tempo.

^bAs células foram feitas crescer em meio TPD a 30°C durante 3 dias. Após curta sonicação, as células germinadas e não germinadas foram contadas com um hemocitômetro. >1.000 células foram contadas para cada determinação.

^cAs estirpes foram mantidas em meio SD a 30°C durante 5 dias. As células foram colocadas em placas com YPD, e as colônias foram contadas após dois dias.

EXEMPLO 7

O GENE AAA1 é REQUERIDO PARA A ESPORULAÇÃO

A esporulação em levedura, iniciada após regime de fome de células diploides MAT α /MAT α , representa um programa regulado de diferenciação (Esposito, R.E. et al., In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance (Strathern, J.N. et al., Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1981)).

A fim de avaliar se a N^o-acetilação desempenha um papel na esporulação, foram usados dois grupos de genotipo de estirpes de levedura diploide (MGD502 e MS) (ver Quadro 4), representando diploides do tipo selvagem (+/+), heterozigoto com rutura (+/aaal-1), homozigoto com rutura (aaal-1/aaal-1). Tal como é indicado no Quadro 5, ambas as estirpes diploides homozigóticas (aaal-1/aaal-1) (MS-2a e MGD502-2a) não esporularam eficientemente.



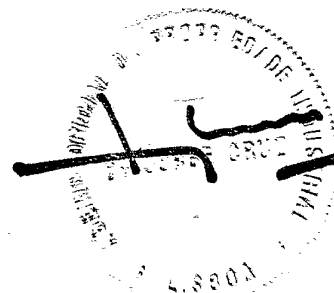
EXEMPLO 2

O GENE AAA1 é REQUERIDO PARA FUNÇÃO TIPO REUNIÃO ESPECÍFICA

As experiências de reunião foram realizadas do modo que se segue. As estirpes a ser testadas quanto a reunião foram feitas crescer durante a noite em meio YPD. Números iguais de células de cada tipo de reunião (cerca de 5×10^6) foram misturados, incubados em meio YPD durante 6 horas a 30°C , e examinados quanto à aglutinação. Além disso, as células foram colocadas em placas com SD, contendo agentes nutritivos essenciais para seleção auxotrófica, nas quais apenas diploides resultantes de reunião deveriam crescer. As células do tipo de reunião individual foram também colocadas isoladamente em placas com SD para ensaiar quanto à reversão de marcadores auxotróficos, e não foram observados quaisquer prototrofos.

Para o ensaio do factor- α , cerca de 10^4 células da estirpe do teste 3268-1-3 (α ss2-1) foram espalhadas numa placa com YPD (pH 4,5, e as células das estirpes do tipo-a a serem testadas foram reconhecidas na placa. Zonas de inibição do crescimento eram claramente visíveis após 2-3 dias de incubação a 30°C .

Mutantes aaa1 (MDG502.4a e AB18-a; ambos do tipo de reunião-a) foram testados quanto à resposta em relação ao factor- α . As células cresceram durante a noite a 30°C em YPD, sendo lavadas, suspensas de novo em 5 ml de YPD contendo o factor- α (1 μM) com uma densidade celular de 1×10^6 células por ml, e incubadas a 30°C . Amostras (0,1 ml) foram removidas com vários intervalos, misturadas com um volume igual de 10% de formaldeído, e as células apreendidas da fase G1 foram determinadas pela relação entre as células germinadas e não germinadas.



As células S. cerevisiae haploides aparecem em dois tipos de reunião, a e α , determinados pelo locus MAT (Nasymth, K., et al., Science 237:1162-1170 (1987)). As células com tipos de reunião opostos podem participar numa reacção de reunião que resulta em fusão celular e criação de uma célula diploide (Bender, A., et al., genetics 121:463-476 (1989); Sprague, G.F., et al., Annu. Rev. Microbiol. 37:623-660 (1983); Thurner, J., In: The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance, Strathern, E.W., et al. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 143-180 (1981)). Várias proteínas são responsáveis pelo processo de reunião, embora não seja claro se ocorre a N^A -acetilação de alguma delas.

As reuniões foram assim realizadas por mistura suave das estirpes aaal (MDG502.4d(α), MDG502.4a(α), T3A-a(α) ou AB18-1(α)) com estirpes do tipo de reunião oposto. Surpreendentemente, as estirpes de mutante aaal do tipo- α (AB18-a e MDG502.4a) não se aglutinaram tão bem como células do tipo- α do tipo selvagem quando misturadas com células do tipo- α do tipo selvagem. Testes de reunião quantitativos indicaram que a eficiência da reunião das células aaal MATa se encontrava significativamente reduzida, embora não desaparecida (Quadro 7). Dois mutantes aaal do tipo- α (T3A-a e MGD502.4d) produziram factor- α em níveis semelhantes aos das estirpes do tipo selvagem (T3A e MGD502.4c). Contudo, dois mutantes aaal do tipo- α (AB18-a e MDG502.4a) produziram menos factor- α do que as estirpes do tipo selvagem (AB18 e MGD502.4b). O mutante aaal do tipo- α (MGD502.4a) produziu pelo menos 30 vezes menos factor- α do que o tipo selvagem (MGD502.4b). Verificaram-se resultados semelhantes com AB18-a em comparação com AB-18.

Sabe-se que as células do tipo- α segregam o produto genético BAR1, chamado actividade de barreira, que degrada o



factor- α e desse modo desencadeia a resposta de reunião (Hicks, J.B., et al., Nature 260 246-248 (1976); Kronstad, J. W., Cell 50:369-377 (1987); Manney, T.R., J. Bacteriol. 155:291-301 (1983); Sprague, G.F., Jr., et al., Annu. Rev. Microbiol. 37:623-660 (1983)).

