

ANÁLISE DA ESTRUTURA DE PIRUVATO DESCARBOXILASE  
DE Saccharomyces cerevisiae MC 16

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

16/06/93

*[Assinatura]*

MARIA ANGELA LOPES DE ALMEIDA AMAZONAS 15

Orientador: Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas, para  
a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Campinas

Estado de São Paulo - Brasil

Maio, 1993

"Mesmo quando todas as possíveis  
questões científicas tiverem sido  
respondidas, os problemas da vida  
permanecerão completamente intactos."

Ludwig Wittgenstein

Tractatus Logico Philosophicus, 1922

A meus pais,  
pela base que me proporcionaram para  
que pudesse trilhar este caminho.

A Gildo,  
pelas vitórias e tropeços, encontros e  
desencontros nesta longa caminhada.

A Adriana e Erik,  
filhos adorados a quem tanto devo ...

## A G R A D E C I M E N T O S

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, por me proporcionar o suporte financeiro necessário à realização do doutoramento e pelo apoio nos momentos decisivos;

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, CNPUV/EMBRAPA, Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, nas pessoas de:

Dr. João Giugliani Filho, pelo entusiasmo e firme apoio no sentido de viabilizar meu afastamento para pós-graduação;

Dr. Jorge Tonietto, pelo apoio no momento de minha transferência da Universidade de Londres para a UNICAMP;

Dr. Gildo Almeida da Silva — companheiro por tantos anos..., pelas valiosas discussões na análise dos experimentos de fermentação;

Dr. José Fernando da Silva Protas, Dr. Celito Crivellaro Guerra e demais colegas pelo constante estímulo durante a redação deste trabalho;

Ao Centro de Biotecnologia e ao Departamento de Bioquímica do Imperial College of Science, Technology and Medicine, da Universidade de Londres, em especial:

ao Prof. Brian S. Hartley, por me ingressar no mundo das proteínas e, principalmente, por me atirar nas trevas do universo científico, possibilitando um longo aprendizado na

arte da sobrevivência;

ao Prof. Howard R. Morris e seu grupo, em particular à colega de pós-graduação Ashraf Anne Kublawi Chatterjee, pela execução e discussão dos trabalhos de espectrometria de massa;

à Dra. Minnie Rangarajan, por me introduzir nas técnicas de purificação de proteínas;

à Dra. Thérèse Anderton, pelo inestimável apoio e amizade;

aos funcionários da planta piloto, pela multiplicação da levedura em fermentadores de 60 litros;

aos colegas de pós-graduação, pela valiosa troca de conhecimentos teórico-práticos e amizade;

**Ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, em especial:**

ao Prof. Dr. Aldo Focesi Júnior, por acreditar neste trabalho e possibilitar sua conclusão;

aos demais professores, pelo estímulo e ensinamentos transmitidos;

à Mariza Boscacci Marques, colega de pós-graduação e amiga com quem tive a felicidade de dividir o entusiasmo pelas proteínas;

**Aos funcionários da EMBRAPA-CNPUV:**

Engenheiro Civil Dr. Jorge Luiz Cenci, pela execução dos desenhos gráficos;

Bibliotecária Ana Matilde Amandio Castanheiro Coêlho e

secretária Márcia Rita Saim Perozzo, pela revisão geral;  
Secretárias Maria Luiza Beltrami e Maria Antonieta Luvison,  
pelos serviços datilográficos;

**Aos amigos** com quem compartilhei os anos dedicados a este  
trabalho, em especial ao inesquecível Gustav Westhoff —  
que saudade!... — e às grandes amigas Daisy de Mesquita  
Westhoff e Dionea Meinhardt;

