



MEMORIA DESCRITIVA

Resumo

Este invento é dirigido ao processo para o isolamento, identificação, purificação e caracterizaçãõ de hidrolase de acetil-CoA, a enzima tendo um peso molecular de cerca de 64 000 daltons e uma actividade enzimática superior a 20 em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima ca-

=====

THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION

"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE HIDROLASE DE ACETIL-CoA  
SUBSTANCIALMENTE PURIFICADA"



paz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmole de grupo [ $^3\text{H}$ ]acetilo de [ $^3\text{H}$ ]acetil-coenzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático convencional de acetiltransferases em condições normalizadas.

O processo para a obtenção da referida enzima purificada consiste, essencialmente, em se recolher a enzima não purificada a partir duma amostra, se sujeitar a referida enzima e permuta iónica para obter fracções activas de enzima e se aplicar às referidas fracções cromatografias de adsorção com hidroxapatite.



### Campo do Invento

Este invento é dirigido ao isolamento purificação e caracterização de acetil-CoA-hidrolase e à própria enzima.

### Referência a Pedidos de Patente Relacionados

Este pedido de patente é uma continuação em parte do Pedido de Patente U.S.Nº de série 07/213 943 (entregue em 1 de Julho de 1988).

### FUNDAMENTO DO INVENTO

Apesar do acetil-CoA ser essencialmente oxidado no ciclo de Krebs ou convertido em ácidos gordos ou corpos cetónicos, uma percentagem variável pode ser usada como substrato dadores em modificação co-tradução, pós-tradução ou química: acetilação.

A ligação covalente de um grupo acetilo a substâncias biológicas (e.g., proteína, glucosamina, colina, etc.) (Tsunasawa, S., et al., Methods Enzymol. 106:165-170 (1984); Driessen, H.P.C., et al., CRC Crit. Rev. Biochem 18:281-325 (1985); Klein, U., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:5185-5189 (1978); RosKosKi, R., Jr., J. Biol. Chem 249:2156-2159 (1974)) ou a compostos químicos (e.g., arilamina, arilalquilamina, etc.) (Jencks, W.P, et al., J. Biol. Chem. 247:3756-3760 (1972); Deguchi, T., et al., J. Biol. Chem. 263:7528-7533 (1988)) é uma modificação química vulgar no sistema biológico. A acetilação é mediada por acetiltransferase as quais catalisam a transferência de um grupo acetilo de acetil-coenzima-A para o grupo  $-NH_2$  ou para o grupo  $-OH$  das substâncias biológicas.



A concentração de acetil-CoA em células é regulada pela sua velocidade de síntese e pela sua velocidade de utilização e/ou degradação. O acetil-CoA é primariamente sintetizado a partir do piruvato gerado a partir de açúcares e aminoácidos (Ala, Tre, Gli, Ser e Cis) a partir do acetoacetil-CoA gerado a partir de outros aminoácidos (Fen, Tir, Leu, Lis e Trp) e a partir da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos se bem que uma quantidade mínima seja também sintetizada por acetil-CoA sintetase (frenkel, E.P. et al., J. Biol. Chem. 252:504-507 (1977)).

A utilização de acetil-CoA ocorre durante o ciclo de Krebs ou pela sua conversão em ácidos gordos ou corpos cetónicos. Ainda a acetilação de proteínas e peptídeos catalisada pela acetiltransferase (Tsunasawa, S. et al., Methods Enzymol. 106:165-170 (1984); Driessen, H.P.C. et al., CRC Crit. Rev. Biochem. 18:281-325 (1985); Persson, B. et al., Eur. J. Biochem. 152:523-527 (1985); Augen, J. et al., Trends Biochem. Sci. 11:494-497 (1986); Allfrey, V.G. et al., Methods Enzymol. 107:224-240 (1984); Rudman, D. et al., J. Biol. Chem. 254:10102-10108 (1979)), assim como de outras substâncias biológicas além de proteínas (e.g., glucosamina, colina, arilamina, arilalquilamina) (Klein, U. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5185-5189 (1978); Roskoski, R., Jr., J. Biol. Chem. 249:2156-2159 (1974); Jencks, W.P. et al., J. Biol. Chem. 247:3756-3760 (1972); Weber, W.W. et al., Pharmacol. Rev. 37:25-79 (1985)) corresponde à utilização adicional de acetil-CoA endógeno.



Uma hidrolase de acetil-CoA (EC 3.1.2.1) hidrolisa o acetil-CoA para acetato e CoA. Esta enzima foi primeiro encontrada em coração de porco em 1952 (Gergely, J., et al., J. Biol. Chem. 263:313-319 (1952)) e subsequentemente foi encontrada em muitos tecidos de mamíferos (Knowles, S.E., et al., Biochem. J. 142:401-411; Robinson, J.B., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976); Bernson, V.M.S., Eur. J. Biochem 67:403-410 (1976); Grigat, K.P. et al., Biochem. J. 177:71-79 (1979); Prass, R.L., et al., J. Biol. Chem. 255:5215-5223 (1980); Soling, H.D., et al., Eur. J. Biochem. 147:111-117 (1985)).

No fígado de rato foram encontrados duas isoenzimas de acetil-CoA-hidrolase. Uma está situada no espaço da matriz dos mitocôndrios (Soling, H.D., et al., Eur. J. Biochem. 147:111-117 (1985)) e uma outra no citoplasma (Prass, R.L., et al., J. Biol. Chem. 255:5215-5223 (1980)). Se bem que apenas a enzima citoplasmática do fígado de rato tenha sido purificada até à homogeneidade (Prass, R.L. et al., J. Biol. Chem. 255:5215-5223 (1980)), a enzima da mitocôndria de cérebro de rato também foi parcialmente purificada e caracterizada (Robinson, J.B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:959-965 (1976)).

A acetil-CoA-hidrolase solúvel do citosol encontrada em fígado de rato é sensível ao frio, inibida por 5'ADP, mas activado por 5'ATP (Prass, R.L., et al., J. Biol. Chem. 255:5215-5223 (1980)).



No entanto, a acetil-CoA-hidrolase mitocondrial não é afectada por temperatura baixa ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e estes nucleotídeos (Soling, H.D., et al., Eur. J. Biochem. 147:111-117 (1985)). CoASH é um inibidor forte da enzima sensível ao frio, mas apenas um inibidor fraco da enzima mitocondrial (Soling, H.D., et al., Eur. J. Biochem. 147:111-117 (1985)).

Apesar de haver muitos estudos sobre as propriedades fisicoquímicas da acetil-CoA-hidrolase, sabe-se pouco acerca do seu significado fisiológico. Foi proposto que um papel fisiológico da acetil-CoA-hidrolase possa ser a manutenção da concentração de acetil-CoA citossólico e uma fonte de CoASH para a síntese de ácidos gordos e oxidação (Prass, R.L. et al., J. Biol. Chem. 255:5215-5223 (1980)).

Bernson (Eur. J. Biochem. 67:403-410 (1976)) também sugeriu que a enzima em tecido adiposo castanho de hamster poderá estar envolvida no processo de aquecimento pós-hibernação. Ainda, o grupo de Klein (Namboodiri, M.A.A. et al., J. Biol. Chem. 255:6032-6035 (1980)) encontrou que arilalquilamina-N-acetil transferase na glândula pineal de rato desempenha um papel chave na geração do ritmo circadiano da síntese da melatonina e sugeriu que a acetil-CoA-hidrolase possa estar envolvida na regulação do processo de acetilação. O envolvimento da acetilação de acetil-CoA-hidrolase na regulação do nível endógeno de acetil-CoA e seu funcionamento como dador de grupos acetilo durante a síntese proteica não foi ainda estabelecido.

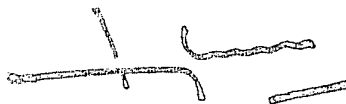


Tem-se encontrado a acetil-CoA-hidrolase como sendo um inibidor importante contaminante da piruvato-carboxilase (Mahan, D.E., et al., Biochem. J. 145:25-35 (1974)) e colina-acetiltransferase (Stverin, S.E., et al., BioKhimia 32:125-131 (1967)).

Foi anteriormente demonstrado um inibidor da acetil-transferase num homogenato bruto de pituitária (Glembotski, C.C., J. Biol. Chem. 257:10501-10509 (1982)) e num lisado bruto de levedura (Travis, G.H., et al., J. Biol. Chem. 259:14406-14412 (1984)).

Suspeita-se que este inibidor seja a acetil-CoA-hidrolase (Dixon, J.E., et al., Methods Enzymol 106:170-179 (1984)). Em adição encontrou-se que a acetil-CoA-hidrolase inibe a piruvato-carboxilase purificada a partir de cérebro de rato (Mahan, D.E., et al., Biochem. J. 145:25-35 (1975)), colina-acetiltransferase (Severin, S.E. et al., BioKhimia 32:125-131 (1967)), e [proteína transportadora de acilo] acetiltransferase (Lowe, P.N. et al., Biochem. J. 250:789-796 (1988)).

Dada a importância do potencial bioquímico da acetil-CoA-hidrolase é de interesse examinar e localização subcelular, especificidade do substrato e regulação da enzima. No sentido de elucidar as implicações biológicas da hidrólise e elucidar o mecanismo enzimático da reacção como um primeiro passo a enzima deve ser isolada e depois purificada e caracterizada.



### SUMÁRIO DO INVENTO

De acordo com este invento, uma acetil-CoA-hidrolase que hidrolisa acetil-CoA para acetato e CoASH foi isolada e purificada até à homogeneidade. O invento relaciona-se portanto com a purificação até à homogeneidade de acetil-CoA-hidrolase e com a própria acetil-CoA-hidrolase purificada.

A acetil-CoA-hidrolase, que hidrolisa acetil-CoA em acetato e CoASH, foi isolada a partir de Saccharomyces cerevisiae e demonstrada por análise de sequência de proteínas como sendo bloqueada no extremo  $\text{NH}_2$ .

A enzima foi purificada 2400 vezes até homogeneidade aparente por passos sempre sucessivos de purificação usando DEAE-Sepharose filtração em gel e hidroxipatite. A  $M_r$  da acetil-CoA-hidrolase activa de levedura foi calculada como sendo  $64000 \pm 5000$  por cromatografia de filtração em gel. A análise por SDS-PAGE revelou que o peso molecular da forma desnaturada é de  $65000 \pm 2000$  juntamente com a  $M_r$  da enzima activa indica que a acetil-CoA-hidrolase de levedura é monomérica. A enzima tem um pH óptimo perto de 8,0 e o seu pI é de  $\sim 5,8$ .

Vários derivados de acil-CoA com um comprimento da cadeia variável foram testados como substratos para a acetil-CoA-hidrolase de levedura. Se bem que a acetil-CoA-hidrolase seja relativamente específica para acetil-CoA, CoAs de cadeia de acilo mais longa foram também hidrolisados e foram capazes de funcionar como inibidores durante a hidrolise de acetil-CoA.



Entre uma serie de catiões divalentes,  $Zn^{2+}$  verificou-se ser o inibidor mais potente. A enzima foi inactivada por modificação quimica com dietil-piromcarbonato um reagente modificador de histidina.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra cromatografia em DEAE-Sephrose (0,05 a 0,5 M KCl) da acetil-CoA-hidrolase de levedura. O conjunto de fracções de acetil-CoA-hidrolase, que também continha  $N^{\alpha}$ - acetiltransferase (Lee, F.J.S., et al., J. Biol. Chem. 263:14948-14955 (1988)) derivado de DEAE-SEpharose (0,2 M KCl) (como descrito abaixo) foi concentrado dialisado e aplicado numa coluna de DEAE-Sephrose, eluido com um ingrediente linear de 0,05M (250 ml) a 0,5M (250 ml) KCl em tampão HDG a 24 ml/h e analisado por  $A_{280}$ , condutividade e actividade enzimática (ensaio de inibição da acetilação), como descrito abaixo. As fracções contendo acetil-CoA-hidrolase foram reunidos conforme indicado pela barra horizontal.

A Figura 2 mostra a cromatografia em Sepharose CL-4B da acetil-CoA hidrolase de levedura. O conjunto de fracções de acetil-CoA da DEAE-Sephrose (0,05 a 0,5 M KCl) foi concentrado e aplicado numa coluna de gel Sepharose CL-4B, eluido com tampão fosfato de potássio 200 mM pH 7,4, contendo 0,5 mM DTT, 10% (p/v) de glicerol, 0,02%  $NaN_3$  a 20 ml/h e analisado por  $A_{280}$  e actividade enzimática (ensaio de inibição da acetilação) como descrito abaixo. As fracções contendo actividade de acetil-CoA-hidrolase foram reunidas conforme indicado pela barra horizontal.



A Figura 3 mostra a análise por cromatografia em hidroxilapatite de acetil-CoA-hidrolase de levedura. O conjunto de fracções de acetil-CoA-hidrolase da cromatografia em Sepharose CL-4B foi concentrado, dialisado e aplicado numa coluna de hidroxilapatite eluido com um gradiente linear de 0,05M (150 ml) a 0,5M (150 ml) de tampão fosfato de potássio, pH 7,4, contendo 0,5 mM DTT, 10% (v,v) glicerol, 0,02%  $\text{NaN}_3$  a 12 ml/h e analisado por  $A_{280}$ , condutividade e actividade enzimática (ensaio de inibição da acetilação), como descrito abaixo. As fracções contendo actividade de acetil-CoA-hidrolase foram reunidas como indicado pela barra horizontal.

A Figura 4 mostra uma determinação do ponto isoeléctrico da acetil-CoA-hidrolase de levedura por focagem isoeléctrica. A focagem isoeléctrica usando uma amostra do conjunto de fracções da hidroxilapatite (Figura 3) foi efectuada como anteriormente descrito (Catsimpoolas, N., Isoelectric Focusing, Academic Press, New York (1976) (gama de pH 3,5-9,5).

Para determinação do pI das subunidades da enzima purificada usaram-se como padrões de pI amiloglucosidase de A. oryzae (pI = 3,55), inibidor da tripsina de soja (pI = 4,55),  $\beta$ -lactoglobulina do leite (pI = 5,13), anidrase carbónica B de eritrócitos bovina (pI = 5,85), anidrase carbónica de eritrócitos humana (pI = 6,57), mioglobina de coração de cavalo (pI = 6,76 e 7,16), desidrogenase láctica L de músculo de coelho (pI = 8,3; 8,4 e 8,5) e tripsinogénio de pâncreas bovino (pI = 9,3). As bandas de proteína foram coradas com Azul Coomassie.