A actividade de barreira foi detectada por interferência em zonas produzidas por factor- α por uma fiada de células do tipo de reunião-a, tal como é descrito por Sprague and Herskowitz (Sprague, G.F., Jr., et al., J. Mol. Biol. 153:305-321 (1981)) e usando (sst1) F676 como a estirpe do teste, tal como é descrito por Hicks and Herskowitz (Hicks, A.H., et al., proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:7021-7025 (1984)). O factor- α sintético foi comprado a Bachem Bioscience inc. e dissolvido em 90% de metanol (2 mg/ml).

Esta experiência revelou que as estirpes mutantes aaal do tipo-a (AB18-a e MDG502.4a) apresentavam apenas uma ligeira redução da actividade de barreira em comparação com as células do tipo selvagem e supersensíveis. Além disso, mutantes aaal do tipo-a (AB18-a e MDG502.4a) não conseguiram parar na fase GI, quando as células foram suspensas de novo no YPD contendo factor- α 1 μ M.

EXEMPLO 9

ENSAIO QUANTO A PRODUÇÃO DE FEROMONE

A medição quantitativa da produção de feromone foi realizada como se segue: as células foram feitas crescer até à fase log tardia a 30°C, 200 rpm, em meio YPD. As células foram reunidas em pílula duas vezes por centrifugação a $1,3 \times 10^4$ g durante 5 minutos antes de ensaiar o produto flutuante quanto à



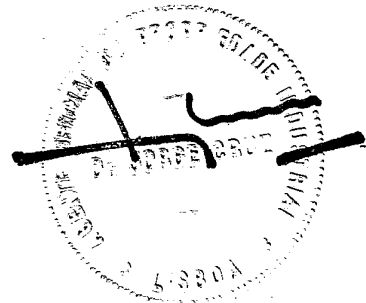
actividade de feromone. Diluições seriadas (duas a quatro vezes) de produtos flutuantes contendo feromone em tampão citrato (pH 4,5) foram localizadas (10 μ l) numa camada de células supersensíveis às feromonas e incubadas durante 36-48 horas a 23°C.

EXEMPLO 10

REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL DO GENE AAA1

Células de culturas de 500 ml foram colhidas na fase log média em meio YPD e em diferentes estadios do crescimento em meio YPD. O choque pelo calor foi realizado como se segue: quando o A_{600} da cultura em YPD atingiu cerca de 2,0, foram removidas duas porções aliquotas de 75 ml; uma foi aquecida a 37°C durante 2 horas, e a outra foi incubada a 30°C. O ARN total foi extraído de cada amostra (Sherman, F., et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1986)). O ARN da levedura (10 μ g) foi submetido a electroforese em 1,2% de gel agarose/formaldeído (Lehrach, H., et al., Biochemistry 16:4743-4751 (1977)). A camada contendo os marcadores ARN foi cortada em lâminas, visualizada por coloração com brometo de etídio, e usada para determinar os tamanhos moleculares dos ARNs. O ARN foi transferido para membrana GeneScreen Plus e hibridizado com [32 P]-AAA1 produzido ao acaso (derivado de pBH9, Figura 2A) e β -tubulina (Neff, N.F., et al., Cell 33:211-219 (1983) ADN durante 24 horas, lavado e autoradiografado (Thomas, P.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3201-3205 (1980)). Os níveis dos mARNs para AAA1 e β -tubulina foram determinados.

O ARN total foi assim preparado a partir de células feitas crescer em meio YPD na fase log média e meio YPD na fase log inicial, na fase log média, na fase estacionária, e após choque pelo calor a 37°C durante 2 horas. A análise da mancha de

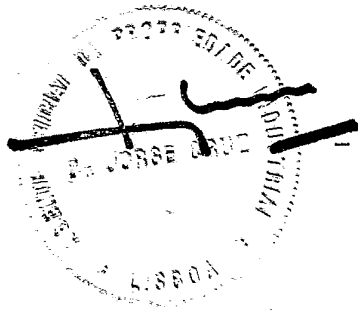


ARN foi realizada com AAA1 [³²P]-radiomarcado, produzido ao acaso e dispositivos de β -tubulina da levedura. Não houve efeito de repressão da glucose, fase de crescimento, ou choque de calor nos níveis de transcrição de AAA1 em comparação com o gene β -tubulina (Neff, N.F., et al. Cell 33:211-219 (1983)).

EXEMPLO 11

OS MUTANTES AAA1 SÃO SENSÍVEIS AO CHOQUE DE CALOR

Foi sugerido que a N^{ac}-acetilação desempenhava um papel na protecção de várias proteínas contra a degradação proteolítica intracelular (Jornvall, H., J. Theor. Biol. 55:1-12 (1975); Rubenstein, P., et al., J. Biol. Chem. 254:11142-11147 (1979)). A taxa do turnover da proteína mediado pelo sistema de degradação dependente da ubiquitin foi também documentada concluindo-se que dependia da presença de um grupo α -NH₂ livre no terminus-N das proteínas modelo (Bachmair, A., et al., Science 234:179-186 (1986)), e em células da levedura, verificou-se que a poliubiquitin era uma proteína do choque de calor (Finley, D., et al., Cell 48:1035-1046 (1987); Tanaka, K., et al., EMBO J. 7:495-502 (1988)). Contudo, não se verificou se a N^{ac}-acetilação das proteínas desempenhava ou não um papel na resistência ao choque de calor. Por esse motivo, células em crescimento exponencial em oito estirpes diploides (4 mutantes aaal e 4 do tipo selvagem) foram submetidas a choque de calor a 54°C, e as percentagens de sobrevivência foram determinadas em vários pontos do tempo. Tal como é indicado na Figura 3, as estirpes aaal (MGD502.4a e MGD502.4d) são mais sensíveis ao choque de calor que as estirpes do tipo selvagem (MGD502.4c e MGD502.4b). Outras estirpes aaal (AB18-a e T3A-a) mostraram-se também mais sensíveis do que as estirpes do tipo selvagem (AB18 e T3A).