**A todos** os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a  
realização deste trabalho;

**Sou profundamente grata.**

# S U M Á R I O

|                                                                                              | PÁGINA |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| AGRADECIMENTOS.....                                                                          | iii    |
| ABSTRACT.....                                                                                | ix     |
| RESUMO.....                                                                                  | xi     |
| ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....                                                                 | xiii   |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                        | xvi    |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                       | xxi    |
| INTRODUÇÃO .....                                                                             | 1      |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                     | 35     |
| MICRORGANISMO UTILIZADO .....                                                                | 35     |
| EFEITO DA AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE PDC.....                                               | 35     |
| 1. Condições de cultivo .....                                                                | 35     |
| 2. Preparo do extrato bruto .....                                                            | 37     |
| 3. Métodos analíticos .....                                                                  | 39     |
| 3.1. Número total de células e percen-<br>tagem de células em brotamento .....               | 39     |
| 3.2. Densidade celular .....                                                                 | 40     |
| 3.3. Consumo de açúcar .....                                                                 | 41     |
| 3.4. Produção de etanol .....                                                                | 42     |
| 3.5. Proteína total .....                                                                    | 43     |
| 3.6. Ensaio enzimático .....                                                                 | 44     |
| 4. Análise dos dados de crescimento .....                                                    | 47     |
| 4.1. Taxa específica de crescimento.....                                                     | 47     |
| 4.2. Fator de conversão substrato-biomassa.....                                              | 47     |
| 4.3. Fator de conversão substrato-produto.....                                               | 47     |
| 4.4. Quociente metabólico ou taxa metabólica<br>específica para utilização de substrato..... | 47     |
| 4.5. Quociente metabólico ou taxa metabólica<br>específica para formação de produto.....     | 48     |
| 4.6. Quociente de Pasteur.....                                                               | 48     |
| ESTABILIDADE DE PDC EM DIFERENTES MÉTODOS DE ESTOCAGEM..                                     | 49     |
| PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PDC .....                                                          | 50     |
| 1. Preparo do inóculo, fermentação e coleta<br>e rompimento das células .....                | 50     |
| 2. Purificação de PDC .....                                                                  | 52     |

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio(PAGE-SDS) ..... | 58  |
| 4. Estocagem de PDC .....                                                             | 63  |
| ANÁLISE DA ESTRUTURA DAS FORMAS DE PDC ISOLADAS.....                                  | 64  |
| 1. Determinação da massa molecular .....                                              | 64  |
| 2. Determinação do ponto isoelétrico .....                                            | 67  |
| 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (PAGE-Nativo) .....                   | 70  |
| 4. Espectrometria de massa .....                                                      | 72  |
| 4.1. Preparo das amostras .....                                                       | 72  |
| 4.2. Clivagens específicas das cadeias polipeptídicas .....                           | 72  |
| Digestão por tripsina.....                                                            | 72  |
| Digestão por quimotripsina .....                                                      | 72  |
| Digestão por protease V8 .....                                                        | 73  |
| Digestão por carboxipeptidase B .....                                                 | 73  |
| Clivagem por CNBr.....                                                                | 73  |
| Degradação seqüencial de Edman.....                                                   | 74  |
| 4.3. Purificação de peptídios dos digestos por HPLC .....                             | 74  |
| 4.4. Métodos de espectrometria de massa .....                                         | 75  |
| Mapeamento FAB .....                                                                  | 75  |
| Varredura ligada B/E-CAD .....                                                        | 76  |
| Ionização por eletrospray (ESI-MS).....                                               | 77  |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                           | 78  |
| I- EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....                                                     | 78  |
| EFEITO DA AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE PDC.....                                        | 78  |
| ESTABILIDADE DE PDC EM DIFERENTES MÉTODOS DE ESTOCAGEM .....                          | 87  |
| PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PDC.....                                                    | 97  |
| II- ANÁLISE DA ESTRUTURA DAS FORMAS DE PDC ISOLADAS....                               | 112 |
| DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR.....                                                  | 112 |
| DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO.....                                                | 112 |
| ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NATIVO.....                                     | 119 |
| ESPECTROMETRIA DE MASSA .....                                                         | 123 |
| 1. Mapeamento-FAB .....                                                               | 123 |
| 1.1. Digestão por tripsina.....                                                       | 123 |
| 1.2. Análise do N-terminal dos digestos trípticos - Degradação de Edman.....          | 132 |
| 1.3. Análise do C-terminal dos digestos trípticos - Subdigestão por CpB.....          | 133 |
| 1.4. Digestão por tripsina/protease V8.....                                           | 135 |
| 1.5. Digestão por tripsina/CNBr.....                                                  | 136 |
| 1.6. Digestão por quimotripsina .....                                                 | 138 |