A Figura 5 mostra o efeito da temperatura e pH na acetil-CoA-hidrolase de levedura. (A) A actividade da acetil-CoA-hidrolase de levedura para acetil-CoA foi determinada a temperaturas diferentes pelo ensaio de radioactividade como descrito abaixo. (B) A actividade de acetil-CoA-hidrolase de levedura para acetil-CoA foi determinada em tampões 100 mM de acetato de sódio, citrato-fosfate; potássio fosfate e tampões CHES de diferente pH pelo ensaio radioactivo como descrito abaixo.

A Figura 6 mostra a concentração de acetil-CoA versus velocidade de libertação de acetato para acetil-CoA-hidrolase. (A) representação gráfica directa (B) representação gráfica de Lineweaver-Burk.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Acetil-CoA-hidrolase é uma enzima que hidrolisa acetil-CoA para acetato e coenzima A (CoA). Durante a purificação de N<sup>x</sup>-acetil-transferase de levedura, os inventores detectaram a presença de um inibidor endógeno da acetiltransferase conforme evidenciado pela recuperação de 204% da actividade enzimática observada após a cromatografia em DEAE-Sepharose (Pedido de Patente dos Estados Unidos Nº de Série 153 361, entregue em 8 de Fevereiro, 1988).

A actividade biológica do inibidor foi então caracterizada, resultando na identificação do inibidor como uma acetil-CoA-hidrolase (Lee, F.J.S. et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988), referência que aqui é incluída por referência na sua totalidade). Para elucidar o papel funcional desta enzima no processo de acetilação, esta enzima foi subsequentemente purificada até à homogeneidade por

um novo ensaio e a sua especificidade para o substrato inves  
tigada usando uma série de acil-CoA.

I. Isolamento, Identificação, Purificação e Caracterização  
de Acetil-CoA-Hidrolase

De acordo com este invento, a acetil-CoA-hidrolase pode ser isolada a partir de uma amostra de levedura contendo a enzima. Qualquer amostra de levedura que contenha a enzima poderá ser usada como material de par  
tida de acordo com os métodos descritos neste invento. Con-  
forme aqui é usada a amostra contendo a enzima será referi-  
da simplesmente como "amostra" que pretendê incluir amostra  
de levedura contendo acetil-CoA-hidrolase.

Se bem que outros tenham tentado iso-  
lar esta enzima a partir de uma variedade de fontes incluín-  
do cérebro de rato (Robinson, J.B. et al., Biochem. Biophys.  
Res. Commun. 71: 959-965 (1976)), fígado de rato (Prass, R.L.  
et al., J. Biol. Chem. 255: 5215-5223 (1980); Soling, H.D.  
et al., Eur. J. Biochem. 147: 111-117 (1985) e tecido adipo-  
so castanho de hamster (Bernson, V.M.S., Eur. J. Biochem.  
67: 403-410 (1976), apenas a enzima do citossol do figado  
de rato foi purificado (Prass, R.L., et al., J. Biol. Chem.  
265: 5215-5223 (1980)).

As propriedades desta acetil-CoA-hi-  
drolase de levedura deste invento são muito diferentes da  
previamente purificada por Prass et al., supra, a partir de  
figado de rato.

Homogeneidade e Propriedades Moleculares

Uma acetil-CoA-hidrolase de *S.cerevisiae* foi purificada 2400 vezes a partir de 800 g de células

(Tabela 1) com uma recuperação global de 31%, por processos cromatográficos sucessivos utilizando-se DEAE-Sephrose, Sephrose Cl-4B e hidroxilapatite. A enzima constitui aproximadamente 0,2% da proteína celular total.

TABELA 1

Purificação de Acetil-CoA-hidrolase a partir de S.cerevisae

Passo	Actividade <sup>a</sup> (unidades)	Proteína (mg)	Actividade especifica (unidade/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
1. Extracto bruto	31300 <sup>b</sup>	19500	1,6	1,0	100 <sup>b</sup>
2. DEAE-Se- pharose (0,2 M KCl)	31400 <sup>b</sup>	4250	7,4	4,6	100 <sup>b</sup>
3. DEAE-Se- pharose (0,05- -0,5M KCl)	26300	862	30,5	19,1	84
4. Sepharose CL-4B	16800	304	55,3	34,6	54
5. Hidroxi- lapatite	9600	2,5	3840	2400	31

a A actividade foi medida como descrito abaixo



b Nos dois primeiros passos cromatográficos,  $N^X$ -acetiltransferase e acetil-CoA-hidrolase estavam presentes nas mesmas fracções (Lee, F.J.S. et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988)) e a actividade de acetil-CoA-hidrolase não pode ser determinada. Após o terceiro passo cromatográfico, a  $N^X$ -acetiltransferase e a acetil-CoA-hidrolase foram separadas e a actividade total da  $N^X$ -acetiltransferase foi de 63.300 unidades. No entanto, a actividade  $N^X$ -acetiltransferase determinada nos dois primeiros passos foi de apenas 32.000 unidades. Se se assumir que a verdadeira actividade da  $N^X$ -acetiltransferase nos dois primeiros passos cromatográficos foi de facto 63.300 unidades e que toda a inibição da acetiltransferase foi provocada pela acetil-CoA-hidrolase, então a actividade de acetil-CoA-hidrolase pode ser calculada como sendo 31.300 unidades em cada um dos dois primeiros passos cromatográficos.

O peso molecular da acetil-CoA-hidrolase foi determinado por electroforese em gel. Uma pequena quantidade de amostra foi analisada usando um gel de 9% de acordo com o método de Laemmli (Laemmli, U.K., Nature 227: 680-689 (1970)) e comparado com padrões de peso molecular: miosina (205000),  $\beta$ -galactosidase de E. coli (116000), fosforilase de musculo de coelho (97000), albumina do soro bovino (66000) e albumina de ovo (45000). SDS-PAGE revelou uma única banda corada com azul Coomassie com uma  $M_r=65.000 \pm 2000$ .

O peso molecular da acetil-CoA-hidrolase nativa de levedura foi calculado por filtração em gel. Uma pequena quantidade da enzima purificada a partir da cromatografia em hidroxilapatite foi aplicada numa coluna de Sepharose Cl-4B (2,5 x 96 cm).



O tampão de eluição foi tampão HDG contendo 0,2M KCl e o caudal foi de 20 ml/h como descrito abaixo. O volume de eluição da acetil-CoA-hidrolase foi determinado pelo ensaio de inibição da acetilação e o peso molecular aparente foi calculado a partir dos volumes de eluição relativos dos padrões de proteína incluindo (1) troglobulina (669000), (2) apoferritina (443000), (3)  $\beta$ -amilase (200000), (4) álcool-dehidrogenase (150000), (5) albumina de soro bovina (66000) e (6) amidrase carbónica (29000).

A cromatografia de filtração em gel em Sepharose Cl-4B mostrou que a  $M_r$  da acetil CoA-hidrolase nativa é de  $64000 \pm 5000$ . Estes resultados indicam que a acetil-CoA-hidrolase de levedura é monomérica.

A focagem isoeléctrica revelou uma única banda proteica com pI aparente = 5,8 (Figura 4). Os ensaios para a determinação da temperatura óptima para acetil-CoA-hidrolase de levedura foram efectuados entre 5 e 65°C (Figura 5A).

A dependência do pH de acetil-CoA-hidrolase de levedura foi medida testando a valores de pH de 4 a 10 na presença de tampões 100 mM de acetato de sódio, citrato fosfato, fosfato de potássio, e tampões CHES (Figura 5B). A actividade enzimática máxima foi observada a pH 8 mas é reduzida para < 20%, abaixo de pH 5,0 e < 10% acima de pH 10.

Os ensaios para a determinação da temperatura óptima para acetil-CoA-hidrolase de levedura foram efectuados entre 5 e 65°C (Figura 5A), e a acetil-CoA-hidrolase de levedura apresentou uma actividade máxima a temperaturas entre 37 e 42°C.



A desnaturação irreversível ocorreu após 1 minuto a 65°C. A enzima é mais estável quando guardada a 4°C em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4. Nessas condições a enzima purificada tinha uma semi-vida de aproximadamente 2 semanas. A enzima é menos sensível ao congelamento em todas as fases de purificação e apresenta apenas uma perda de actividade <10% por cada ciclo de congelamento-descongelamento.

Na Figura 6a está apresentado um gráfico da concentração de substrato versus velocidade da reação para a acetil-CoA-hidrolase testado com o ensaio da radioactividade. A curva tem a forma hiperbólica regular que representa um enzima que obedece à cinética normal de Michaelis-Menten. A Figura 6b é uma representação gráfica da Lineweaver-Burk dando o Km aparente para acetil-CoA como sendo 62 µM. Ainda a hidrólise de [1-<sup>14</sup>C] acetil-CoA por acetil-CoA-hidrolase é inibida em <30% a concentrações de CoASH de >25 uM.

Conforme aqui é usado o termo "substancialmente puro" ou "substancialmente purificado" pretende descrever a acetil-CoA-hidrolase não tendo praticamente qualquer composto normalmente associado com a enzima no seu estado natural, i.e., sem componentes proteicos ou açúcares.

O termo pretende ainda descrever acetil-CoA-hidrolase homogénea por uma ou mais características de pureza ou homogeneidade usadas normalmente. Por exemplo, uma acetil-CoA-hidrolase substancialmente pura apresentará características constantes e reprodutíveis dentro dos desvios padrões experimentais para parâmetros tais como: peso molecular, técnicas cromatográficas e outros parâmetros do mesmo tipo.



O termo, no entanto, não pretende excluir misturas artificiais ou sintéticas das enzimas com outros compostos. O termo também não pretende excluir a presença de pequenas impurezas que não interferem com a actividade biológica da enzima e que podem estar presentes, por exemplo, devido a purificação incompleta.

#### Análise de aminoácidos

Amostras de acetil-CoA-hidrolase de levedura electroeluidas foram sujeitas a análise de aminoácidos e a composição em aminoácidos da enzima está apresentada na Tabela 2. A composição em aminoácidos é característica de uma proteína globular.

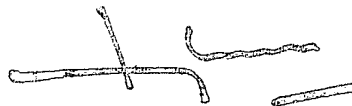


Tabela 2

Composição em Aminoácidos de Acetil-CoA-hidrolase de *S. cerevisiae*<sup>a</sup>

Aminoácido	Resíduos Observados <sup>b</sup>
Asx	75
Thr	24
Ser	33
Glx	53
Pro	51
Gli	34
Ala	49
Val	44
Met	4
Ile	35
Leu	51
Tir	15
Fen	37
Lis	29
His	17
Arg	28

a A acetiltransferase purificada foi electroeluida a partir do gel preparativo de SDS-PAGE. A composição em aminoácidos foi determinada a partir de seis preparações diferentes de enzima usando um Analisador de Aminoácidos Beckman 6300 após 24 h de hidrólise a 110°C em 6N HCl contendo 0,1% de fenol. Asx = Asp + Asn; Glx = Glu + Gln.



- b O número de resíduos por subunidade de enzima foi calculado com base numa  $M_r = 64000$ . Não foram feitas correções para as quantidades de Ser e Tre destruídas durante as 24 h de hidrólise. Cis e Trp não foram determinados.

### Análise da Sequência de Aminoácidos

Duas preparações diferentes da proteína electroeluída (cada 300 pmoles) foram submetidas a análise de sequência de proteínas. Excepto para os níveis de fundo de aminoácidos no primeiro ciclo, não se detectou qualquer sequência proteica. Estes resultados demonstram que o extremo N da proteína está bloqueado.

No entanto, a informação da sequência foi em seguida obtida por clivagem da enzima com trpsina e depois separação dos fragmentos numa coluna fenil-RP HPLC. Dois dos fragmentos foram sequenciados. A informação da sequência destes dois fragmentos ao acaso foi a seguinte:

Fragmento # 689:

	2		4		6		8		10
Fen	- Asn	- Leu	- Fen	- Val	- Gli	- Ala	- Ser	- Ala	- Gli
	12		14						
- Pro	- Glu	- Asn	-(Arg).						

Fragmento # 690:

	2		4		6		8		10
Val	- Val	- Ala	- Ile	- Val	- Glu	- Ser	- Tre	- Met	- Arg -Leu.



Conforme descrito abaixo, a informação da sequência obtida a partir dos fragmentos ao acaso pode ser usada para sintetizar sondas oligonucleotídicas que podem ser usadas em engenharia genética de enzimas.

#### Efeitos de nucleotídeos e catiões divalentes na actividade enzimática

Determinou-se os efeitos de vários nucleotídeos e catiões divalentes na actividade enzimática (Tabela 3). Com nucleotídeos na concentração 0,1 mM apenas o NADH decresce apreciavelmente a actividade enzimática e o efeito é dependente da concentração. Uma inibição dependente da concentração ocorre na presença de cada um dos catiões divalentes:

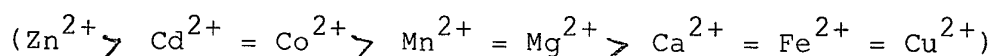




Tabela 3

Efeito de Nucleotídeos e Iões na Actividade Enzimática de Acetil-CoA-hidrolase de S. cerevisiae<sup>a</sup>

ADIÇÕES	Actividade Enzimática (%)		
	CONCENTRAÇÃO (mM)		
	10	1	0.1
None	100	100	100
$\beta$ NADH	46	69	83
$\beta$ NAD	95	98	100
$\beta$ NADPH	96	98	99
AMP	81	89	96
ADP	91	94	98
ATP	96	99	101
ZnSO <sub>4</sub>	25	88	--
CdCl <sub>2</sub>	48	91	--
CoCl <sub>2</sub>	51	86	--
MnCl <sub>2</sub>	64	84	--
MgCl <sub>2</sub>	72	95	--
MgSO <sub>4</sub>	75	98	--
CaCl <sub>2</sub>	84	97	--
FeSO <sub>4</sub>	88	98	--
CuSO <sub>4</sub>	89	94	--

a A acetil-CoA-hidrolase de levedura foi incubada na presença de vários nucleotídeos e catiões divalentes em fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4. A actividade enzimática foi determinada em condições convencionais do ensaio de radioactividade usando ACTH (1-24) (N=3) conforme descrito nos Exemplos.