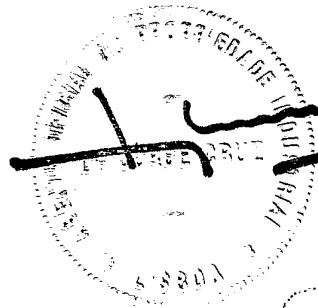


EXEMPLO 12

A EXPRESSÃO DO GENE AAA1 PODE COMPLEMENTAR A MUTAÇÃO AAA1

Os plasmídeos de expressão para o gene AAA1 foram construídos por inserção da região de codificação AAA1 nos vectores de expressão pVT-L100 (contendo um marcador LEU2) ou pVT-U100 (contendo um marcador URA3) no sítio XbaI seguindo imediatamente o promotor ADHI (Vernet, T., et al., Gene 52:225-233 (1987)). Estes plasmídeos são identificados como pLA1 ou pUA1, respectivamente.

Vários mutantes aaal foram transformados com plasmídeos pLA1 ou pUA1, contendo o gene AAA1. O transformante MDG502.2a/T (contendo pLA1) restaurou a deficiência da esporulação encontrada em MDG502-2a (Quadro 6). Além disso, a introdução de pLA1 em MDG502.4a (MATA, aaal) e pUA1 em AB1B-ap (MATA, aaal-2), restaurou a eficiência da reunião (Quadro 7). Estes transformantes também expressaram o factor de reunião a tão abundantemente como o tipo selvagem. Além disso, a taxa de crescimento específico destes transformantes foi restaurada, e as células foram capazes de entrar na fase estacionária.



QUADRO 6

EFEITO DE AAA1 SOBRE A EFICIÊNCIA DA ESPORULAÇÃO^A

<u>Estirpe</u>	<u>AAA1/Locus</u>	Eficiência de Esporulação (%)	Plasmídio PLA1(AAA1 ⁺)
MGD502	<u>AAA1/AAA1</u>	27	-
MGD502-a	<u>aaal-1/AAA1</u>	23	-
MGD502-2a	<u>aaal-1/aaal-1</u>	<0.1	-
MGD502-2a/T ^b	<u>aaal-1/aaal-1</u>	21	+
MS	<u>AAA1/AAA1</u>	16	-
MS-a	<u>aaal-1/AAA1</u>	12	-
MS-2a	<u>aaal-1/aaal-1</u>	<0.1	-

^aEficiência de esporulação de cada estirpe foi determinada após incubação em meios de esporulação e de esporulação mínima a 25°C durante 3 dias, tal como foi descrito em Materiais e Métodos.

^bMGD502-2a/T é MGD502-2a transformado com plasmídeo PLA1 que expressa o gene AAA1.



QUADRO 7

EFICIÊNCIAS DA REUNIÃO DO TIPO SELVAGEM E DAS ESTIRPES AAA1^A

Estirpe	estirpe α		estirpe a		Eficácia de Reunião (# de diploides)
	Genotipo	Estirpe	Genotipo	Estirpe	
MGD502.4c	α AAA1	MGD502.4b	a AAA1		2.1×10^5
MGD502.4c	α AAA1	MGD502.4a	a <u>aaal-1</u>		<100
MGD502.4d	α <u>aaal-1</u>	MGD502.4b	a AAA1		8.2×10^4
MGD502.4d	α <u>aaal-1</u>	MGD502.4a	a <u>aaal-1</u>		<100
T3A	α AAA1	AB18	a AAA1		1.4×10^5
T3A	α AAA1	AB18-a	a <u>aaal-1</u>		<100
T3A-a	α <u>aaal-1</u>	AB18	a AAA1		7.5×10^4
T3A-a	α <u>aaal-1</u>	MGD502.4a/T ^b	a <u>aaal-1</u> pLAI(<u>aaal</u> ⁺)		7.3×10^4
T3A	α AAA1	AB18-ap/T ^c	a <u>aaal-2</u> pUAI(<u>AAA1</u> ⁺)		6.7×10^4

^a Eficácia Reunião foi determinada a 30°C, tal como foi descrito em Materiais e Métodos.

^b MGD502.4a/T foi MGD502.4a transformado com pLAI transportando o gene AAA1

^c AB18-ap/T foi AB18-ap transformado com pUAI transportando o gene AAA1.



EXEMPLO 13

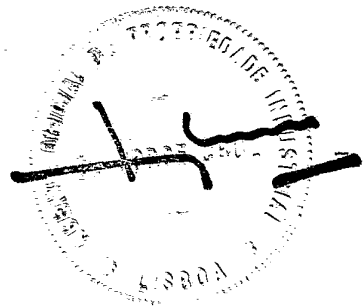
O GENE AAA1 DA LEVEDURA

As estirpes de levedura a que faltava o gene da N^α-acetiltransferase, AAA1, cresceram como colónias mais pequenas, com tamanhos variáveis, e deformadas em comparação com estirpes do tipo selvagem e as células destas estirpes germinaram de forma múltipla e anormal. Além disso, demonstrou-se que AAA1 era necessário para a entrada em fase estacionária, esporulação, resistência ao choque de calor e funções do tipo reunião específica, embora o papel da N^α-acetilação nestes processos continue a não ser claro.