|                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.7. Clivagem por CNBr.....                                                                                                                                     | 141 |
| 1.8. Resultados gerais do mapeamento-FAB.....                                                                                                                   | 144 |
| 2. Varredura Ligada B/E-CAD.....                                                                                                                                | 148 |
| 2.1. Análise de peptídios puros.....                                                                                                                            | 149 |
| 2.2. Análise de mistura direta.....                                                                                                                             | 159 |
| 2.2.1. Análise da angiotensina II numa mis-<br>tura do digesto tríptico de PDC.....                                                                             | 160 |
| 2.2.2. Análise do componente de um digesto<br>tríptico de PDC de m/z 789.....                                                                                   | 163 |
| 2.2.3. Análise do componente de um digesto<br>tríptico de PDC de m/z 1016.....                                                                                  | 166 |
| 2.2.4. Análise do componente de um digesto<br>tríptico de PDC de m/z 1778.....                                                                                  | 168 |
| 3. Ionização por Eletrospray (ESI-MS).....                                                                                                                      | 171 |
| CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                  | 182 |
| LITERATURA CITADA .....                                                                                                                                         | 185 |
| APÊNDICE A. Ácido pirúvico como composto-chave no<br>metabolismo bacteriano da glicose.....                                                                     | 208 |
| APÊNDICE B. Relação entre as principais vias<br>metabólicas em eucariotos e suas<br>compartimentalizações, destacando<br>o papel central do ácido pirúvico..... | 209 |
| APÊNDICE C. Mecanismo de ação de piruvato<br>descarboxilase de levedura.....                                                                                    | 210 |
| APÊNDICE D. Equipamento de Green para preparo<br>de extratos de levedura pelo método<br>de pérolas de vidro.....                                                | 211 |
| APÊNDICE E. Programa para linearização da<br>equação $x = x_0 e^{\mu \Delta t}$ .....                                                                           | 212 |
| APÊNDICE F. Reação do brometo de cianogênio.....                                                                                                                | 214 |
| APÊNDICE G. Estruturas dos íons produzidos<br>a partir de peptídios por<br>espectrometria de massa.....                                                         | 215 |

## A B S T R A C T

Pyruvate decarboxylase (PDC, EC 4.1.1.1) is a key enzyme in the yeast carbon metabolism, driving pyruvic acid towards ethanol production. Although it is well established that the enzyme is a tetramer of about 240 KD, its monomeric subunit structure is still a matter of controversy. Either one or two subunit types have been described and three structural genes — PDC 1, PDC 5 and PDC 6 — identified so far. This thesis had the aim of contributing for the elucidation of the question.

Preliminary experiments were developed to establish the adequate conditions to the enzyme production and stability during its purification and storage. Three types of PDC, separable by ion exchange chromatography, were isolated and the following hypotheses to explain their origin were brought forward: 1. dimer-tetramer/holoenzyme-apoenzyme dissociation; 2. reversible phosphorylation; 3. proteolysis; and 4. different subunits/isoenzymes.

The first hypothesis was discarded, a priori, due to the conditions of pH and excess of cofactors utilized in the enzyme purification procedure. Through selected techniques of mass spectrometry — FAB-mapping, B/E linked scanning/CAD and electrospray ionisation —, it was concluded that the second and the third do not explain the observed phenomenon and that the three types of PDC are, probably, identical subunits and

products of the PDC 1 gene. None of the three fitted to the sequences predicted from PDC 5 and PDC 6 genes. In addition, the experiments have allowed the identification of a processing and post-translational modification event at the N-terminus, as well as the detection of an error in the PDC 1 predicted amino acid sequence at residue 335. This was the first time that linked scanning was employed, with success, to the analysis of an unknown component in an unpurified complex proteolytic digest mixture. The mass spectrometry approach used has demonstrated a great potential as a rapid and efficient method for high molecular mass biopolymer sequence analysis without the limiting purification step, for checking the fidelity of gene sequences, as well as for the detection and elucidation of polipeptide chain processing and post-translational modification events. This is particularly important if one considers that, with the progress in DNA sequencing techniques, the requirement for a complete sequence has become limited to a few protein chemical studies. Rather, the emphasis now is on the provision of partial sequence data, typically from six to twelve amino acid residues, for the generation of synthetic oligonucleotide probes to screen a gene library.

## R E S U M O

Piruvato descarboxilase (PDC, EC 4.1.1.1) é uma enzima chave no metabolismo do carbono de levedura, direcionando o ácido pirúvico para a produção de etanol. Embora esteja bem estabelecido que a enzima é um tetrâmero de aproximadamente 240 KD, a estrutura das suas subunidades monoméricas é ainda uma questão controvertida. Tanto um como dois tipos de subunidades têm sido descritos, tendo sido identificados até o momento três genes estruturais — PDC 1, PDC 5 e PDC 6. Esta tese se propôs a contribuir para a elucidação da questão.