### Efeito de Modificações Químicas na Actividade Enzimática

Para determinar o possível papel catalítico para tipos diferentes de resíduos de aminoácidos na enzima, efectuaram-se várias modificações químicas (Tabela 4). A reacção de acetil-CoA-hidrolase com dietil-piromecarbonato, num reagente de modificação da histidina (Miles, E.W., Methods Enzymol. 47: 431-442 (1977), provoca uma quase total inactivação da enzima. Após incubação durante 8 h à temperatura ambiente com 0,25 M hidroxilamina, um reagente capaz de reverter a etoxiformulação de um resíduo de histidina, ~ 55% da actividade enzimática original foi recuperada, no entanto exposição prolongada à hidroxilamina inactivou lentamente a enzima.

A presença de um resíduo triptofano cataliticamente importante foi investigada por modificação química com NBS (Spande, T.F. et al., Methods Enzymol. 11: 506-522 (1967)) e HNBS  $(CH_3)_2Br$  (Horton, H.R. et al., Methods Enzymol. 25: 468-482 (1972)). NBS inactiva a enzima em 70% a 0,5 mM e inactiva completamente a enzima a 5 mM.

No entanto, HNBS  $(CH_3)_2Br$  inactiva parcialmente a enzima, a perda de actividade enzimática é pequena em comparação com NBS. Uma vez que NBS também pode modificar resíduos histidina e tirosina (Witkop, B. Adv. Protein Chem., 16:221-321 (1963)), é possível que a inactivação possa ser devida a uma modificação química da(s) mesma(s) histidina(s), presumivelmente modificado por dietil-piromecarbonato.

Os agentes redutores de sulfidrilo (i.e., 2-mercaptoetanol e DTT) não afectam a actividade enzimática.



Os reagentes modificadores de sulfidrilo (i.e., NEM, ácido iodoacético, iodoacetamida e pCMB) não têm efeito a 1 mM, mas inativam parcialmente a enzima a 10 mM. Anidrido succínico e TNBS, que modificam os resíduos lisina e grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (Riordan, J.F. et al., Methods Enzymol. 25: 500-506 (1972); Fields, R., Methods Enzymol. 25:464-468 (1972), não têm qualquer efeito a 1mM, mas observa-se inativação parcial da enzima com cada um dos reagentes a 10 mM.

N-acetilimidazole, um reagente modificador da tirosina, também inativa apenas na concentração mais elevada (Riordan, J.F. et al., Methods Enzymol. 25:500-506 (1972)).

Tabela 4

Efeito de Reagentes de Modificação de Proteínas na  
Actividade Enzimática de Acetil-CoA-Hidrolase  
S. cerevisiae<sup>a</sup>

Reagente adicionado	<sup>b</sup> CONCENTRAÇÃO (mM)	ACTIVIDADE ENZIMÁTICA (%)
nenhum		100
DEPC	0,5	19
	5,0	3
NBS	0,5	30
	5,0	2
HNBS(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Br	1,0	84
	10,0	71
2-mercaptoetanol	10,0	101
DTT	10,0	104
NEM	1,0	94
	10,0	52
IAA	1,0	99
	10,0	89
IAM	1,0	97
	10,0	85
pCMB	1,0	102
	10,0	88
TNBS	1,0	94
	10,0	77
Anidrido succinico	1,0	95
	10,0	79
N-acetilimidazole	1,0	101
	10,0	67

a Acetil-CoA-hidrolase de levedura foi incubada com cada um dos reagentes a 25°C durante 15 min., dialisada contra tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4, a 4°C durante 3 a 4 h. A actividade enzimática foi determinada em condições de ensaio radioactivo convencionais usando acetil-



-CoA (1-24) (N=3), testada como descrito nos Exemplos.

- b Abreviaturas: DEPC, dietil-pirocarbonato; NBS, N-Bromo-succinimida; ANBS  $(CH_3)_2$ -Br, Brometo de dimetil-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)-sulfônio; NEM, N-etilmaleimida; IAA, ácido iodoacético; IAM, iodoacetamida; pCMB, p-cloromercuribenzoato; TNBS, ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico.

#### Especificidade do substrato

Vários derivados de acetil-CoA- de tamanho de cadeia variável foram testados como substratos para a acetil-CoA-hidrolase de levedura. Cada uma das acetil-CoA na Tabela 5 foram comparados com acetil-CoA.

As actividades enzimáticas foram determinadas a concentrações de substrato de 0,25 mM. Considerados em conjunto, estes resultados indicam que CoAs de cadeia acilo mais longa também são substratos para a hidrólise pela acetil-CoA-hidrolase, se bem que a enzima seja relativamente específica para acetil-CoA. Ainda, cada acil-CoA é capaz de funcionar como inibidor de acetil-CoA-hidrolase, no entanto acetil-CoA inibe mais eficazmente (Tabela 6).



Tabela 5

Inibição da Actividade Enzimática de Acetil-CoA-  
-Hidrolase de S. cerevisiae<sup>a</sup> por Acil-CoA

Substratos	Actividade Relativa (%)
Acetil-CoA	100
Malonil-CoA	1
Propionil-CoA	9
Butiril-CoA	4
Acetoacetil-CoA	5
Succinil-CoA	8
Miristoil-CoA	3

a A actividade enzimática foi determinada usando o ensaio colorimétrico (N=3) descrito nos Exemplos.

Tabela 6

Inibição da Actividade Enzimática de Acetil-CoA-  
-Hidrolase de S. cerevisiae<sup>a</sup> por Acil-CoA

Adições		Actividade Enzimática(%)		
		<u>Concentração (mM)</u>		
		5	1	0,1
Nenhuma	100	100	100	100
Acetil-CoA	5	28	66	
Miristoil-CoA	52	83	93	
Succinil-CoA	56	79	92	
Butiril-CoA	62	86	95	
Propionil-CoA	72	89	92	
Acetoacetyl-CoA	90	92	98	
Malonil-CoA	52	83	93	

- a A acetil-CoA-hidrolase de levedura foi incubada na presença de vários Acil-CoA em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. A actividade enzimática foi determinada nas condições do ensaio de radioactividade usando acetil-CoA- (N=3), como descrito nos Exemplos.

Acetil-CoA-hidrolase, que hidroliza acetil-CoA para acetato e CoASH, foi assim isolado a partir de Saccharomyces cerevisiae. Durante uma purificação prévia de N $\alpha$ -acetiltransferase de levedura, a presença de um inibidor endógeno da acetiltransferase foi demonstrado pela recuperação de 204% da actividade de N $\alpha$ -acetiltransferase após o terceiro passo cromatográfico usando um ensaio em que um grupo acetilo marcado é transferido de [ $^3\text{H}$ ] acetil-CoA para um peptídeo sintético, ACTH (1-24) (Lee, F.Y.S. et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988)).

Inicialmente, não era claro se a inibição era devido a: (i) um inibidor proteico específico da N $\alpha$ -acetiltransferase; (ii) uma acilpeptídeo-hidrolase (Tsunasawa, S. et al., J. Biochem. 77:89-102 (1975); Kobayashi, K. et al., J. Biochem. 262: 11435-11445 (1987)); (iii) uma tiolase (Kornblatt, J.A. et al., J. Biol. Chem. 246: 4417-4423 (1971); Clinkenbeard, K.D. et al., J. Biol. Chem. 248: 2275-2284 (1973)); (iv) uma proteína transportadora de acetil-CoA (possivelmente uma outra acetiltransferase); ou (v) uma acetil-CoA-hidrolase.

Após uma série de experiências que eliminaram o primeiro dos quatro mecanismos de inibição (resultados não apresentados), determinou-se que a inibição resultava da depleção do substrato por uma acetil-CoA-hidrolase. Também se demonstrou que tal enzima inibe a piruvato-carboxilase de cérebro de rato (Mahan, D.E. et al., Biochem. J. 145: 25-39 (1975)), colina-acetiltransferase de cérebro de coelho (Severin, S.E. et al., Biokhimiya 32: 125-131 (1967) e uma [proteína transportadora de acilo] acetiltransferase de E.coli (Lowe, P.N. et al., Biochem. J. 250:789-796 (1988)), assim como provavelmente inibe N $\alpha$ -acetiltransferase de um homogenato bruto de pituitária bovina (Glembotski,

C.C., J. Biol. Chem. 257: 10501-10509 (1982)) e pituitária de rato (Dixon, J.E. et al., Methods Enzymol. 106: 170-179 (1984)) e N<sup>o</sup>-acetiltransferase de um lisado bruto de levedura (Travis, G.H. et al., J. Biol. Chem. 259: 14406-14412 (1984)).

Acetil-CoA-hidrolase foi primeiro identificada em coração de porco em 1952 (Gergaly, J. et al., J. Biol. Chem. 198: 323-339 (1952)) e subsequentemente a enzima foi encontrada em tecidos de mamíferos (Knowles, S.E. et al., Biochem. J. 142: 401-411 (1974); Robinson, J. B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 959-965 (1976); Berson, V.S.M. Eur. J. Biochem. 67: 403-410 (1976); Grigat, K.P. et al., Biochem. J. 177: 71-79 (1979); Prass, R. L. et al., J. Biol. Chem. 265: 5215-5223 (1980); Soling, H.D. et al., Eur. J. Biochem. 147: 111-117 (1985)).

Apesar de outros autores terem tentado isolar acetil-CoA-hidrolase a partir de uma variedade de fontes incluindo: cérebro de rato (Robinson, J.B. et al., Biochem, Biophys. Res. Commun. 71: 959-965 (1976)), tecido adiposo castanho de hamster de hamster (Berson, V.S.M. Eur J. Biochem. 67: 403-410 (1976)) e fígado de rato (Prass, R. L. et al., J. Biol. Chem. 255: 5215-5223 (1980); Soling, H. D. et al., Eur. J. Biochem. 147: 111-117 (1985)), apenas a enzima citossólica de fígado de rato (Prass, R.L. et al., J. Biol. Chem. 255: 5215-5223 (1980)) foi purificada até agora.

Purificámos acetil-CoA-hidrolase de levedura 2400 vezes com uma recuperação global de 31% por processos cromatográficos sucessivos utilizando DEAE-Sephrose, Sephrose Cl-4B e hidroxipatite (Tabela 1). A  $M_r$  da acetil-CoA-hidrolase nativa de levedura foi calculada como



sendo  $64000 \pm 5000$  por cromatografia de filtração em gel e SDS-PAGE revelou que o seu peso molecular aparente é de  $65000 \pm 2000$ . Portanto, a acetil-CoA-hidrolase nativa de levedura é monomérica.

Se bem que este valor de  $M_r$  para a enzima nativa de leveduras difira do previamente determinado para a enzima citossólica de fígado de rato por Prass et al., (J. Biol. Chem. **255**: 5215-5223 (1980)), que determinaram-na como sendo entre 240000 e 340000, a sua subunidade calculada como tendo  $M_r$  de 64000 é idêntica à da enzima de levedura.

Ao contrário, a  $M_r$  da enzima nativa de cérebro de rato (Robinson, J.B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **71**: 959-965 (1976)) ou da enzima nativa de mitocôndrios de fígado de rato (Soling, H.D. et al., Eur. J. Biochem. **147**: 111-117 (1985)) é de 150000 e 157000 respectivamente. Ainda o pH ótimo para acetil-CoA-hidrolase de levedura e de mitocôndria de cérebro de rato são idênticos (pH 8) (Robinson, J.B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. **71**: 959-965 (1976)). Ainda, a enzima de levedura está bloqueada na terminação  $NH_2$ , no entanto a natureza química deste grupo bloqueador não foi ainda determinada.

No fígado de rato foram identificadas duas acetil-CoA-hidrolases diferentes. Uma situada no citoplasma, é sensível ao frio, é fortemente inibida por CoASH, é inibida por ADP e GDP e é activada por ATP (Prass, R.L. et al., J. Biol. Chem. **255**: 5215-5223 (1980); Soling, H.D. et al., Eur. J. Biochem. **147**: 111-117 (1985)). A outra está situada no espaço da matriz da mitocôndria, não é afectada pelo frio, é apenas fracamente inibida por CoASH, não é inibida por ADP ou GDP, não é activada por ATP e é inibida por NADH (Bernson, V.S.M. Eur. J. Biochem. **67**: 403-410 (1976); Soling, H.D. et al., Eur. J. Biochem. **147**: 111-117 (1985)).

A acetil-CoA-hidrolase de levedura é semelhante a esta última uma vez que não é sensível ao frio, é apenas fracamente inibida por CoASH, não é afectada por ADP ou ATP e é inibida por  $\beta$ -NADH (Tabela 3). Em adição, o Km da acetil-CoA-hidrolase de levedura é semelhante ao da enzima mitocondrial da gordura castanha de hamster (Bernson, V.S.M., Eur. J. Biochem. 67: 403-410 (1976) ( $62 \mu\text{M}$  e  $51 \mu\text{M}$ , respectivamente).

Estudos usando DEPC (e possivelmente NB5) sugerem que um residuo de histidina possa estar situado dentro do sítio activo da acetil-CoA-hidrolase de levedura, mas o facto de  $\beta$ -mercaptoetanol, DTT, NEM, pCMB, IAA e IAM não inactivarem a enzima indica que um residuo cisteína não estará provavelmente envolvido no seu mecanismo catalítico (Tabela 4).

Apesar da acetil-CoA-hidrolase ser relativamente específica para acetil-CoA, substratos CoA de cadeia acilo mais longa são também hidrolizados (Tabela 5). O papel funcional de tal especificidade alargada contra vários acil-CoAs não está actualmente compreendido.

Ainda não está completada uma comparação detalhada entre as especificidades de substratos da enzima de levedura, da acetil-CoA-hidrolase não específica isolada a partir da mitocôndria de músculo cardíaco de porco (Lee, K.Y. et al., J. Biol. Chem., 254: 4516-4523 (1979)) e a hidrólise do acetil-CoA de cadeia curta das mitocôndrias do tecido adiposo castanho (Alexson, S.E.H. et al., J. Biol. Chem. 263: 13564-13571 (1988)). Ainda, cada acetil-CoA inibe a acetil-CoA-hidrolase de levedura, se bem que acetil-CoA iniba mais eficazmente (Tabela 6).