Hershko et al., (Hershko, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7021-7025 (1984)) indicaram que as proteínas N^α-acetiladas são degradadas pelo sistema ubiquitin, dependente de ATP meno rapidamente do que as proteínas com termini-N livres, e sugeriram que N^α-acetilação se encontra envolvida na protecção contra a degradação da proteína. Além disso, a indução do gene UB14 (ubiquitin de codificação) por choque com calor sugeriu que a ubiquitin desempenha um papel na resposta ao choque com calor e que o seu papel fisiológico pode consistir em degradar proteínas alteradas ou tóxicas geradas pelo stress ambiental (Finley, D., et al., Cell 48:1035-1046 (1987); Tanaka, K., et al., EMBO J. 7:495-502 (1988)). Demonstrámos indirectamente que a N^α-acetilação desempenha um papel na resistência ao choque de calor. Contudo, é presentemente desconhecido quantas proteínas N^α-acetiladas se encontram envolvidas na protecção contra o choque de calor e se um grupo α-NH₂ exposto numa ou mais destas proteínas forma um sinal de reconhecimento para a conjugação de ubiquitin e para a degradação mediada pela ubiquitin.

Talvez que o mais notável dos fenótipos identificados dos mutantes aaal seja o do tipo-a, mas não o tipo- α , tendo os mutantes aaal se reunido menos eficientemente. Foi observado anteriormente que mutações em STE2 (receptor do factor- α) (Harting, A., et al., Mol. Cell Biol. 6:2106-2114 (1986); Jenness, D.D. et al., Cell 35:521-529 (1983)); STE6 e STE16 (genes requeridos para um factor-a de maturação) (Powers, S., et al., Cell 47:413-422 (1986); Wilson, K.L., et al., Mol. Cell Biol. 4:2420-2427 (1984), MFa1 e MFa2 (um factor) (Michaelis, S., et al., Mol. Cell Biol. 8:1309-1318 (1988)) resultaram numa redução de um milhão de vezes da eficácia do tipo de reunião. Em contraste, a mutação aaal resultou numa redução de um milhar de vezes da eficácia do tipo de reunião. Assim, é provável que a mutação aaal tenha reduzido mas não abolido, a expressão de certos produtos genéticos específicos em relação a a, tal como foi observado para a mutação ard1 (Whiteway, M., et al., Cell 43:483-492 (1985)). Foi sugerido que o produto genético ARD1 actua, directamente ou indirectamente, no locus HML e que reprime a sua expressão (Whiteway, M., et al., Mol. Cell Biol. 7:3713-3722 (1987)).

Níveis diferentes de acetilação foram observados para várias proteínas eucarióticas (Garlick, R.L., et al., J. Biol. Chem. 256:1727-1731 (1981); Jornvall, H., Eur. J. Biochem. 72:443-452 (1977); MacLeod, A.R., et al., Eur. J. Biochem. 78:281-291 (1977); Mahoney, W.C., et al., Biochemistry 19:4436-4442 (1980); Smyth, D.G., et al., Nature 288:613-615 (1980); Stegink, L.D., et al., J. Biol. Chem. 246:3001-3007 (1971); Takahashi, K., et al., FEBS Lett. 140:63-66 (1982)). Além disso, também se verificou que os isoenzimas (ADH I e ADH II) diferiam nos seus níveis de acetilação (Jornvall, H., et al., FEBS Lett. 111:214-218 (1980)). Esta acetilação diferencial pode ser devida a diferenças na estrutura primária entre os isozimas, uma falta de acetil-CoA disponível, ou diferenças no nível da actividade



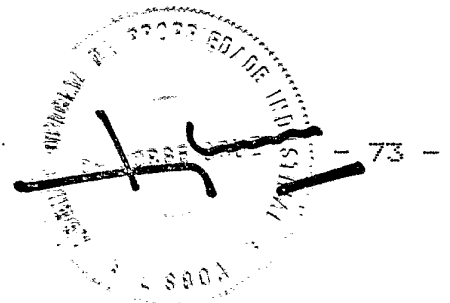
enzimática. Contudo, peptídeos sintéticos imitando resíduos 1-24 de ambos os isoenzimas ADH foram igualmente acetilados pela N^{α} -acetiltransferase da levedura, sugerindo que em condições nas quais o acetil CoA se encontra em excesso a acetilação eficaz de ambos os enzimas deve prosseguir (Lee, F-J.S., et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988)). Além disso, a análise da mancha de ARN revela que não se verificou um efeito importante sobre a repressão da glucose, fase de crescimento diferente, ou choque com calor sobre a regulação transcricional do gene AAA1. Contudo, estes resultados não excluem que a N^{α} -acetilação não seja regulada por modificação pós-translacional (fosforilação ou glicosilação) de ou regulação (inibição ou activação) da N^{α} -acetiltransferase.

A utilização expandida destes mutantes aaa1 e do gene AAA1 constitui a base para a elucidação da função biológica e da regulação da N^{α} -acetilação na levedura.

EXEMPLO 14

O ALELO aaa1 ALTERA A SÍNTESE DAS PROTEÍNAS EM SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Não é claro como é que a N^{α} -acetilação afecta a translação e o processamento eucarióticos (Wold, F., Trends Biochem. Sci. 9:256-257 (1984) e protege contra a degradação proteolítica (Jornvall, H., J. Theor. Biol. 55:1-12 (1975); Rubenstein et al., J. Biol. Chem. 254:11142-11147 (1979)). Além disso, a taxa do turnover da proteína mediada pelo sistema de degradação dependente da ubiquitin depende de um grupo α -NH₂ livre no terminus-NH₂ de proteínas modelo (Hershko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7021-7025 (1984); Bachmair et al., Science 234:179-186



(1986)), e esta dependência indica que a N^{α} -acetilação desempenha um papel crucial no impedimento do turnover da proteína.