Experimentos preliminares foram executados visando estabelecer as condições adequadas à produção e à estabilidade da enzima durante sua purificação e estocagem. Três formas de PDC, separáveis por cromatografia de troca iônica, foram isoladas e as seguintes hipóteses foram levantadas para explicar suas origens: 1. dissociação dímero-tetrâmero/holoenzima-apoenzima; 2. fosforilação reversível; 3. proteólise; e 4. diferentes subunidades/isoenzimas.

A primeira hipótese foi descartada, a priori, devido às condições de pH e excesso de cofatores utilizadas na purificação da enzima. Através de técnicas selecionadas de espectrometria de massa — mapeamento-FAB, varredura ligada B/E-CAD e ionização por eletrospray —, concluiu-se que a segunda e a terceira não explicam o fenômeno observado e que as três formas de PDC analisadas se constituem em subunidades

provavelmente idênticas e produtos do gene PDC 1. Nenhuma das três formas correspondeu às seqüências derivadas dos genes PDC 5 e PDC 6. Os experimentos permitiram, ainda, a identificação de um evento de processamento proteolítico acompanhado de modificação pós-tradução do N-terminal, bem como a detecção de um erro no resíduo 335 da seqüência derivada do gene PDC 1. Essa foi a primeira vez que a varredura ligada foi empregada, com sucesso, para a análise de um componente desconhecido numa mistura de digesto proteolítico complexa não resolvida. A abordagem de espectrometria de massa utilizada revelou grande potencial como um método rápido e eficiente de análise de seqüência de biopolímeros de alta massa molecular com remoção da etapa limitante de purificação, de checagem da fidelidade de seqüências gênicas, bem como de detecção e elucidação de eventos de processamento e modificação pós-tradução de cadeias polipeptídicas. Isso é particularmente importante considerando-se que, com o avanço nas técnicas de seqüenciamento de DNA, a necessidade de uma seqüência completa tem se tornado limitada a poucos estudos de química de proteína. A atual ênfase está no fornecimento de partes da seqüência, tipicamente de seis a doze resíduos de aminoácidos, para uso na geração de sondas de oligonucleotídeos sintéticos para a triagem de bancos genômicos.

## A B R E V I A T U R A S E S Í M B O L O S

|                  |                                                      |
|------------------|------------------------------------------------------|
| A <sub>600</sub> | - absorbância a 600 nm                               |
| AcCoA            | - acetil coenzima A                                  |
| ADH              | - álcool desidrogenase                               |
| ALDH             | - aldeído desidrogenase                              |
| ATP              | - adenosina 5'-trifosfato                            |
| B/E              | - campo magnético/campo elétrico                     |
| CAD              | - decomposição ativada por colisão                   |
| CI               | - ionização química                                  |
| CNBr             | - brometo de cianogênio                              |
| CoA              | - coenzima A                                         |
| CpB              | - carboxipeptidase B                                 |
| D                | - dalton; unidade de massa atômica                   |
| DFP              | - diisopropilfluorofosfato                           |
| DNA              | - ácido desoxirribonucléico                          |
| DTT              | - ditionitroretol                                    |
| EDTA             | - ácido etilenodiaminotetraacético                   |
| EI               | - ionização por impacto eletrônico                   |
| ESI              | - ionização por eletrospray                          |
| EtOH             | - etanol                                             |
| FAB              | - bombardeamento por átomos acelerados               |
| FD               | - dessorção de campo                                 |
| FPLC             | - "Fast Protein Liquid Chromatography"               |
| hCGRP            | - peptídio relacionado ao gene da calcitonina humana |
| HF-MS            | - espectrometria de massa de alto campo              |

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| HPLC             | - "High Performance Liquid Chromatography"                                        |
| IEF              | - focalização isoelétrica                                                         |
| LDH              | - lactato desidrogenase                                                           |
| MCA              | - "Multi Channel Acquisition"                                                     |
| MeOH             | - Metanol                                                                         |
| MNBA             | - álcool mono-nitrobenzílico                                                      |
| MS               | - espectrometria de massa                                                         |
| mS               | - miliSiemens                                                                     |
| m/z              | - relação massa/carga                                                             |
| NADH             | - nicotinamida adenina dinucleotídio(forma reduzida)                              |
| NAD <sup>+</sup> | - nicotinamida adenina dinucleotídio(forma oxidada)                               |
| PAGE             | - eletroforese em gel de poliacrilamida                                           |
| PCMB             | - p-cloromercuribenzoato                                                          |
| PD               | - dessorção de plasma                                                             |
| PDC              | - piruvato descarboxilase                                                         |
| PDH              | - piruvato desidrogenase                                                          |
| PITC             | - fenilisotiocianato                                                              |
| PMSF             | - fluoreto de fenilmetilsulfonila                                                 |
| P <sub>Q</sub>   | - quociente de Pasteur                                                            |
| PTH              | - feniltiohidantoína                                                              |
| PyC              | - piruvato carboxilase                                                            |
| q <sub>p</sub>   | - quociente metabólico ou taxa metabólica específica para formação de produto     |
| q <sub>s</sub>   | - quociente metabólico ou taxa metabólica específica para utilização de substrato |
| q.s.p.           | - quantidade suficiente para                                                      |
| rpm              | - rotações por minuto                                                             |
| SDS              | - dodecil sulfato de sódio                                                        |
| TEMED            | - N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina                                              |