O acetil-CoA é principalmente sintetizado a partir do piruvato gerado a partir de açúcares e aminoácidos (ala, Tre, Gli, Ser e Cis), a partir de acetoacetil-CoA gerado a partir de outros aminoácidos (Fen, Tir, Leu, Lis e Trp) e a partir da  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos, se bem que uma quantidade mínima seja também sintetizado por acetil-CoA-sintetase (Frenkel, E.P. et al., J. Biol. Chem. 252: 504-507 (1977)). Se bem que o acetil-CoA seja principalmente oxidado no ciclo de Krebs ou convertido em ácidos gordos ou corpos catónicos, uma percentagem variável pode ser usada como substrato dador de acetil-transferases em modificações co- e pós-tradução envolvendo grupos  $\alpha$ - e  $\beta$ -NH<sub>2</sub>, assim como grupos hidroxilo nas cadeias laterais serilo e treonilo de proteínas e peptídeos.

A acetilação  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> de proteínas é a modificação co- e pós-tradução mais comum de proteínas solúveis intracelulares e nalgumas células cerca de 80% das suas proteínas são N $\alpha$ -acetiladas (Brown, J. L. et al., J. Biol. Chem. 251: 1009-1014 (1976); Brown, J.L., J. Biol. Chem. 254: 1447-1449 (1979)) por N $\alpha$ -acetiltransferases usando acetil-CoA. Se bem que a presença de tais N $\alpha$ -acetiltransferases tenha sido largamente demonstrada em células procarióticas e eucarióticas, apenas recentemente foi purificada e caracterizada a primeira enzima eucariótica (Lee, F. J. S. et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988) e um cDNA codificador foi agora clonado e sequenciado (Lee, F. J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (submetido)).

Existem também numerosos exemplos de ligação covalente de um grupo acetilo a outras substâncias biológicas além de proteínas (e.G. glucosamina, colina, arilamina, arilalquilamina) (Klein, U. et al., Proc. Natl. Acad. USA 75: 5185-5189 (1978); Roskoski, R., J. Biol. Chem. 249:



2156-2159 (1974); Jencks, W. P. et al., J. Biol. Chem. 247: 3756-3760 (1972); Weber, W.W. et al., Pharmacol. Rev. 37: 25-79 (1985)).

A concentração de acetil-CoA nas células é basicamente regulada pela sua velocidade de síntese e de utilização nas várias vias metabólicas e o papel da acetil-CoA-hidrolase na regulação do acetil-CoA permanece pouco clara. No entanto, foram propostas várias funções para acetil-CoA-hidrolase..

Primeiro, a enzima poderá estar envolvida na manutenção da concentração de acetil-CoA citossólico e do nível de CoASH para a síntese e oxidação de ácidos gordos (Prass, R.L. et al., J. Biol. Chem. 255: 5215-5223 (1980)). Segundo, a enzima mitocondrial poderá estar envolvida no metabolismo da gordura castanha em animais que hibernam (Bernson, V.S.M., Eur. J. Biochem. 67: 403-410 (1976)).

Terceiro, a enzima poderá estar envolvida na regulação da acetilação durante a síntese da melatonina na glândula pineal (Namboodiri, M.A.A. et al., J. Biol. Chem. 255: 6032-6035 (1980)). Ainda em nenhum caso foi estabelecida firmemente uma função biológica específica para esta enzima.

## II. Engenharia genética de acetil-CoA-hidrolase

Este invento compreende ainda as sequências de aminoácidos da acetil-CoA-hidrolase, as sequências genéticas codificadoras da enzima, veículos contendo a sequência genética, hospedeiros transformados com elas, produção da enzima pela expressão no hospedeiro transformado e utilização da enzima na acetilação de peptídeos ou proteínas.



A sequência de DNA codificadora de acetil-CoA-hidrolase pode ser obtida de uma variedade de fontes. Por exemplo, mRNA de acetil-CoA-hidrolase pode ser isolado a partir de levedura ou a partir de outras fontes de enzima, usando o método de transferências Northern (Alwine et al., Method Enzymol. 68: 220-242 (1979)) e sondas de oligonucleotídeos marcados.

O mRNA pode então ser convertido em cDNA por técnicas conhecidas dos familiarizados com a matéria. As sondas podem ser sintetizadas com base na sequência de aminoácidos conhecidos da acetil-CoA-hidrolase como descrito atrás.

Como alternativa, podem ser usadas sondas de DNA degenerativas para fazer o despiste de uma biblioteca de DNA de uma espécie que produza acetil-CoA-hidrolase isolando assim um clone que contém a sequência de DNA codificadora da enzima. A biblioteca de DNA foi criada por fragmentação do DNA genómico, usando uma ou mais endonucleases de restrição, seguido de incorporação em vectores e sua utilização para transformar células hospedeiras, as quais são então semeadas e feito o despiste.

A sonda de DNA pode ser marcada com um grupo detectável. Tal grupo detectável pode ser qualquer material tendo uma propriedade física ou química detectável. Tais materiais têm sido bastante desenvolvidos no campo dos imunoensaios e em geral quase qualquer marca útil em tais métodos pode ser aplicada no presente invento,

São particularmente úteis grupos enzimaticamente activos, tais como enzimas (ver Clin. Chem. 22: 1243 (1976)), substratos de enzimas (ver Esp. Pat. Britânica 1 548 741), coenzimas (ver Pat. U.S. Nos. 4 230 797 e



4 238 565) e inibidores de enzimas (ver Pat. U.S. Nº 4 134 792); substâncias fluorescentes (ver Clin. Chem. 25: 353 (1979)); cromóforos; substâncias luminescentes tais como quimioluminescentes e bioluminescentes (ver Clin. Chem. 25: 512 (1979)); ligandos de ligação específica; pares de interação próxima; e radioisótopos tais como  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$  e  $^{14}\text{C}$ .

Tais marcas e pares de marcação não detectados com base nas suas próprias características físicas (e.g. substâncias fluorescentes, cromóforos e radioisótopos) ou nas suas propriedades reactivas ou de ligação (e.g. enzimas, substratos, coenzimas e inibidores).

Por exemplo, uma sonda marcada com um cofactor pode ser detectada pela adição da enzima para a qual a marca é um cofactor e um substrato para a enzima. Por exemplo, pode-se usar uma enzima que actue sobre um substrato de modo a gerar um produto com uma propriedade física mensurável. Exemplos desta última incluem, sem que lhes estejam limitados, beta-galactosidase, fosfatase alcalina e peroxidase.

Uma sequência de DNA codificadora de acetil-CoA-hidrolase pode ser recombinada com DNA vector de acordo com técnicas convencionais, incluindo extremos cerses ou coesivos para ligação, digestão com enzimas de restrição para dar extremos adequados, preenchimento dos extremos coesivos conforme adequado, tratamento com fosfatase alcalina para evitar ligações indesejáveis e ligação com ligases adequadas.



Para expressar acetil-CoA-hidrolase são necessários sinais de transcrição e tradução reconhecidos por um elemento adequado do hospedeiro. Hospedeiros eucarióticos podem ser células de mamífero capazes de serem cultivadas in vitro, particularmente leucócitos, mais particularmente células de mieloma ou outros linfócitos transformados ou oncogénicos, e.g. células transformadas por EBV. Como alternativa, podem ser empregues células sem serem de mamífero, como sejam bactérias, fungos, e.g. leveduras, fungos filamentosos ou similares.

São possíveis hospedeiros para a produção de acetil-CoA-hidrolase células de mamífero, cultivadas in vitro em cultura de tecidos ou in vivo em animais. As células de mamíferos podem proporcionar modificações pós-tradução às moléculas de acetil-CoA-hidrolase incluindo enrolamento correcto ou glicosilação dos sítios certos.

As células de mamífero que podem ser úteis como hospedeiros incluem células de origem fibroblástica, tais como VERO ou CKOK1 ou células de origem linfóide, tais como as do hibridoma SP2/O-AG14 ou a de mieloma P3x63Sgh e seus derivados. Geralmente a construção de acetil-CoA-hidrolase será parte de um vector tendo um sistema de replicação reconhecido pela célula hospedeira.

Numa execução uma célula procariótica é transformada por um plasmídeo portador de um gene codificador da acetil-CoA-hidrolase. Hospedeiros bacterianos de interesse particular incluem E.coli K 12 estirpe 294 (ATC 31446), E. coli X1776 (ATCC 31537), E. coli W3110 ( $F^-$ ,  $\lambda$ - $bda^-$ , fototrópico (ATCC 27325)) e outras enterobactérias tais como Salmonella typhimurium ou Serratia marcescens e várias espécies de Pseudomonas.



Em tais condições a acetil-CoA-hidrolase acetiltransferase não será glicosilada. O hospedeiro procariótico deverá ser compatível com as sequências de replicação e de controle no plasmídeo de expressão.

Em geral, tais vectores contendo replicação e sequências de controle derivadas de espécies compatíveis com uma célula hospedeira, são usadas em ligação com o hospedeiro. O vector é normalmente portador de um sítio de replicação, assim como de genes específicos que são capazes de proporcionar selecção fenotípica em células transformadas.

A expressão do DNA codificador de acetil-CoA-hidrolase pode também ser colocada sob o controle de outras sequências reguladoras que podem ser homólogas para o organismo no seu estado não transformado. Por exemplo, DNA cromossómico de E. coli dependente de lactose compreende um operão lactose ou lac que medeia a utilização de lactose através da elaboração da enzima  $\beta$ -galactosidase. Os elementos de controle lac podem ser obtidos a partir do bacteriólogo lambda plac5, que infeccioso para E. coli. O sistema promotor-operador lac pode ser induzido por IPTG.

Também podem ser empregues outros sistemas promotor/operador ou porções deles. Por exemplo, podem ser usados colicina E1, galactose, fosfatase alcalina, triptofano, xilose, tax e similares.

Para um hospedeiro mamífero existem vários sistemas vectores possíveis para expressão. Uma classe de vectores utiliza elementos de DNA que proporcionam plasmídeos extracromossómicos de replicação autónoma, derivados de virus animais tais como virus do papiloma bovino, virus polioma, adenovirus ou virus SV40.



Uma segunda classe de vectores baseia-se na integração das sequências dos genes pretendidos no cromossoma do hospedeiro. As células que têm estavelmente integrado o DNA introduzido nos seus cromossomas podem ser seleccionados através da introdução de uma mais marcas que permitem a selecção das células hospedeiras contendo o vector de expressão. A marca pode proporcionar prototrofia a um hospedeiro auxotrófico, resistência a biocidas, e.g. antibióticos ou metais pesados, tais como cobre ou similares.

O gene marcador seleccionável pode ser directamente ligado às sequências de DNA a serem expressas ou introduzido na mesma célula por cotransformação. Podem ser também necessários elementos adicionais para a síntese óptima de mRNA. Estes elementos podem incluir sinais de "splincing", assim como promotores, potenciadores e sinais de terminação de transcrição. Os vectores de expressão de cDNA tendo tais elementos incluem os descritos por Okayama, H., Mol. Cel. Biol. 3: 280 (1983), e outros.

Pode ser empregue uma grande variedade de sequências reguladoras da transcrição e da tradução dependendo da natureza do hospedeiro. Os sinais de terminação da transcrição e da tradução podem ser derivados de fontes virais, tais como adenovírus, virus do papiloma bovino, virus símio ou similares, sempre que os sinais reguladores estejam associados a um gene particular que tenha um nível de expressão elevado.

Como alternativa, podem ser empregues promotores de produtos de expressão de mamíferos, tais como actina, colagénio, miosina, etc. Podem também ser seleccionados sinais de inciação da transcrição que permitam repressão ou activação de modo a poder ser modulada a expressão dos genes.



São de interesse sinais reguladores que sejam sensíveis à temperatura de modo a que variando a temperatura, a expressão possa ser reprimida ou iniciada ou que estejam sujeitos a regulação química, e.g. metabolito.

Uma vez o vector ou a sequência de DNA contendo as construções tenham sido preparada para expressão, as construções de DNA podem ser introduzidas num hospedeiro adequado. Podem ser empregues várias técnicas tais como fusão de protoplastos, precipitação com fosfato de cálcio, electroporação ou outras técnicas convencionais. Depois da fusão as células são cultivadas em meio e testadas quanto às actividades adequadas. A expressão do(s) gene(s) resulta na produção do acetil-CoA-hidrolase.

As células hospedeiras para a produção de acetil-CoA-hidrolase podem ser células imortalizadas principalmente células de mieloma ou de linfoma. Estas células podem ser cultivadas num meio nutritivo adequado em frascos de cultura ou injectadas num hospedeiro sinergístico, e.g. ratinho ou rato ou num hospedeiro imunodeficiente ou num sitio imunodeficiente do hospedeiro, e.g. murganho labro ou bolsa de hamster.

A acetil-CoA-hidrolase do invento pode ser isolada e purificada de acordo com condições convencionais, tais como extracção, precipitação, cromatografia de afinidade, electroforese ou similares.

### III. Utilizações de acetil-CoA-hidrolase

#### Utilizações farmacêuticas



A acetil-CoA-hidrolase uma vez produzida e purificada pode ser usada, por exemplo, no fabrico farmacêutico para inibir acetilação celular. Por exemplo, a enzima inibirá a acetilação de plaquetas aumentando assim o tempo de coagulação.

#### Expressão da Acetil-CoA-hidrolase em plantas

Ainda, a acetil-CoA-hidrolase pode ser introduzida numa planta por técnicas de engenharia genética e quando produzida na célula vegetal poderá ser usada como meio de bloquear a acetilação de herbicidas. É portanto possível produzir uma planta que seja mais tolerante a herbicidas. Numa outra execução deste invento, o gene da acetil-CoA-hidrolase é usado para transformar uma planta para aumentar a tolerância da planta a herbicidas.

A região codificadora de um gene da acetil-CoA-hidrolase que pode ser usado neste invento pode ser homóloga ou heteróloga para a célula vegetal ou planta a ser transformada. É, no entanto, necessário que a sequência genética codificadora da acetil-CoA-hidrolase seja expressa e produzida como uma proteína ou polipeptídeo funcional na célula vegetal resultante. Assim, o invento compreende plantas contendo genes da acetil-CoA-hidrolase homólogos ou heterólogos dos genes da acetil-CoA-hidrolase que expressam a enzima.