A serina e a alanina são os resíduos terminais em N em proteínas acetiladas, e estes resíduos, conjuntamente com metionina, glicina, treonina, valina e ácido aspártico contribuem para quase a totalidade dos resíduos N^{α} -acetilados. (Tsunasawa et al., methods Enzymol. 106:165-170 (1984); Driessen et al., CRC Crit. Rev. Biochem. 18:281-325 (1985); Persson et al., Eur. J. Biochem. 152:523-527 (1985); Augen et al., Trends Biochem. Sci. 11:494-497 (1986); Tsunasawa et al., J. Biol. Chem. 260:5382-5391 (1985)). Contudo, visto nem todas as proteínas com estes resíduos nos termini N serem acetiladas, o mecanismo pelo qual certas proteínas se tornam acetiladas permanece obscuro.

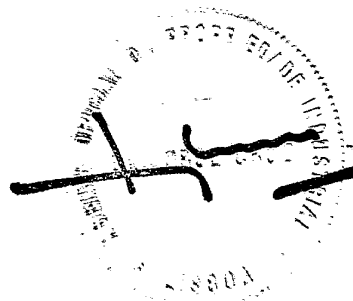
A fim de estudar o efeito da deficiência da N^{α} -acetiltransferase sobre a síntese das proteínas na levedura, uma comparação entre as proteínas solúveis, isoladas e depois separadas por electroforese em gel bi-dimensional, e o tipo selvagem e o mutante aaa1 foi realizada por meio de análise em computador de geles proteicos bi-dimensionais.

Para esta finalidade, foram usadas estirpes T3A da levedura (MATa, his3, leu2, ura3, AAA1) e T3A-a (MATa, his3, leu2, ura3, aaa1-1). Os meios de cultura da levedura foram preparados, tal como foi descrito por Sherman et al. (Methods in Yeast Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) (1986)): YPD continha 1% de extracto de levedura-Bacto, 2% de peptona-Bacto, e 2% de glucose. Meio YNB: succinato, 10,0 g/l; NaOH, 6,0 g/l; $(NH_4)_2SO_4$, 5,0 g/l; base com azoto da levedura (sem amino ácidos e $(NH_4)_2SO_4$), 1,7 g/l; 18 amino ácidos (sem metionina e cisteína), 12,5 mg/l cada; adenina e uracilo, 10 mg/l cada; e glucose 20 g/l.



A levedura foi feita crescer num agitador rotativo a 25°C, 200 rpm em meio NYB a $A_{260} = 0,75$. As proteínas da levedura foram marcadas adicionando (^{35}S)-metionina (-1200 Ci/mmol) a uma cultura de 10 ml de levedura a uma concentração de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ e agitadas durante mais 20 minutos a 25°C. Após adição de gelo para arrefecer a cultura, as células foram isoladas por centrifugação (7.000 x g) a 4°C durante 5 minutos em tubos Corex de 15 ml, lavadas uma vez com água destilada fria, e centrifugadas. Adicionou-se 300 μl de água destilada fria à pílula celular, seguindo-se a adição de pérolas de vidro de 0,45 mm até ao menisco. As células foram submetidas a rotura por redemoinho vigoroso durante 30 segundos (4 vezes) com arrefecimento com gelo em 1 entre cada irrupção de 30 segundos. O produto homogéneo foi removido das pérolas de vidro com uma pipeta de Eppendorf e colocado num tubo de microfugação de 1,5 ml. As pérolas de vidro foram lavadas duas vezes com 100 μl de água destilada, e os produtos de lavagem foram adicionados ao produto homogéneo. Adicionaram-se 40 μl (1/10 vol) de uma solução contendo 0,3% de SDS, 1,0% de β -mercaptoetanol, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A solução foi aquecida no banho de água em ebulição durante 2 minutos sendo então arrefecida em gelo. 50 μl de uma solução contendo 1 mg/ml de DNase I, 500 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A, MgCl_2 50 mM em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 foram adicionados ao lisado, e a solução foi incubada em gelo durante 10 minutos. O lisado foi centrifugado em microfugação durante 8 minutos, e o produto flutuante foi transferido para um tubo fresco e congelado em azoto líquido.

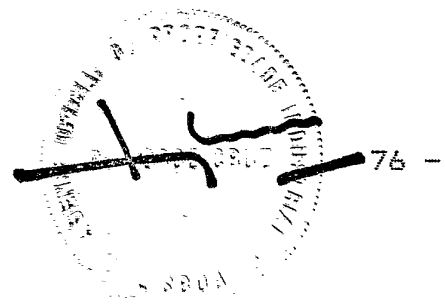
Pares de geles bi-dimensionais foram utilizados para duas preparações de amostras diferentes e analisadas em computador por Protein Databases Inc. (Huntington Station, NY). Os geles foram preparados de acordo com o método de Garrels (Garrels, J.I., J. Biol. Chem. 264:5269-5282 (1989)). Os lisados contendo -400.000 cpm foram carregados em cada gel. A taxa de amfolina



para a focagem isoelectrica (primeira dimensão) foi pH de 4 a 7. A concentração de poliacrilamida do sulfato dodecílico de sódio (segunda dimensão) foi de 12,5%. Os geles foram processados para fluorografia. Foram preparados três grupos de exposições para cada amostra em duas experiências (3-, 6-, 12-dias). As películas foram analisadas com scanner Optronics F-1000 como interface de um computador PDP-11/60. Os dados foram transferidos para uma estação de trabalho PDQuest. As manchas de proteína foram identificadas, quantificadas, e comparadas com o sistema PDQuest, que se baseia no sistema de Garreils and Franza (Garreils et al., J. Biol. Chem. 264: 5283-5298 (1989)).

Os efeitos da deficiência da N^{α} -acetiltransferase sobre a síntese da proteína foram assim examinados por meio de uma comparação do padrão electroforético do gel bi-dimensional das proteínas solúveis do tipo selvagem e das células de levedura mutante aaal. Foram detectadas por análise computadorizada dos geles, 855 manchas discretas de proteína. Sem uma alteração na sua massa molecular, observou-se que 48 proteínas, identificadas nas células do tipo selvagem, tinham valores pI mais elevados nas células de mutante aaal. Esses desvios para pIs mais elevados resultam provavelmente da protonação do grupo $\alpha\text{-NH}_2$ nas proteínas, a que falta um grupo acetilo. Além disso, as células mutantes aaal continham menos 144 proteínas do que as células do tipo selvagem.