|           |                                                                      |
|-----------|----------------------------------------------------------------------|
| TFA       | - ácido trifluoroacético                                             |
| TPP       | - tiamina pirofosfato                                                |
| vvm       | - volume por volume de meio                                          |
| YEPD      | - meio de cultura à base de extrato de levedura, peptona e dextrose. |
| $Y_{p/s}$ | - fator de conversão substrato-produto                               |
| $Y_{x/s}$ | - fator de conversão substrato-biomassa                              |
| $\mu$     | - taxa específica de crescimento                                     |



# L I S T A   D E   F I G U R A S

|                                                                                                                                                                                                                                         | PÁGINA |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| FIG.1. Crescimento de <u>S. cerevisiae</u> MC 16 em aerobiose/anaerobiose e em anaerobiose em fermentador de 10 litros .....                                                                                                            | 79     |
| FIG.2. Fase exponencial do crescimento de <u>S. cerevisiae</u> MC 16 em aerobiose/anaerobiose em fermentador de 10 litros .....                                                                                                         | 80     |
| FIG.3. Fase exponencial do crescimento de <u>S. cerevisiae</u> MC 16 em anaerobiose em fermentador de 10 litros .....                                                                                                                   | 81     |
| FIG.4. Fatores de conversão, coeficientes metabólicos e taxas específicas de formação de produtos obtidos durante o crescimento de <u>S. cerevisiae</u> MC16 em aerobiose/anaerobiose e em anaerobiose em fermentador de 10 litros..... | 82     |
| FIG.5. Atividade de PDC em extratos brutos de levedura, após estocagem em diferentes condições, em comparação com a atividade inicial .....                                                                                             | 88     |
| FIG.6. Percentagem de atividade de PDC, em extratos brutos de levedura, após estocagem em diferentes condições .....                                                                                                                    | 89     |
| FIG.7. Estabilidade de PDC durante a estocagem em diferentes condições, avaliada pela determinação da atividade enzimática de amostras obtidas após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. PDC A <sub>1</sub> .....            | 90     |
| FIG.8. Estabilidade de PDC durante a estocagem em diferentes condições, avaliada pela determinação da atividade enzimática de amostras obtidas após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. PDC A <sub>2</sub> .....            | 91     |
| FIG.9. Estabilidade de PDC durante a estocagem em diferentes condições, avaliação pela determinação da atividade enzimática de amostras obtidas após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. PDC B.....                         | 92     |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIG.10. PAGE-SDS 12,5%, mostrando o grau de pureza de PDC A <sub>1</sub> , PDC A <sub>2</sub> e PDC B após cromatografia em DEAE-Sephacel e estocagem em diferentes condições por 20,16 e 8 dias para PDC A <sub>1</sub> , PDC A <sub>2</sub> e PDC B, respectivamente. Coloração pelo azul de Coomassie ..... | 93  |
| FIG.11. Curva de calibração para determinação da massa molecular de PDC por PAGE-SDS derivada do gel da figura 10 .....                                                                                                                                                                                        | 95  |
| FIG.12. Crescimento de <u>S. cerevisiae</u> MC 16 em fermentadores de 60 litros com vistas à produção e à purificação de PDC .....                                                                                                                                                                             | 100 |
| FIG.13. Cromatografia de troca iônica em resina DE 52 .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 101 |
| FIG.14. Cromatografia de troca iônica de PDC A em resina DEAE-Sephacel .....                                                                                                                                                                                                                                   | 102 |
| FIG.15. Cromatografia de troca iônica de PDC B em resina DEAE-Sephacel .....                                                                                                                                                                                                                                   | 103 |
| FIG.16. Relação entre condutividade e concentração molar do tampão fosfato de potássio utilizado na eluição das colunas de troca iônica .....                                                                                                                                                                  | 104 |
| FIG.17. Cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 22. PDC A <sub>1</sub> .....                                                                                                                                                                                                                                | 105 |
| FIG.18. Cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 22. PDC A <sub>2</sub> .....                                                                                                                                                                                                                                | 106 |
| FIG.19. Cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 22. PDC B .....                                                                                                                                                                                                                                             | 107 |
| FIG.20. Curva padrão para proteína pelo método Bio-Rad .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 108 |
| FIG.21. PAGE-SDS 12,5% de frações da coluna de filtração em Ultrogel AcA 22. Coloração pelo azul de Coomassie .....                                                                                                                                                                                            | 110 |