Numa execução deste invento, a acetil-CoA-hidrolase compreende uma acetil-CoA-hidrolase vegetal que é homóloga para a planta a ser transformada. Numa outra execução deste invento, a acetil-CoA-hidrolase compreende uma enzima que é heteróloga para a planta a ser transformada.



Ainda, neste invento pode ser usado DNA genómico e cDNA codificador de um gene da acetil-CoA-hidrolase. Um gene da acetil-CoA-hidrolase pode ser construído parcialmente a partir de um clone de cDNA e parcialmente a partir de um clone genómico. Em adição, o DNA codificador do gene da acetil-CoA-hidrolase pode compreender partes de várias espécies.

Existe uma variedade de execuções incluídas no âmbito largo do invento. Numa das suas execuções este invento compreende sequências genéticas quiméricas:

(a) uma primeira sequência genética codificadora de uma acetil-CoA-hidrolase que quando da expressão do gene numa dada célula vegetal é funcional para acetil-CoA-hidrolase;

(b) uma ou mais sequências genéticas adicionais operacionalmente ligadas de ambos os lados da região codificadora da acetil-CoA-hidrolase. Estas sequências genéticas adicionais contêm sequências para promotores ou terminadores. As sequências reguladoras vegetais podem ser heterólogas ou homólogas para a célula hospedeira.

Numa execução preferida o promotor do gene da acetil-CoA-hidrolase é usado para expressar a sequência genética quimérica. Outros promotores que podem ser usados na sequência genética incluem promotores nos, ocs, e CaMV. Um promotor vegetal eficaz que pode ser usado é um promotor vegetal de superprodução. Este promotor numa ligação operacional com a sequência genética da acetil-CoA-hidrolase deverá ser capaz de promover a expressão da referida acetil-CoA-hidrolase de modo que a planta transformada tem maior tolerância a um herbicida.



Promotores vegetais de superprodução que podem ser usados neste invento incluem o promotor da subunidade pequena (ss) da ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase de soja (Berry-Lowe et al., J. Molecular and App. Gen., 1: 483-498 (1982) e o promotor da proteína de ligação a/b.

Sabe-se que estes dois promotores são induzidos pela luz em células vegetais eucarióticas (ver, por exemplo, Genetic Engineering of Plants, an Agricultural Perspective, A. Cashmore; Plenum, New York, 1983, páginas 29-38; Corruzi, G. et al., J. Biol. Chem. 258: 1399 (1983); e Dunsmuir, P. et al., J. of Mol. and Applied Genet., 2: 285 (1983)).

Ainda, numa outra execução preferida, dá-se a expressão da sequência genética quimérica compreendendo o gene da acetil-CoA-hidrolase operacionalmente ligado na grelha de leitura correcta a um promotor vegetal e com um sinal de secreção do gene.

A sequência genética quimérica compreendendo um gene da acetil-CoA-hidrolase operacionalmente ligada a um promotor vegetal e na execução preferida com as sequências sinal de secreção, podem ser ligadas num vector de clonagem adequado. Em geral são usados vectores plasmídeo ou virais (bacteriófago) contendo sequências de replicação e de controle derivados de espécies compatíveis com a célula hospedeira usada.

O vector de clonagem, tipicamente, será portador de uma origem de replicação, assim como de genes específicos capazes de proporcionar marcas de selecção fenotípica em células hospedeiras transformadas, tipicamente resistência a antibióticos. Os vectores para transformação podem ser seleccionados através destas marcas fenotípicas após transformação numa célula hospedeira.



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

O vector de clonagem e a célula hospedeira transformada com o vector são usados neste invento tipicamente para aumentar o numero de cópias do vector. Com um número de cópias aumentado, os vectores contendo o gene da acetil-CoA-hidrolase podem ser isolados e, por exemplo, usados para introduzir as sequências genéticas nas células vegetais.

O material genético contido no vector pode ser microinjectado directamente em células vegetais usando micropipetas para transferir mecanicamente o DNA recombinante. O material genético pode também ser transferido para a célula vegetal usando polietilenoglicol que forma um complexo de precipitação com o material genético que é internalizado pela célula (paszkowski et al., EMBO J. 3: 2717-22 (1984)).

Numa execução alternativa deste invento o gene da acetil-CoA-hidrolase pode ser introduzido nas células vegetais por electroporação (Fromm et al., "Expression of Genes Transferred into Monocot and Dicot Plant Cells by Electroporation" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: (1985)).

Nesta técnica, os protoplastos vegetais são electroporados na presença de plasmídeos contendo a construção genética da acetil-CoA-hidrolase. Os impulsos eléctricos de alta força de campo permeabilizam reversivelmente biomembranas, permitindo a introdução dos plasmídeos.



Os protoplastos vegetais electroporados refazem a parede celular, dividem-se e formam calos vegetais. A selecção das células vegetais transformadas com a acetil-CoA-hidrolase expressa pode ser conseguida usando as marcas fenotipicas como descrito atrás.

Um outro método para introduzir o gene da acetil-CoA-hidrolase nas células vegetais é infectar uma célula vegetal com Agrobacterium tumefaciens transformado com o gene de acetil-CoA-hidrolase. Nas condições adequadas conhecidas, as células vegetais transformadas são cultivadas para formar rebentos, raízes e desenvolver posteriormente plantas. As sequências genéticas da acetil-CoA-hidrolase podem ser introduzidas nas células vegetais adequadas, por exemplo, por meio de plasmideo Ti de Agrobacterium tumefaciens.

O plasmideo Ti é transmitido a células vegetais quando da infecção por Agrobacterium tumefaciens e é estavelmente integrado no genoma vegetal. Horsch et al., "Inheritance of Functional Foreign Genes in Plants" Science 233: 496-498 (1984); Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 (1983)).

Os plasmideos Ti contêm duas regiões essenciais para a produção de células transformadas. Uma destas, designada DNA de transferência (TDNA), induz a formação de tumores. A outra, designada região virulenta, é essencial para a formação mas não para a manutenção de tumores.



A região de DNA de transferência que transfere para o genoma vegetal, pode ser aumentada de tamanho pela inserção da sequência genética da enzima sem que a sua capacidade de transferência seja afectada. Através da remoção dos genes causadores de tumores de modo a que eles deixem de interferir, o plasmideo Ti modificado pode então ser usado como vector para a transferência das construções de genes do invento numa célula vegetal adequada.

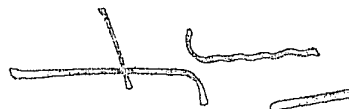
Todas as células vegetais que podem ser transformadas por Agrobacterium e plantas completas regeneradas a partir das células transformadas podem também ser transformadas de acordo com o invento de modo a produzir plantas completas transformadas que contêm o gene da acetil-CoA-hidrolase transferido.

Existe presentemente duas maneiras diferentes de transformar células vegetais com Agrobacterium:

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

O método (1) requiere um sistema de cultura estabelecido que permite a cultura de protoplastos e a regeneração de plantas a partir dos protoplastos em cultura:

O método (2) requiere (a) que as células ou tecidos vegetais possam ser transformados por Agrobacterium e (b) que as células ou tecidos transformados possam ser induzidos para regenerarem plantas completas.



No sistema binário para se ter infecção são necessários dois plasmídeos: um plasmídeo contendo T-DNA e um plasmídeo vir.

Após transformação das células vegetais ou planta as células vegetais ou plantas transformadas pelo plasmídeo Ti de tal modo que a enzima é expressa, podem ser seleccionadas por uma marca fenotípica adequada. Estas marcas fenotípicas incluem, mas não estão limitadas a resistência a antibióticos. São conhecidas outras marcas fenotípicas que podem ser usadas neste invento.

Todas as plantas a partir das quais podem ser isolados protoplastos e cultivados para dar plantas completas regeneradas podem ser transformadas pelo presente invento de modo que são recuperadas plantas completas que contêm o gene da acetil-CoA-hidrolase transferido.

Algumas plantas adequadas incluem, por exemplo, espécies dos géneros Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manicot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapsis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersion, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hemero callis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum, e Datura.

Existe cada vez maior evidência que praticamente todas as plantas podem ser regeneradas a partir de células ou tecidos em cultura, incluindo mas não estando limitado às principais espécies de cereais, cana sacarina, beterraba sacarina, algodoeira, árvores de fruto e outras, legumes e vegetais.

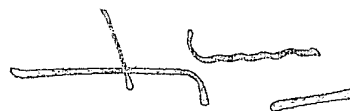


Neste momento é mal conhecido se todas estas plantas podem ser transformadas por Agrobacterium. As espécies que são um hospedeiro natural para Agrobacterium podem ser transformáveis in vitro. As plantas monocotiledónias e em particular os cereais e forragens, não são hospedeiros naturais de Agrobacterium.

Até recentemente as tentativas para os transformar com Agrobacterium mostraram-se infrutíferas. Houykas-Van Slogteren et al., Nature 311: 763-764 (1984). Existe cada vez mais evidência de que certas monocotiledónias podem ser transformadas por Agrobacterium. Usando novas abordagens experimentais agora disponíveis podem ser transformáveis espécies de cereais e de forragens.

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 de plantas a partir de protoplastos em cultura está descrita em Evans et al., "Protoplast Isolation and Culture" em Handbook of Plant Cell Culture 1: 124-176 (MacMillan Publishing Co., New York, 1983); M.R. Davey, "Recent Developments in the Culture and Regeneration of Plant Protoplasts", Protoplasts, 1983 - Lecture Proceedings, pág. 19-24 (Birkhauser, Basel, 1983); P.J. Dale, "Protoplast Culture and Plant Regeneration of Cereals and Other Recalcitrant Crops" em Protoplasts 1983 - Lecture Proceedings, pág. 31-41 (Birkhauser, Basel, 1983); e H. Binding "Regeneration of Plants" em Plant Protoplasts, pág. 21-37 (CRC Press, Boca Raton, 1985).



A regeneração varia de espécie para espécie vegetal mas geralmente obtém-se primeiro uma suspensão de protoplastos transformados contendo múltiplas cópias do gene da acetil-CoA-hidrolase. A formação de embriões pode então ser reduzida a partir de suspensões de protoplastos até à fase de maturação e germinação como embriões naturais. Os meios de cultura geralmente contêm vários aminoácidos e hormonas, como sejam auxinas e citocininas.

É também vantajoso adicionar ácido glutâmico e prolina ao meio, especialmente para espécies tais como milho e alfafa. Os rebentos e raízes normalmente desenvolvem-se simultaneamente. A regeneração eficaz dependerá do meio, do genótipo e da história da cultura. Se estas três variáveis forem controladas então a regeneração é totalmente reprodutível e repetível.

As plantas maduras, desenvolvidas a partir de células vegetais transformadas são autocruzadas para produzir uma planta "consaguinea". A planta "consaguinea" produz sementes contendo o gene para a acetil-CoA-hidrolase aumentada. Estas sementes podem ser cultivadas para produzir plantas que têm acetil-CoA-hidrolase aumentada que bloqueará a acetilação de herbicidas.

As plantas "consaguineas" deste invento podem ser usadas para desenvolver híbridos tolerantes a herbicidas. Neste método, uma linha "consaguinea" tolerante a herbicidas é cruzada com uma outra linha "consaguinea" para produzir o híbrido.

Partes obtidas a partir da planta regenerada, tais como flores, sementes, folhas, ramos, frutos e similares estão cobertos pelo invento desde que estas partes compreendam as células tolerantes a herbicidas.



No âmbito deste invento também estão incluídos progénio, variantes e mutantes das plantas regeneradas.

Nas plantas diplóides, tipicamente um progenitor pode ser transformado pela sequência genética da acetil-CoA-hidrolase acetiltransferase e o outro progenitor é o tipo selvagem. Após cruzamento dos progenitores, os híbridos da primeira geração (F1) apresentarão uma distribuição de 1/2 acetil-CoA-hidrolase/tipo selvagem: 1/2 acetil-CoA-hidrolase/tipo selvagem.

Estes híbridos da primeira geração (F1) são auto-cruzados para produzir híbridos da segunda geração (F2). A distribuição genética dos híbridos F2 são 1/4 acetil-CoA-hidrolase/acetil-CoA-hidrolase; 1/2 acetil-CoA-hidrolase/tipo selvagem; 1/4 tipo selvagem/tipo selvagem. Os híbridos F2 com a constituição genética de acetil-CoA-hidrolase/acetil-CoA-hidrolase são escolhidos como as plantas tolerantes a herbicidas.

Conforme aqui é usado, variante descreve alterações fenotípicas que são estáveis e hereditárias, incluindo variação hereditária que é transmitida sexualmente à prole das plantas, desde que a variante ainda compreenda uma planta tolerante a herbicidas, através de uma taxa de acetilação aumentada.

Também como aqui é usado, mutante descreve variação como resultado das condições ambientais, tais como radiação, ou como resultado de variação genética em que uma característica é transmitida meioticamente de acordo com as leis da hereditariedade bem estabelecidas.



A planta mutante, no entanto, deve ainda apresentar uma tolerância a herbicidas através da inibição da acetilação de herbicidas de acordo com o invento.

### EXEMPLOS

#### Materiais e Métodos

##### Materiais

Foram aqui usadas as seguintes abreviaturas: Tampão A, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM  $MgCl_2$ , 3 mM DTT, 1 M sorbitol, acetil-CoA-, acetil coenzima A; Tampão B, 10 mM HEPES, pH 7,4, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl e 0,5 mM DTT; CHES, ácido 2-(N-ciclo-hexilamino)etanossulfônico; CoASH, coenzima A; DEPC; dietilpirocarbonato; Tampão HDG, 20 mM HEPES, pH 7,4, 0,5 mM DTT, 10% (v/v) glicerol e 0,02%  $NaN_3$ ; HEPES, ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanossulfônico; HNBS $(CH_3)_2$ -Br, brometo de dimetil-(2-hidroxi-5-nitrobenzil)sulfônico; IAA, ácido iodo-acético; IAA, iodoacetamida; NBS, N-bromo-succinimida, NEM, N-etilmaleimida; pCMB, p-cloro-mercuribenzoato; SDS-PAGE, electroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-policrilamida; TNBS ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico.