Hershko et al. (Hershko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7021-7025 (1984)) revelou que as proteínas N^{α} -acetiladas são degradadas pelo sistema ubiquitin/dependente de ATP menos rapidamente do que as proteínas com um terminus-N livre e sugeriram que a N^{α} -acetilação pode evitar a degradação por este sistema. É possível que as 144 proteínas já não detectadas no mutante aaal tenham sido degradadas por esta via. Contudo, a maior parte



das proteínas "desviadas" não eram mais lábeis. Assim, a N^{α} -acetilação não pode ser o único factor envolvido na prevenção da degradação da proteína.

Apareceram 27 novas proteínas no mutante aaal. A síntese destas proteínas resulta da desrepressão ou activação de genes regulados por proteínas reguladoras, que já não são acetiladas. Foi sugerido ser esta a hipótese para um tipo de genes de reunião específica-a regulador da proteína no mutante aaal (Mullen et al., EMBO J. 8:2067-2075 (1989)).

Além disso, uma comparação entre as proteínas do tipo selvagem e mutante aaal revelou que 71 proteínas do mutante aaal diminuíam em >50% e 34 proteínas aumentavam em >200%. Essa síntese diminuída ou aumentada pode também ser controlada por proteínas reguladoras a que falta N^{α} -acetilação.

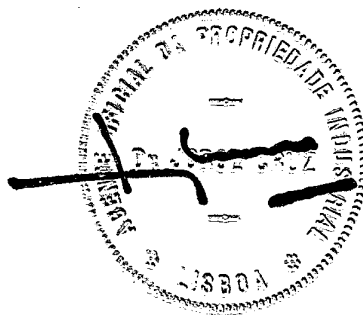
As experiências revelaram que apenas 20% das proteínas solúveis eram ou deslocadas ou desapareciam no mutante aaal (isto é, indicando que provavelmente lhes faltava um grupo N^{α} -acetilo), embora tenha sido sugerido que 50% das proteínas solúveis na levedura são N^{α} -acetiladas (Brown, J.L., Int. Congr. Biochem. Abstr., Vol 11, International Union of Biochemistry, Canada, pp. 90 (1979)). A presença de N^{α} -acetiltransferases adicionais pode contribuir para esta diferença aparente.

A N^{α} -acetilação constitui uma modificação química importante das proteínas eucarióticas, tal como é indicado pelo grande número de proteínas cuja síntese é alterada pela eliminação do gene da N^{α} -acetiltransferase.

Embora o invento tenha sido descrito em relação com suas apresentações específicas, deverá ser tomado em consideração



que são possíveis outras modificações pretendendo este pedido de patente abranger quaisquer variações, utilizações ou adaptações do invento seguindo, em geral, os princípios do invento e incluindo essas derivações da presente apresentação no âmbito da prática conhecida ou habitual da técnica referente ao invento podendo ser aplicadas aos aspectos essenciais aqui anteriormente indicados e como se segue nas reivindicações apensas.



Reivindicações

1ª. - Célula, adequada para ser utilizada na produção de um peptídeo ao qual falta um terminal amino N^α-acetilado, caracterizada por expressar uma N^α-acetiltransferase alterada.

2ª. - Célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por ser uma célula da levedura.

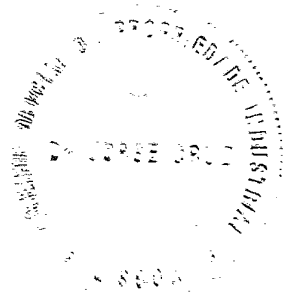
3ª. - Célula da levedura de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por ter uma mutação no gene AAA1.

4ª. - Célula de levedura de acordo com a reivindicação 3, caracterizada por lhe faltar substancialmente actividade de N^α-acetiltransferase.

5ª. - Célula de levedura de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por conter um alelo aaal-1 ou aaal-2 do gene AAA1.

6ª. - Método para a obtenção de uma molécula recombinante, caracterizado por se incluir na referida molécula um gene AAA1 alterado.

7ª. - Método para a produção de um peptídeo ao qual falta um terminal amino N^α-acetilado, caracterizado por compreender a expressão do referido peptídeo numa célula de levedura tendo um gene AAA1, em que o referido gene contém uma mutação resultando numa perda substancial de actividade do produto gene AAA1, e se tornar a referida célula incapaz de catalisar a referida N^α-acetilação do referido peptídeo.

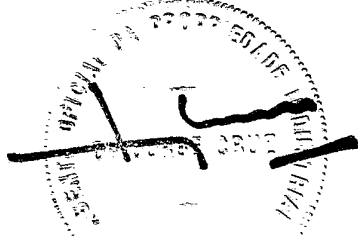


88. - Método para a determinação da sequência de amino-ácidos de um peptídeo ou proteína, caracterizado por compreender:

- a. a expressão do referido peptídeo ou proteína numa célula de levedura tendo um gene AAAI, em que o referido gene contém uma mutação que resulta numa perda substancial de actividade do produto do gene AAAI, e torna a referida célula incapaz de catalisar a N^α-acetilação de peptídeos ou proteínas;
- b. a recuperação do referido peptídeo ou proteína; e
- c. a determinação da sequência de amino-ácidos do referido peptídeo ou proteína.