|                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIG.22. PhastSystem (Pharmacia) PAGE-SDS<br>12,5% de PDC pura. Coloração pelo<br>nitrato de prata .....                                   | 111 |
| FIG.23. Curva de calibração para determinação da<br>massa molecular de PDC por PhastSystem<br>PAGE-SDS derivada do gel da figura 22 ..... | 113 |
| FIG.24. Curva de calibração para determinação da<br>massa molecular de PDC por filtração<br>em gel-FPLC .....                             | 114 |
| FIG.25. Cromatograma de PDC A <sub>1</sub> obtido por FPLC .....                                                                          | 115 |
| FIG.26. Cromatograma de PDC A <sub>2</sub> obtido por FPLC .....                                                                          | 116 |
| FIG.27. Cromatograma de PDC B obtido por FPLC .....                                                                                       | 117 |
| FIG.28. PhastSystem (Pharmacia) IEF de PDC .....                                                                                          | 118 |
| FIG.29. Curva de calibração para determinação do<br>ponto isoelétrico de PDC derivada do gel<br>da figura 28 .....                        | 120 |
| FIG.30. PhastSystem (Pharmacia) PAGE-Nativo<br>de PDC. Coloração pelo nitrato<br>de prata .....                                           | 121 |
| FIG.31. PhastSystem (Pharmacia) PAGE-Nativo<br>de PDC. Coloração para atividade<br>pelo método do 1,2-dianilinoetano<br>(DAE) .....       | 122 |
| FIG.32. Mapa-FAB tríptico de PDC A <sub>1</sub> .....                                                                                     | 124 |
| FIG.33. Mapa-FAB tríptico de PDC A <sub>2</sub> .....                                                                                     | 125 |
| FIG.34. Mapa-FAB tríptico de PDC B .....                                                                                                  | 126 |
| FIG.35. Sequência de PDC derivada do gene PDC 1<br>(Kellermann et al., 1986) .....                                                        | 127 |
| FIG.36. Sequência de PDC derivada do gene PDC 1,<br>PDC 5 e PDC 6, segundo Hohmann (1991).....                                            | 131 |
| FIG.37. Mapa-FAB quimotríptico de PDC A <sub>1</sub> .....                                                                                | 139 |

|                                                                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIG.38. Resíduos de aminoácidos de PDC A <sub>1</sub> mapeados na seqüência derivada do gene PDC 1 por FAB-MS.....                                                        | 145 |
| FIG.39. Resíduos de aminoácidos de PDC A <sub>2</sub> mapeados na seqüência derivada do gene PDC 1 por FAB-MS.....                                                        | 146 |
| FIG.40. Resíduos de aminoácidos de PDC B mapeados na seqüência derivada do gene PDC 1 por FAB-MS.....                                                                     | 147 |
| FIG.41. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD da leucina-encefalina obtido em espectrômetro de setor duplo.....                                                   | 151 |
| FIG.42. Esquema de fragmentação racionalizando a origem dos íons encontrados no espectro de massa da figura 41, segundo nomenclatura de Roepstorff & Fohlman (1984) ..... | 151 |
| FIG.43. Espectro FAB-MS da leucina encefalina obtido em espectrômetro de setor duplo .....                                                                                | 152 |
| FIG.44. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD (He) da angiotensina II obtido em espectrômetro de setor duplo .....                                                | 154 |
| FIG.45. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD do tetradecapeptídio substrato da renina obtido em espectrômetro de setor duplo .....                               | 155 |
| FIG.46. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD do tetradecapeptídio substrato da renina obtido em espectrômetro de setor quádruplo .....                           | 156 |
| FIG.47. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD (He) da angiotensina II numa mistura do digesto tríptico de PDC obtido em espectrômetro de setor duplo .....        | 162 |