NEM, IAA, IAM, HNBS $(CH_3)_2$ -Br, TNBS, N-acetilimidazole, pCMB, NBS, DEPC, acetoacetil-CoA, butiril-CoA, malonil-CoA, propionil-CoA, miristoil-CoA, HEPES, CAPS, CHES, DTT, hidroxilamina, albumina do soro bovina, padrões de proteínas para determinações da  $M_r$ , 2-mercaptoetanol, glucose, sorbitol, liticase, Bit-Tris, Tris e glicerol (grau de pureza de enzimas) foram da Sigma.



DEAE-Sepharose CL-6B, Sepharose CL-4B e cloranfenicol-acetiltransferase foram da Pharmacia. Reagente para ensaio de proteína (método Bradford), hidroxilapatite (Biogel HT), gel Alfi-Gel Blue e reagentes para eletroforese em SDS-PAGE foram da BioRad. [ $^3\text{H}$ ] acetil-coenzima A foi da Amersham e acetil-coenzima A não marcado foi da P-L Biochemicals. Os reagentes e solventes para análise de aminoácidos e es líquidos de cintilação Ready-Solv EP foram adquiridos à Beckman. A membrana SP foi da Cuno Inc. A membrana PM-30 foi da Amicon. O extracto de levedura e Bacto-peptona foram da Difco. HCl (6 N) e Polybrene foram do Pierce.

O fenol foi da BRL. O microdialisador foi da Health Products. Os reagentes e solventes para a análise da sequência de proteínas foram da Applied Biosystems. Os reagentes para a síntese de peptídeos foram adquiridos à Applied Biosystems e os solventes para a síntese de peptídeos foram da Anachem. Os Boc-aminoácidos foram adquiridos à Peninsula. Todos os outros produtos químicos foram de grau de pureza reagente ou melhores.

## Métodos

### Geral

As medições em UV foram obtidas usando um espectrofotometro Hewlett-Packard 8450A UV. Os ensaios de proteína foram efectuados pelo método de Bradford (Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)) usando albumina do soro bovina como padrão. As amostras radioactivas foram contadas num contador de cintilação Beckman LS 3801.



## Ensaaios para a actividade de acetil-CoA-hidrolase

### A. Ensaio de inibição da acetilação

O principio deste ensaio é que a acetil-CoA-hidrolase hidrolizará acetil-CoA e portanto diminuirá a quantidade de acetil-CoA do qual um grupo acetilo marcado pode ser transferido pela  $N\alpha$ -acetiltransferase para ACTH (1-24).

O ensaio de inibição de acetilação usa um ensaio previamente descrito para a  $N\alpha$ -acetiltransferase (Lee, F.J.S., et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988)) e é efectuada como se segue: pequenas quantidades de soluções de acetil-CoA-hidrolase (2 - 20  $\mu$ l) foram adicionadas a tubos Eppendorf de 1,5 ml contendo uma mistura de reacção de 50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM HCl, 1 mM DTT, 50  $\mu$ M ACTH (1-24) e  $N\alpha$ -acetiltransferase de levedura parcialmente purificada do passo de cromatografia em hidroxilapatite (Lee, F.J.S. et al., J. Biol. Chem., 263: 14948-14955 (1988)) (10 unidades) num volume final de 100  $\mu$ l.

A reacção foi iniciada pela adição de 25  $\mu$ M [ $^3\text{H}$ ] acetil-CoA (0,5  $\mu$ Ci). A mistura de ensaio foi incubada a 30°C durante 30 minutos. Parou-se a reacção pela adição de 17  $\mu$ l de ácido acético a 0,5 M e arrefecendo num banho de gelo. As misturas de reacção paradas foram filtradas através de discos de membrana SP de 2,5 cm de diâmetro. As membranas foram lavadas três vezes com 1 ml de ácido acético 0,5 M para remover [ $^3\text{H}$ ] acetil-CoA livre. As membranas parcialmente secas foram colocadas em 10 ml de liquido de cintilação Ready-Solv EP e contadas durante 1 min.



O número de unidades de acetil-CoA é calculado como se segue:

$$\frac{\text{cpm}_{\text{ACT}} - \text{cpm}_{\text{ACT} + \text{ACH}}}{\text{cpm}_{\text{ACT}} - \text{cpm}_{\text{BKD}} / 10 \text{ (unidades)}}$$

onde  $\text{cpm}_{\text{ACT}}$  é o numero de contagens quando 10 unidades de N $\alpha$ -acetiltransferase sózinho está presente;  $\text{cpm}_{\text{ACT} + \text{ACH}}$  é o numero de contagens quando 10 unidades de N $\alpha$ -acetiltrans ferase assim como uma quantidade desconhecida de acetil-CoA-hidrolase estão presentes; e  $\text{cpm}_{\text{BKD}}$  é o numero de contagens de fundo. O cálculo do número de unidades de acetil-CoA-hi drolase é efectuado quando o valor de  $\text{cpm}_{\text{ACT} + \text{ACH}}$  é igual a aproximadamente 50% do valor de  $\text{cpm}_{\text{ACT}}$ .

Uma unidade de actividade de acetil-CoA-hidrolase é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir a actividade de uma unidade de N $\alpha$ -acetiltransfe rase. Uma unidade de actividade N $\alpha$ -acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmol do grupo [ $^3\text{H}$ ] acetilo de [ $^3\text{H}$ ] acetil-CoA para ACTH (1-24) (Lee, F.J.S. et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988)).

#### (B) Ensaio de radioactividade

O principio do ensaio é que o acetato livre, mas não o acetil-CoA, evaporará da solução de ácido a uma temperatura elevada.



Pequenas quantidades da solução enzimática (1 - 10  $\mu$ l) foram adicionadas a tubos Eppendorf de 0,5 ml contendo uma mistura de reacção de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4 e 0,25 mM  $[1-^{14}\text{C}]$  acetil-CoA (0,5 Ci/mol) num volume final de 100  $\mu$ l. A mistura de ensaio foi incubada a 30°C durante 0,30 s, 1 min, 2 min., 3 min., 4 min., e 5 min. A reacção foi parada pela adição de 20  $\mu$ l de ácido acético 10 mM.

A amostra foi evaporada por corrente de  $\text{N}_2$  a 30°C até secagem numa hote, dissolvida em 100  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$  e transferida para um frasco de cintilação contendo 10 ml de liquido de cintilação Ready-Solv EP. O tubo da amostra foi levado duas vezes com 100  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}$ , cada lavagem foi transferida para um frasco de cintilação e a radioactividade determinada por contagem de cintilação durante 1 min.

A radioactividade no controlo sem adição de acetil-CoA-hidrolase foi subtraída da radioactividade determinada em cada ponto de tempo. Uma unidade de actividade é definida como a quantidade de enzima que hidroliza 1 nmol de  $[1-^{14}\text{C}]$  acetil-CoA em 1 minuto.

#### (C) Ensaio colorimétrico

Na experiência da especificidade do substrato, a actividade enzimática foi medida seguindo um aumento na  $A_{412}$  ( $\Sigma = 13,600 \text{ M}^{-1}$ ) quando CoASH livre gerada durante a desacilação de acetil-CoA reage com 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitro-benzóico) (DNTB), conforme previamente descrito (Robinson, J.B. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 959-965 (1976); Bernson, V.S.M. Eur. J. Biochemistry 67: 403-410 (1976)).



Cada solução do ensaio continha: Tris/HCl, pH 7,6, 100 mM; DTNB, 0,04 mM; acetil-CoA, 0,25 mM e uma pequena quantidade de solução de acetil-CoA-hidrolase foi adicionada num volume final de 1 ml. A reacção foi iniciada pela adição da amostra de uma solução de acetil-CoA-hidrolase, a mistura de reacção foi incubada a 30°C e a  $\Delta A_{412}$  foi medida a 0,30 s, 1 min., 2 min., 3 min., 4 min., e 5 min. usando um espectrofotómetro com arranjo de diodo Hewlett-Packard 8450A.

#### Crescimento das células e armazenamento

Uma estirpe de levedura de padeiro (TD 71.8) foi cultivada em condições aeróbicas a 30°C em meio YVD (1% de extracto de levedura, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) num fermentador Chemap AG (Chemap AG, Volketswil, Switzerland). Colheram-se as células quando a cultura atingiu uma  $DO_{660\text{ nm}}$  de 14, concentraram-se para 38 litros pelo sistema de separação Alfa-Laval (Alfa-Laval Separation AB, Tumba, Sweden) e guardou-se a -20°C com 10% (v/v) de glicerol durante até 4 meses sem perda de actividade.

#### Extracção das células

A cultura de leveduras concentrada (6 litros) foi descongelada e as células de levedura foram colhidas por centrifugação a 4000 rpm durante 10 min. rotor (JS - 4,0 Beckman). As células (800 g, peso molhado) foram ressuspensas em 1 litro de tampão A (50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM  $MgCl_2$ , 3 mM DTT, 1 M sorbitol) contendo 80 mg de liticase e a suspensão de células foi agitada suavemente a 30°C durante 45 min.



Todos os passos subsequentes foram efectuados a 4°C. Colheram-se os esferoplastos por centrifugação a 4000 rpm durante 10 min. (rotor JS-40, Beckman), lavaram-se por ressuspensão suave em 500 ml de tampão A, colheram-se por centrifugação e ressuspenderam-se suavemente em 400 ml de tampão B (10 mM HEPES, pH 7,4, 1,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl e 0,5 mM DTT).

Os esferoplastos foram lisados neste tampão hipotónico por 15 movimentos com um pistão muito justo e 15 movimentos com um pistão mais solto num homogenizador Dounce e depois HCl frio (2,0 M) foi adicionado para dar uma concentração final de HCl de 0,2 M. O homogenato foi suavemente agitado durante 30 min. e os detritos removidos por centrifugação a 14000 rpm durante 34 min. (rotor JA-14, Beckman).

A solução do sobrenadante foi concentrada para um volume de 60 ml, usando uma membrana de ultrafiltração PM-30 e dialisado durante a noite contra 8 litros de tampão HDG (20 mM HEPES, pH 7,4, 0,5 mM DTT, 10% (v/v) de glicerol e 0,02% de NaN<sub>3</sub>) contendo 0,2 M KCl.

#### Cromatografia em DEAE-Sepharose CL-6B

Preparou-se DEAE-Sepharose CL-6B, degaseou-se e empacotou-se em duas colunas diferentes (2,5 x 55 cm), seguindo as recomendações do fabricante. As colunas foram lavadas com 4 volumes de coluna de tampão HDG contendo 0,2 M KCl (para cromatografia com 0,2 M KCl) ou 0,05 M KCl (para cromatografia com gradiente linear de KCl).

A solução de sobrenadante dialisado foi aplicada em DEAE-Sepharose CL-6B equilibrada com tampão HDG contendo 0,2 M KCl. Tanto a actividade de N $\alpha$ -acetil-transferase como a de acetil-CoA-hidrolase coeluíram desta coluna de DEAE-Sepharose CL-6B num fluxo de 24 ml/h, conforme previamente apresentado (Lee, F.J.S., et al., J. Biol. Chem. 263: 14948-14955 (1988)).

Colheram-se as fracções (4 ml) e as que continham actividade de N $\alpha$ -acetiltransferase e de acetil-CoA-hidrolase foram reunidas e concentradas para um volume de 50 ml usando uma membrana de ultrafiltração PM-30. Este eluato concentrado foi dialisado durante 1 noite contra 2 x 4 litros de tampão HDG contendo 0,05 M KCl e depois aplicou-se numa segunda coluna de DEAE-Sepharose CL-6B (2,5 x 55 cm) equilibrada em tampão HDG contendo 0,5 M KCl.

Esta coluna foi eluída com um gradiente linear de 0,05 M (250 ml) a 0,5 M (250 ml) KCl em tampão HDG a 24 ml/h. As fracções (3,6 ml) foram colhidas e as que continham actividade de acetil-CoA-hidrolase foram reunidas (Figura 1) e concentradas para um volume de 5 ml, usando uma membrana de ultrafiltração PM-30.

#### Cromatografia em Sepharose CL-4B

O eluato concentrado da segunda cromatografia em DEAE-Sepharose foi aplicado numa coluna de Sepharose CL-4B (2,5 x 96 cm). A coluna foi eluída com tampão HDG contendo 0,2 M KCl a 20 ml/h. O volume de eluição da enzima foi determinado por A<sub>280 nm</sub> e actividade enzimática.



As fracções (3,0 ml) foram colhidas e as que continham actividade de acetil-CoA-hidrolase foram reunidas (Figura 2) e concentradas para um volume de 1,5 ml usando uma membrana de ultrafiltração PM-30.

#### Cromatografia em hidroxilapatite

O eluato concentrado de cromatografia em Sepahrose CL-4B foi dialisado durante a noite contra 2 x 4 litros de tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 7,4, 0,5 mM DTT, 10% (v/v) glicerol, 0,02%  $\text{NaN}_3$  e aplicado numa coluna de hidroxilapatite (2,0 x 25 cm) equilibrada com o mesmo tampão usado na diálise. A coluna foi eluida com um gradiente linear de tampão fosfato de potássio de 0,05 M (150 ml) até 0,5 M (150 ml), pH 7,4, contendo 0,5 mM DTT, 10% (v/v) glicerol, 0,02%  $\text{NaN}_3$  a 12 ml/h.

Colheram-se fracções (1,8 ml) e as que continham actividade de acetil-CoA-hidrolase foram reunidas (Figura 3) e concentradas para um volume de 1,5 ml usando uma membrana de ultrafiltração PM-30. Amostras (25  $\mu\text{l}$ ) de várias fracções das fracções 40 - 60 foram analisadas num gel de SDS-PAGE (9%) em condições redutoras, como descrito por Laemmli (Laemmli, U.K., Nature 227: 680-685 (1970)). As bandas de proteína foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R.

#### Electroforese em dodecilsulfato de sódio-polizcrlamida

Um amostra de cada conjunto de fracções contendo acetil-CoA-hidrolase isolada de cada passo de purificação foi analisada num gel de SDS-PAGE (9%) em condições redutoras, como descrito por Laemmli (Laemmli, U.K., Nature 227: 680-685 (1970)).



Para determinação da  $M_r$  das subunidades da enzima purificada usou-se como padrões de pesos moleculares miosina (205.000),  $\beta$ -galactosidase de E. coli (116.000), fosforilase de musculo de coelho (97.000), albumina de soro bovina (66.000), albumina de ovo (45.000) e anidrase carbónica (29.000). As bandas de proteina foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R. Bandas com  $M_r$  elevada não foram observadas nas faixas contendo extracto bruto ou o conjunto de fracções de DEAE-Sephrose (0,2 M KCl). A ausência de tais bandas é devido à degradação proteolítica que ocorreu durante o armazenamento prolongado.