Lisboa, 25 de Outubro de 1990

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA



5'TTTCCAGGACCCTAACCGAAGT

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 GTG GCT AAT GCC ATC AGA AAA ATT GAA GGC GCT TCA GCA TCA CCA ATC
70 K 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

FIG 1A



1333 GCT GGA 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 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 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 Q L D F
 1747 CAT TCA TAC TGT ATG AGA AAA GGT ACG CCA AGA GCC TAT CTG GAG ATG TTA GAA TGG GGA 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 CGC 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 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 K E A A M N K R K E T E A K

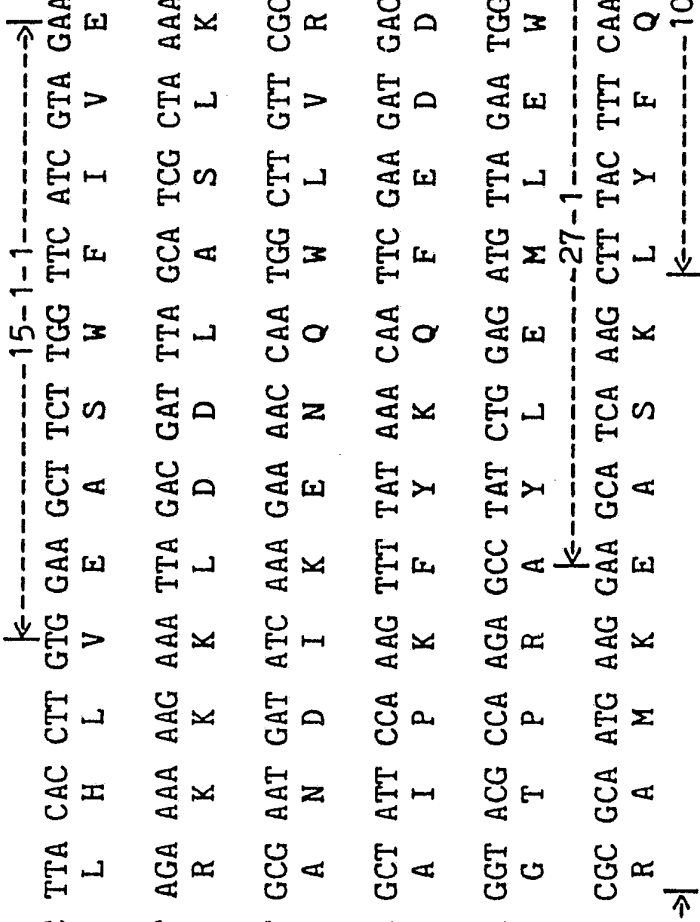
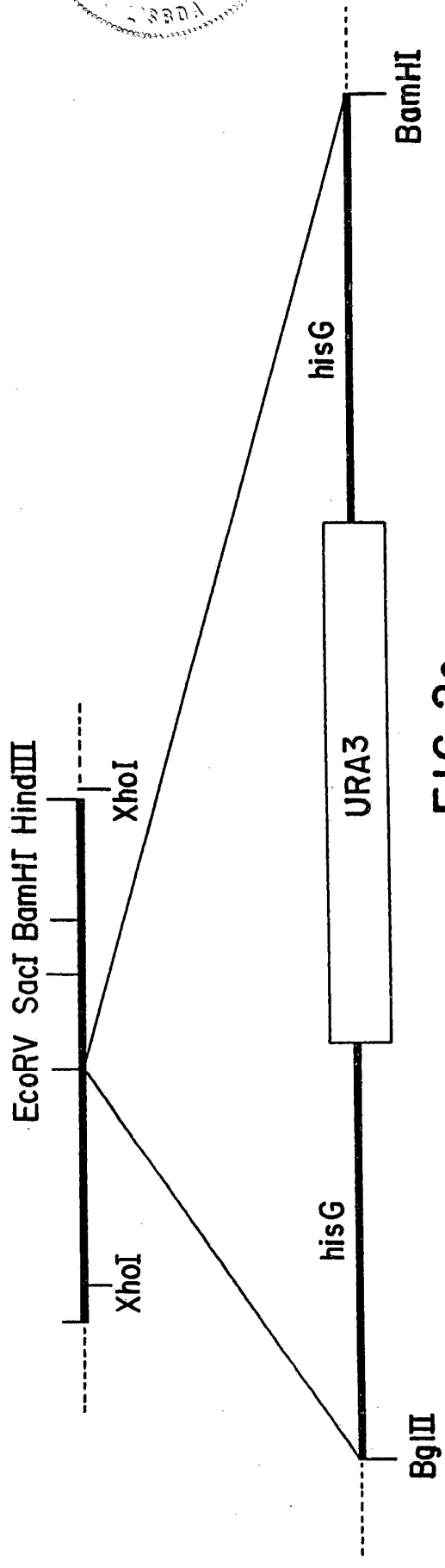
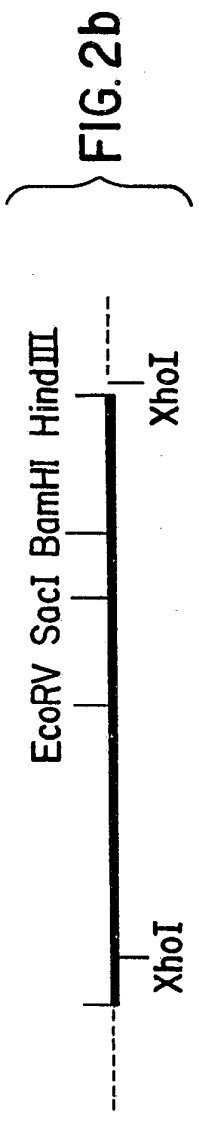
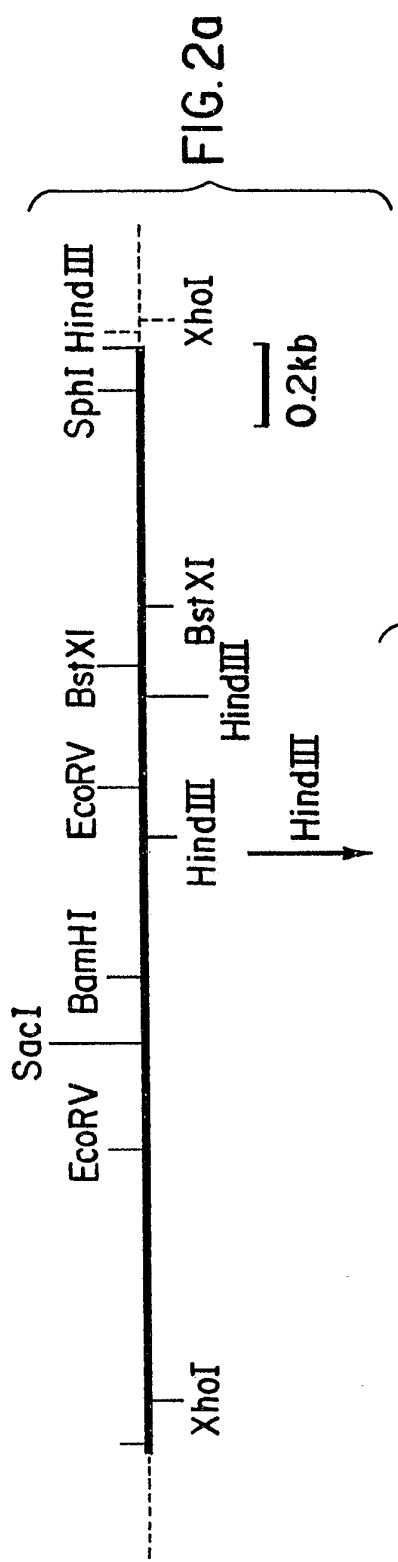
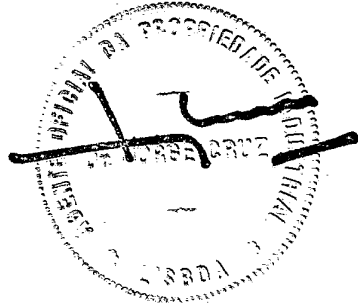
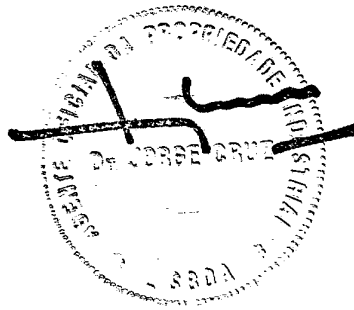