|                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIG.48. Espectro de massa de varredura ligada B/E - CAD, do componente desconhecido de $m/z$ 789 da mistura do digesto tríptico de PDC detectado no mapa-FAB obtido em espectrômetro de setor duplo.....                              | 164 |
| FIG.49. Espectro de massa de varredura ligada B/E - CAD, do componente desconhecido de $m/z$ 1016 da mistura do digesto tríptico de PDC detectado nos mapas-FAB das figuras 32, 33 e 34, obtido em espectrômetro de setor duplo ..... | 167 |
| FIG.50. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD (ar), do componente conhecido de $m/z$ 1778 da mistura do digesto tríptico de PDC detectado nos mapas-FAB das figuras 32, 33 e 34 obtido em espectrômetro de setor duplo .....  | 170 |
| FIG.51. Espectro ESI-MS carregando múltiplas cargas positivas. PDC $A_2$ .....                                                                                                                                                        | 172 |
| FIG.52. Espectro ESI-MS ilustrando uma região expandida de sua distribuição em forma de sino . PDC $A_1$ .....                                                                                                                        | 173 |
| FIG.53. Espectro ESI-MS ilustrando uma região expandida de sua distribuição em forma de sino. PDC $A_2$ .....                                                                                                                         | 174 |
| FIG.54. Espectro ESI-MS ilustrando uma região expandida de sua distribuição em forma de sino. PDC B .....                                                                                                                             | 175 |
| FIG.55. Espectro ESI-MS contendo os centróides de cada envelope de íon molecular. PDC $A_1$ .....                                                                                                                                     | 176 |
| FIG.56. Espectro ESI-MS contendo os centróides de cada envelope de íon molecular. PDC $A_2$ .....                                                                                                                                     | 177 |
| FIG.57. Espectro ESI-MS contendo os centróides de cada envelope de íon molecular. PDC B .....                                                                                                                                         | 178 |

# L I S T A   D E   T A B E L A S

|                                                                                                                                                                                                                                                  | PÁGINA |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TABELA I.      Quociente de Pasteur para o crescimento de <u>S. cerevisae</u> MC16 em aerobiose e anaerobiose .....                                                                                                                              | 86     |
| TABELA II.     Purificação de PDC de <u>S. cerevisae</u> MC 16 a partir de 120 litros de cultura ou 1600 g de células (peso úmido) .....                                                                                                         | 109    |
| TABELA III.    Íons quase-moleculares, $[M + H]^+$ , observados nos mapas-FAB dos digestos trípticos de PDC A <sub>1</sub> , PDC A <sub>2</sub> e PDC B e seus resíduos correspondentes da sequência derivada do gen PDC 1 .....                 | 129    |
| TABELA IV.     Sinais adicionais interpretáveis observados nos mapas-FAB dos digestos trípticos /protease V8 de PDC A <sub>1</sub> , PDC A <sub>2</sub> e PDC B .....                                                                            | 136    |
| TABELA V.      Sinais adicionais interpretáveis observados no mapa-FAB quimotríptico de PDC A <sub>1</sub> .....                                                                                                                                 | 140    |
| TABELA VI.     Sinais adicionais interpretáveis observados nos mapas-FAB após HPLC do digesto quimotríptico de PDC A <sub>1</sub> .....                                                                                                          | 140    |
| TABELA VII.    Íons quase-moleculares, $[M + H]^+$ , previstos e observados a partir da sequência derivada do gene PDC 1 após clivagem de PDC A <sub>1</sub> , PDC A <sub>2</sub> e PDC B por brometo de cianogênio e respectivos resíduos ..... | 142    |
| TABELA VIII.   Determinação do massa molecular de PDC A <sub>1</sub> , PDC A <sub>2</sub> e PDC B por espectrometria de massa por ionização eletrospray .....                                                                                    | 180    |

## I N T R O D U Ç Ã O

Ácido pirúvico se situa numa ramificação metabólica e seu destino depende de diversos fatores, entre os quais: célula onde é produzido, sua dependência por oxigênio e necessidade energética; concentração intracelular do ácido e seus metabólitos; atividades e propriedades cinéticas das enzimas que o metabolizam.

Bactérias heterotróficas utilizam glicose com formação de ácido pirúvico, o qual, em aerobiose, segue para o ciclo de Krebs e, em anaerobiose, se direciona para diferentes vias originando diversos produtos finais (Apêndice A), o que, inclusive serve de base para a classificação desses microrganismos.