#### Determinação do ponto isoeléctrico

A focagem isoeléctrica, usando uma amostra do conjunto de fracções de hidroxilapatite (Figura 3) foi efectuada como previamente descrito (Catsimpoolas, N. Isoelectric Focusing, Academic Press, New york (1976)) (gamma de pH 3,5-9,5). Para a determinação do pI das subunidades de enzima purificada usaram-se como padrões de pI amiloglucosidase de A. oryzae (pI = 3,55), inibidor da tripsina de soja (pI = 4,65),  $\beta$ -lactoglobulina do leite (pI = 5,13), anidrase carbónica B de eritrócitos bovina (pI = 5,85), anidrase carbónica B de eritrócitos humana (pI = 6,57), mioglobina de coração de cavalo (pI = 6,76 e 7,16), L-desidrogenase láctica de musculo de coelho (pI = 8,3, 8,4 e 8,55) e tripsinogénio do pâncreas bovino (pI = 9,3). As bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R.



### Determinação do peso molecular

A  $M_r$  da proteína nativa foi calculada por comparação com padrões de peso molecular por filtração em gel numa coluna de Sepharose CL-4B (2,5 x 96 cm). Uma amostra da enzima purificada da cromatografia em hidroxilapatite foi aplicada na coluna. A coluna foi eluída com tampão HDG contendo 0,2 M KCl a 20 ml/h. O volume de eluição da enzima foi determinado por  $A_{280\text{nm}}$  e a actividade enzimática (ensaio de inibição da acetilação e o peso molecular aparente da acetil-CoA-hidrolase de levedura foi calculado por comparação com os volumes de eluição relativo dos padrões proteicos incluindo tiroglobulina (669.000), apoferritina (443.000),  $\beta$ -amilase (200.000), álcool-desidrogenase (150.000), albumina do soro bovina (66.000) e anidrase carbónica (29.000).

### Análise de aminoácidos

O eluato concentrado da cromatografia em hidroxilapatite foi aplicado num gel de 7% de SDS-PAGE de 1,5 mm de espessura num poço de 12 cm, sujeito a electroforese e electroeluido como previamente descrito (Hunknpiller, M., et al., Methods Enzymol. 91: 227-238 (1983)).

A composição em aminoácidos foi determinada usando um Analisador de Aminoácidos Beckman 6300 após 24 h de hidrólise a 110°C em 6N HCl contendo 0,01% de fenol (Moore, S., Chemistry and Biology of Peptides, Meienhofer, J., ed., Ann. Arbor Science, Ann Arbor, MI, pág. 629-652).



### Análise da sequência proteica

A análise da sequência proteica da acetil-CoA-hidrolase electroeluida foi efectuada duas vezes (cada  $\sim 300$  pmoles) usando um Sequenciador de Proteínas Applied Biosystems 470A e um Analisador de Pth Applied Biosystems 120A (Hewick, R.M., et al., J. Biol. Chem. 256: 7990-7997 (1981)).

### Modificações químicas

DEPC (liquido, aproximadamente 6,8 M) foi eluido para 1 M com etanol a 100% frio. Fizeram-se outras diluições de DEPC com fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0) contendo 1 mM EDTA e 5% de etanol. NBS e anidrido succinico foram dissolvidos em acetona e diluidos com água destilada antes de usar. NEM, IAA, IAM, (HNBS(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Br), TNBS e solução de N-acetilimidazole foram preparados em água destilada. pCMB foi preparado em 10 mM NaOH como uma solução concentrada e diluido com água destilada antes de usar.

As experiências de inibição individuais foram feitas a 25°C por incubação da enzima em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) contendo os vários reagentes de modificação, excepto para (HNBS(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Br) e DEPC, os quais foram feitos em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0).

Após 15 min. numa pequena quantidade de cada amostra foi dialisada usando um microdialisador contra fosfato de potássio 100 mM, pH 7,4, 1 mM DTT a 4°C durante 3 a 4 h. A actividade enzimática foi determinada usando o ensaio radioactivo para a acetil-CoA-hidrolase. Como testemunha incubou-se a enzima separadamente sem se adicionar reagentes.



### Síntese de peptídeos

ACTH humanos (1-24) foram sintetizados num Sintetizador de Peptídeos Applied Biosystems Modelo 430A e caracterizados como previamente descrito (Finnegan, A., et al., J. Exp. Med. 164: 897-910 (1986)).

Apesar do que foi dito se referir a execuções preferidas particulares, deve-se entender que o presente invento não lhes está limitado. Os familiarizados com a matéria verão que podem ser feitas várias modificações as realizações práticas descritas e que tais modificações estão dentro do âmbito do presente invento.



## R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1ª. - Processo para a obtenção de hidrolase de acetil-CoA substancialmente purificada tendo as seguintes características;

(a) um peso molecular de aproximadamente  $64.000 \pm 5.000$  daltons;

(b) ponto isoeléctrico a cerca de 5,8;

(c) pH óptimo a 8,0;

(d) actividade máxima a temperaturas de  $37^{\circ}\text{C}$  a  $42^{\circ}\text{C}$  em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir a unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetilo de  $[^3\text{H}]$ acetil-coenzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático padrão de acetiltransferase nas condições normalizadas;

(e) desnaturação irreversível ocorrendo após 1 minuto a  $70^{\circ}\text{C}$

(f) dependente da especificidade para o substrato, e



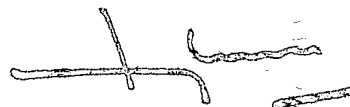
(g) inactivação por modificação química com dietil-piromalonato, caracterizado por, a partir de uma amostra contendo hidrolase de acetil-CoA, compreender os seguintes passos:

(a) recuperação de hidrolase de acetil-CoA a partir de uma amostra contendo a referida hidrolase de acetil-CoA;

(b) sujeição da referida hidrolase de acetil-CoA bruta do passo (a) a permuta iónica para se obter fracções activas de hidrolase de acetil-CoA em que a unidade de actividade de hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetilo de  $[^3\text{H}]$ acetil. Coenzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático convencional de acetiltransferases nas condições normalizadas; e

(c) aplicação das referidas fracções activas de hidrolase de acetil-CoA do passo 5b) a cromatografia de adsorção a hidroxilapatite patente para se obter hidrolase de acetil-CoA substancialmente purificada.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter a hidrolase de acetil-CoA tendo actividade enzimática superior a 20 em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz



de transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetilo de  $[^3\text{H}]$ acetil-Co-enzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático padronizado para acetiltransferase nas condições normalizadas.

3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado para se obter a hidrolase de acetil-CoA tendo actividade enzimática superior a 50 em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz e transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetilo do  $[^3\text{H}]$ acetil-coenzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático convencional da acetiltransferase em condições normalizadas.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter a hidrolase de acetil-CoA tendo actividade enzimática superior a 1000 em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetilo de  $[^3\text{H}]$ acetil-Coenzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático convencional da acetiltransferase em condições normalizadas.



5a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter hidrolase de acetil-CoA tendo actividade enzimática superior a 3000 em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetil-coenzima A para ACTH (1-24) pelo ensaio enzimático convencional das acetiltransferase em condições normalizadas.

6a. - Processo para a obtenção de hidrolase de acetil-CoA com um peso molecular de cerca de 64.000 daltons, tendo a referida hidrolase de acetil-CoA uma actividade enzimática superior a 1000 em que uma unidade de actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de actividade acetiltransferase em condições convencionais, caracterizado por compreender os passos de:

(a) recuperação da hidrolase de acetil-CoA bruta a partir de uma amostra contendo a referida hidrolase de acetil-CoA;

(b) sujeição da referida hidrolase de acetil-CoA bruta do passo (a) a permuta iónica para se obter fracções activas de hidrolase de acetil-CoA em que uma unidade da actividade hidrolase de acetil-CoA é definida como a quantidade de enzima capaz de inibir 1 unidade de hidrolase de acetiltransferase em que 1 unidade de actividade acetiltransferase é definida como a quantidade de enzima capaz de transferir 1 pmole do grupo  $[^3\text{H}]$ acetil-coenzima A para ACTH (1-24) por ensaio enzimático convencional para acetiltransferase nas condições normalizadas, e



(c) aplicação das referidas fracções activas de hidrolase de acetil-CoA do passo (b) a cromatografia de adsorção em hidroxapatite para se obter hidrolase de acetil-CoA substancialmente purificada.

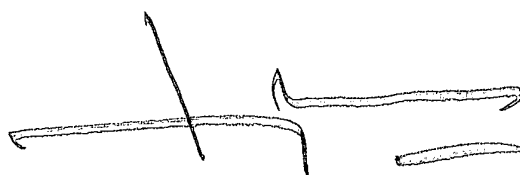
7a. - Processo para a obtenção de um fragmento peptidico de acetil-CoA caracterizado por se incorporar no referido fragmento essencialmente a seguinte sequência de aminoácidos: Fen-Asn-Leu-Fen-Val-Gli-Ala-Gli-Pro-Glu-Glu-Asn-(Arg)

8a. - Processo para a obtenção de um fragmento peptidico de acetil-CoA caracterizado por se incorporar no referido fragmento essencialmente a seguinte sequência de aminoácidos: Val-val-Ala-Ile-Val-Glu-Ser-Tre-Met-Arg-Leu.

9a. - Processo para a obtenção de uma molécula de DNA recombinante caracterizado por se incorporar na referida molécula uma sequência genética codificadora da hidrolase de acetil-CoA.

10a. - Processo para a obtenção de uma planta com maior tolerância a herbicidas caracterizado por compreender a transformação de uma planta com a sequência genética codificadora da molécula de DNA recombinante da reivindicação 10.