FIG. 1C





6/6

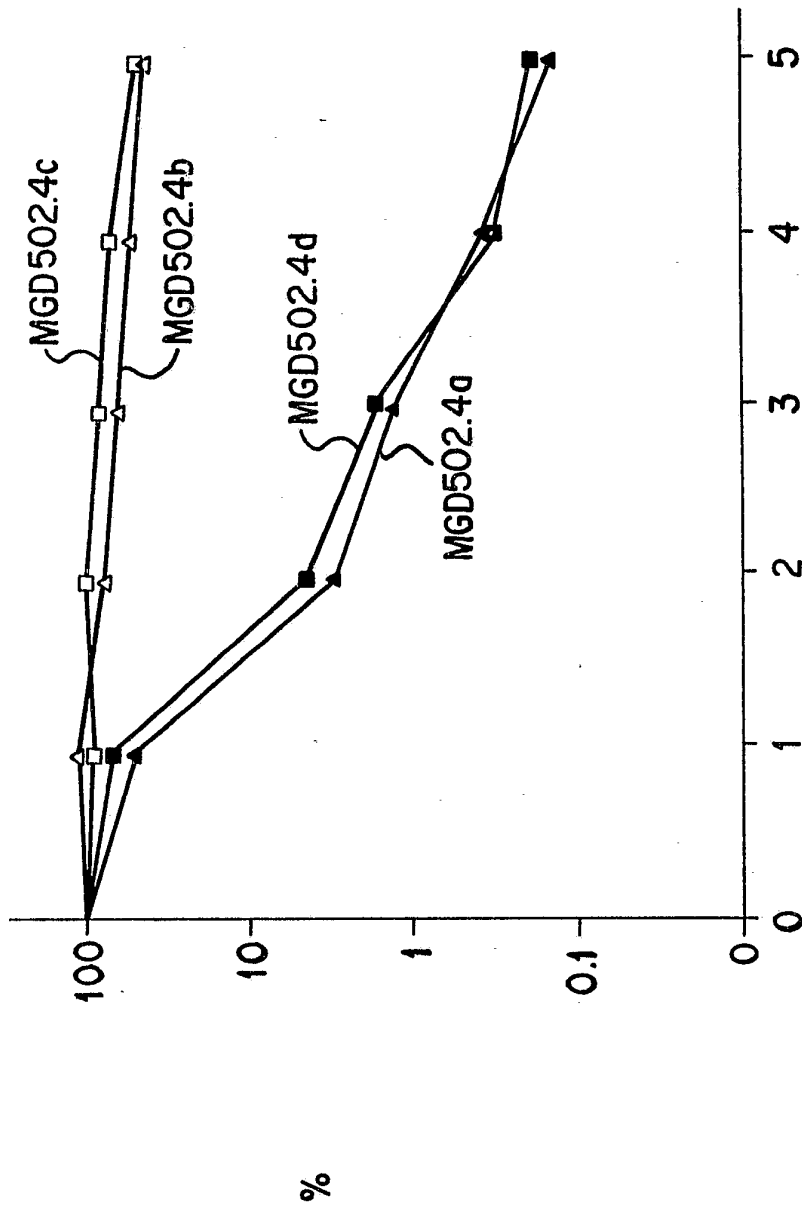


FIG. 3