Lisboa, 29 de Junho de 1989

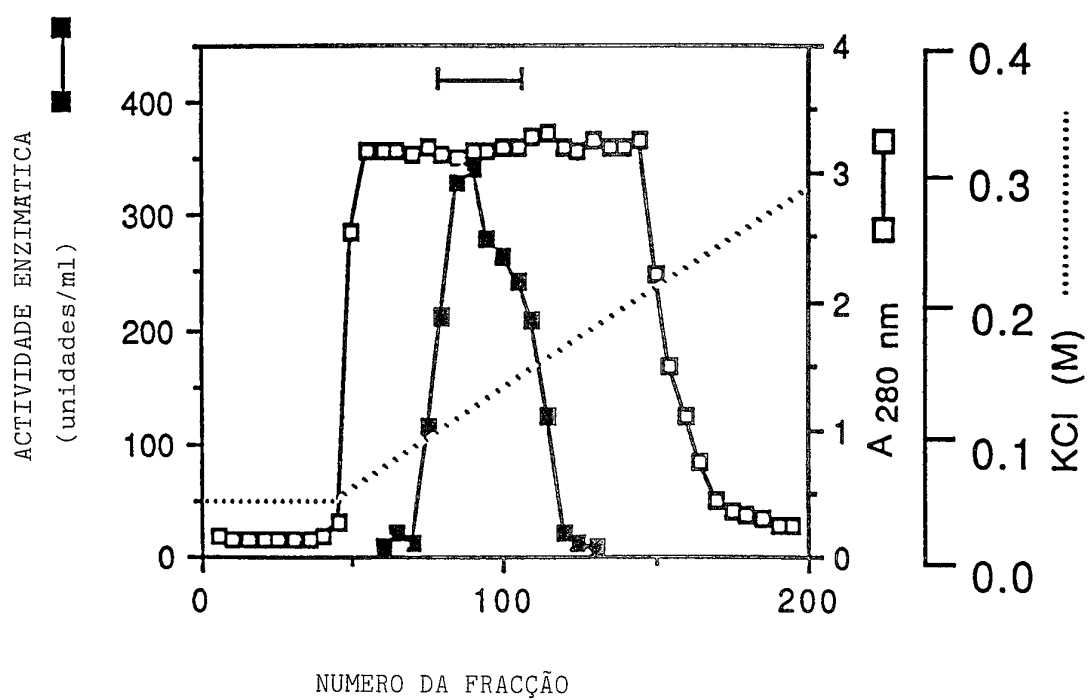


J. PEREIRA DA CRUZ  
Agente Oficial de Propriedade Industrial  
RUA VICTOR GORDON, 10-A, 1.<sup>o</sup>  
1200 LISBOA

*[Handwritten signature]*

1/8

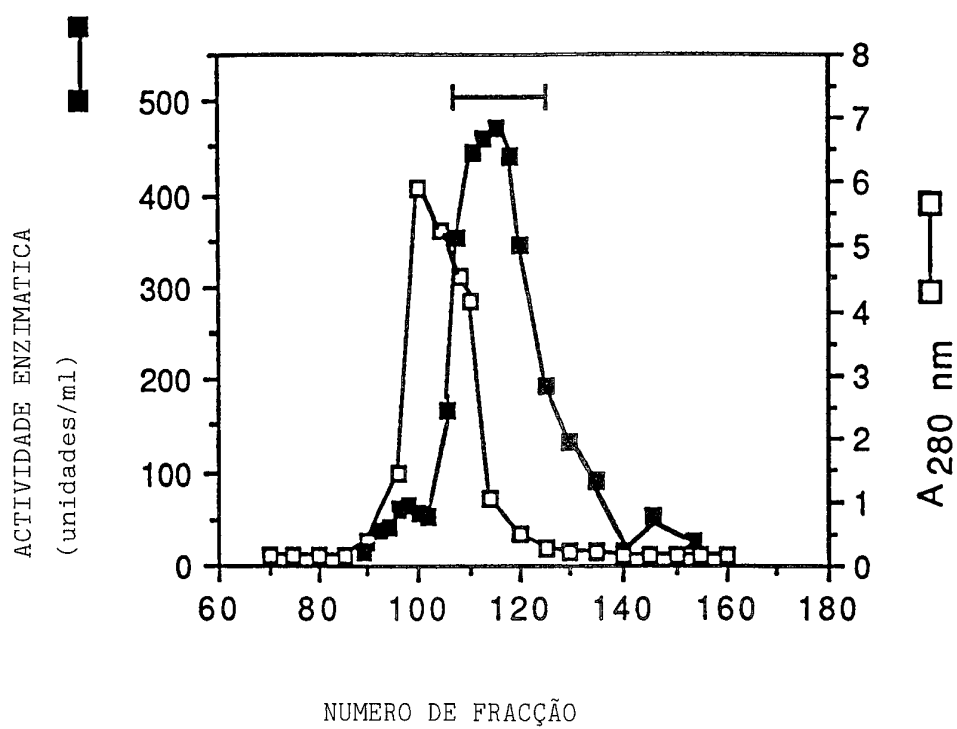
**FIG. 1**

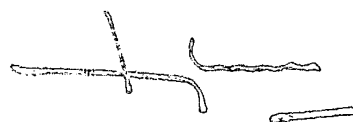




2/8

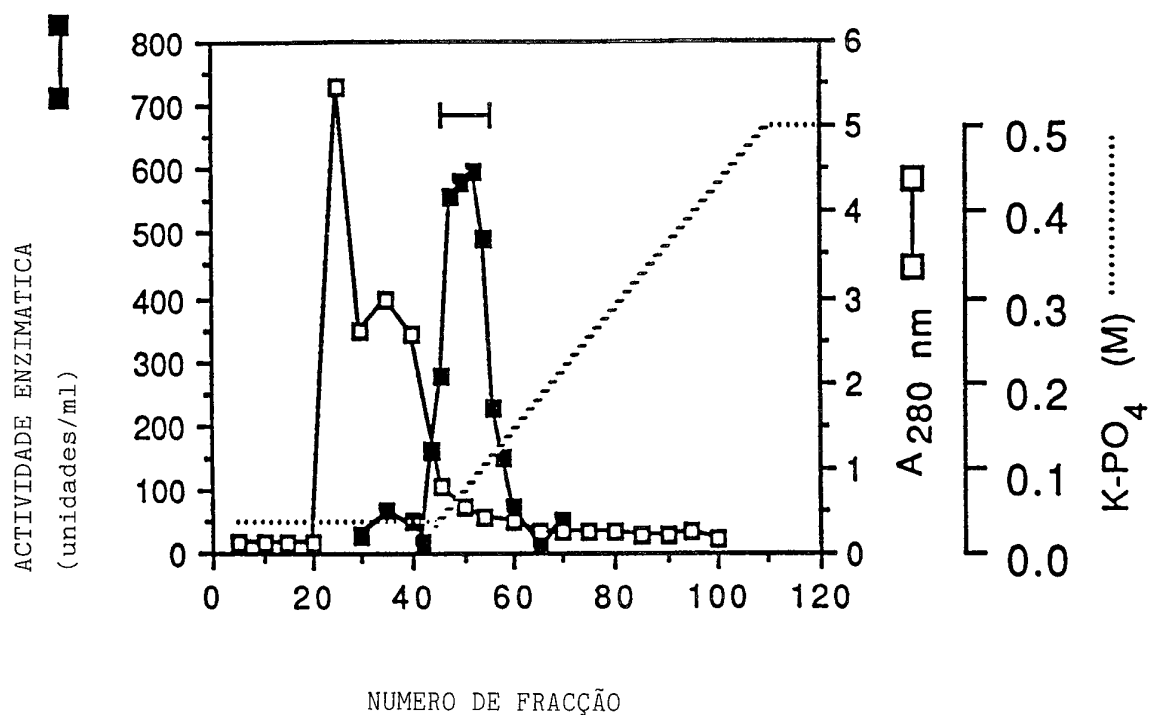
FIG. 2

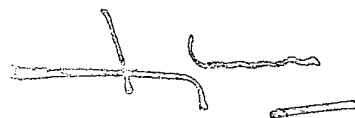




3/8

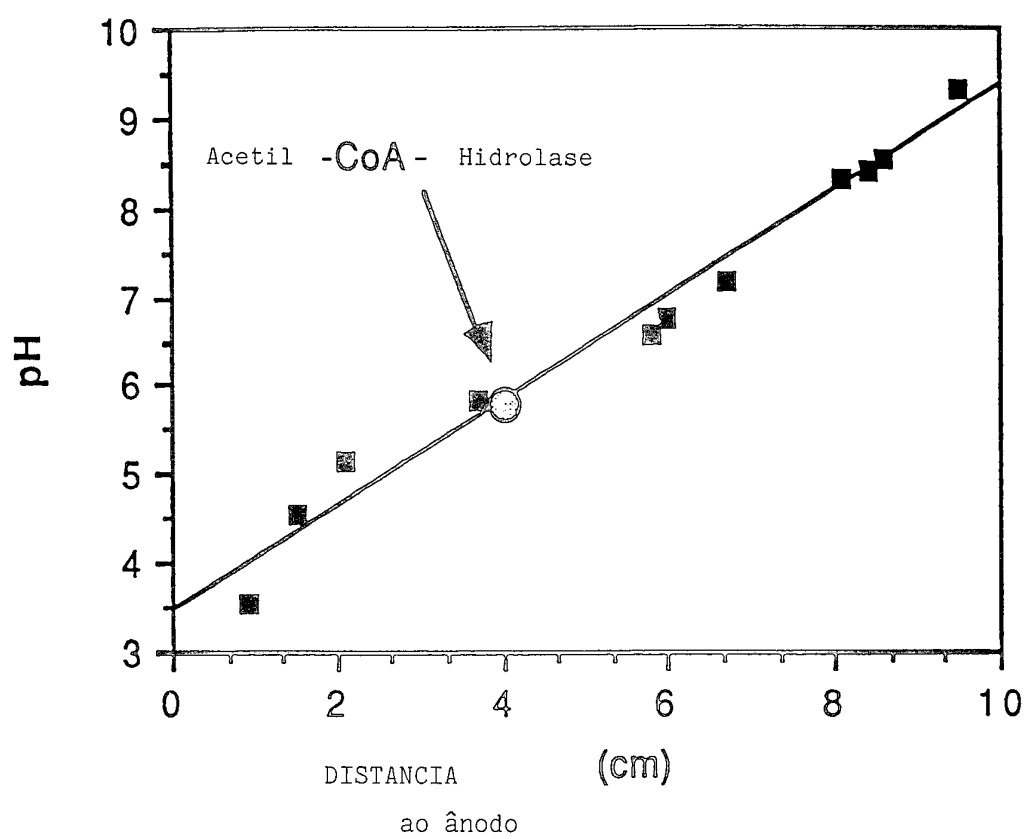
FIG. 3

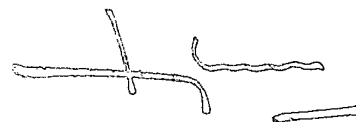




4/8

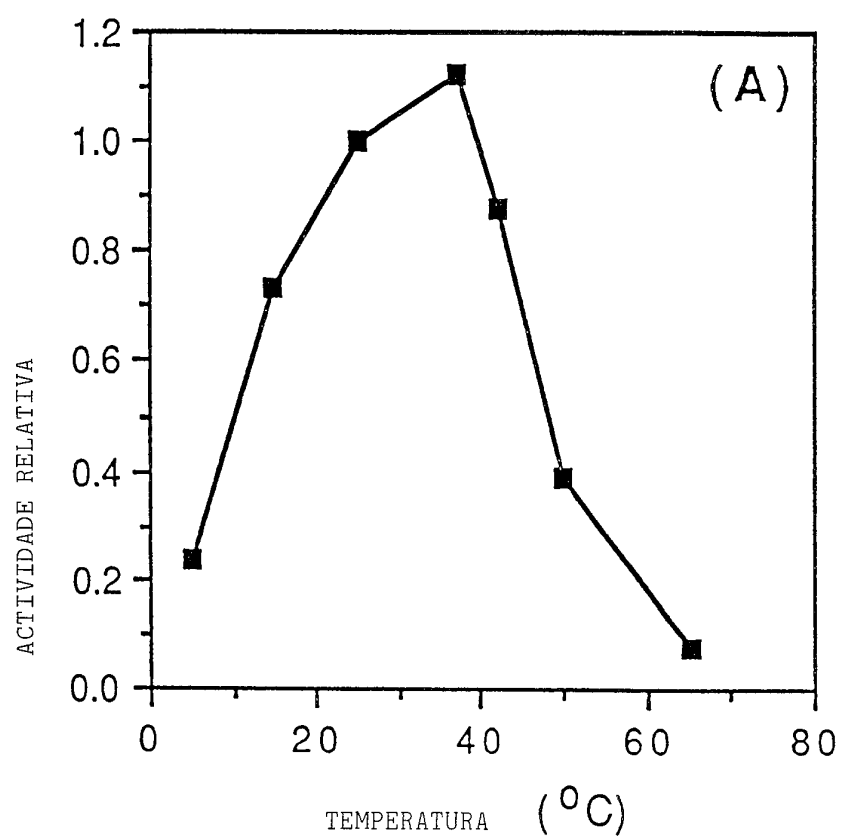
FIG. 4

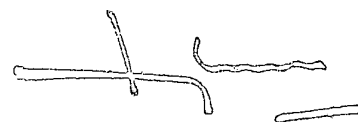




5/8

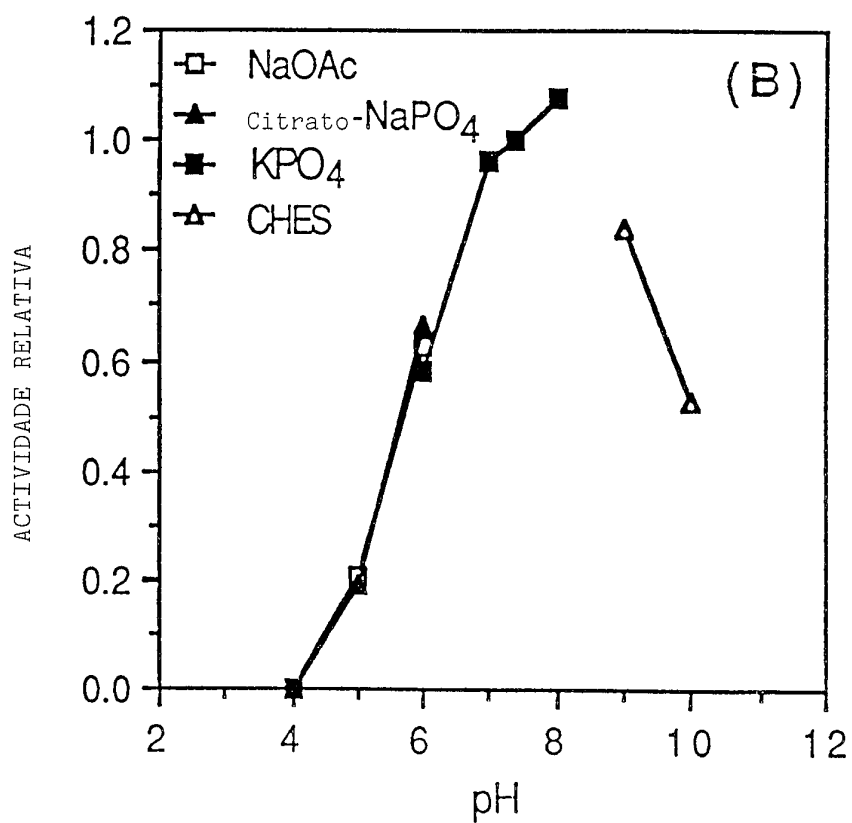
**FIG. 5A**





6/8

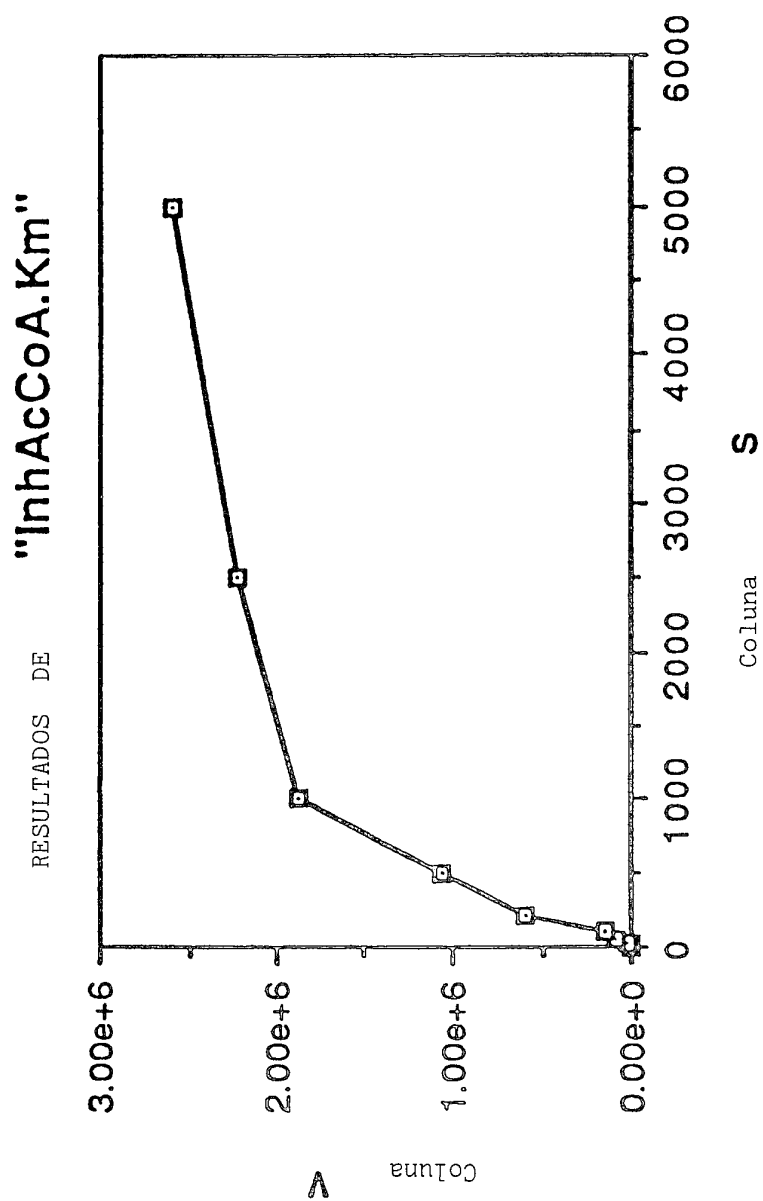
**FIG. 5B**



Handwritten signature or mark.

7/8

FIG. 6A



8/8

FIG. 6B