Organismos eucariotos apresentam, ainda, um outro fator que influi no destino do ácido pirúvico, a compartimentalização metabólica. Em aerobiose, o cetoácido passa para a matriz mitocondrial, onde é convertido a acetil CoA pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase ou a ácido oxaloacético em reação catalisada pela piruvato carboxilase. Acetil CoA e ácido oxaloacético se condensam, para formar ácido cítrico, por ação da citrato sintetase. Quando a célula requer energia, ácido cítrico é oxidado, via ciclo do ácido cítrico, com conseqüente produção de ATP principalmente pela via da fosforilação oxidativa. Quando as necessidades energéticas da célula estão satisfeitas, altos níveis de ATP

inibem o ciclo do ácido cítrico. Nessas condições, ácido cítrico é exportado para o citossol e clivado para formar acetil CoA e ácido oxaloacético. Acetil CoA é, então, convertida a malonil CoA pela acetil CoA carboxilase, sendo esta a primeira etapa da biossíntese dos ácidos graxos. Considere-se, ainda, que acetil CoA é o ponto de partida para outros processos anabólicos, como a biossíntese de isoprenóides, carotenóides e esteróis. O esqueleto de carbono do ácido pirúvico é também incorporado para formar os aminoácidos alanina, valina e leucina, os quais são conhecidos como aminoácidos da família do piruvato. Em anaerobiose, ácido pirúvico é reduzido a ácido láctico por ação da lactato desidrogenase (animais e algumas bactérias) ou sofre descarboxilação, via piruvato descarboxilase, com produção de acetaldeído e posterior redução a etanol pela álcool desidrogenase (leveduras, algumas bactérias e plantas); nessas reações,  $\text{NAD}^+$  é regenerado, o que assegura a continuidade da glicólise. Sendo uma via produtora de energia, altos níveis de ATP também inibem a glicólise e favorecem as vias biossintéticas (Rawn, 1989). Um esquema mostrando a relação entre as principais vias metabólicas em eucariotos, e suas compartimentalizações, destacando o papel central do ácido pirúvico, está apresentado no Apêndice B.

No caso particular de levedura, mais especificamente Saccharomyces cerevisiae, duas enzimas desempenham papel chave no metabolismo do ácido pirúvico, direcionando-o ou para o ciclo de Krebs - o complexo piruvato desidrogenase -



ou para a fermentação alcoólica - a piruvato descarboxilase. Uma análise da distribuição do metabolismo nesse ponto de ramificação parece ser particularmente promissora, pois as reações catalisadas são praticamente irreversíveis e, assim, as reversas podem ser desconsideradas (Holzer, 1961).

**Piruvato desidrogenase** é o complexo multienzimático que catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato e concomitante formação de acetil CoA. O complexo é formado por três enzimas principais classificadas, de acordo com a nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (International Union of Biochemistry, 1984), como:

1. piruvato desidrogenase (lipoamida) (EC 1.2.4.1.) - outros nomes: piruvato descarboxilase, piruvato desidrogenase e pirúvico desidrogenase;
2. dihidrolipoamida acetiltransferase (EC 2.3.1.12) - outros nomes: lipoato acetiltransferase e tioltransacetilase A;
3. dihidrolipoamida desidrogenase (EC 1.8.1.4) - outros nomes: diaforase e lipoamida redutase (NADH).

Essas três enzimas, também conhecidas como componentes  $E_1$  (constituído de duas subunidades:  $E_{1\alpha}$  e  $E_{1\beta}$ ),  $E_2$  e  $E_3$  do complexo piruvato desidrogenase, respectivamente, formam um arranjo catalítico de múltiplas cópias. O complexo de E. coli tem uma massa molecular de  $4 \times 10^6$  e consiste de: 24 subunidades de  $E_2$ , cada uma com a massa molecular de 40000 D; 24 subunidades de  $E_1$  com massa molecular de 90000 D; e 24 subunidades de  $E_3$  com massa molecular de 55000 D. O complexo de mitocôndria de mamífero é maior ( $8,5 \times 10^6$  D) e possui uma

estequiometria das três enzimas diferente. Estima-se que haja 60 subunidades de  $E_2$  (50000 D), 20 subunidades de  $E_1$  (154000 D) e 5 subunidades de  $E_3$  (110000 D) (Tzagoloff, 1982). O componente  $E_2$  forma o núcleo ao qual  $E_1$  e  $E_3$  estão ligados não covalentemente.  $E_1$ , freqüentemente citado como piruvato descarboxilase, tem uma estrutura tetramérica ( $\alpha_2\beta_2$ ) e catalisa a descarboxilação — dependente de TPP — do piruvato e a subsequente acetilação redutiva de resíduos lipoil, covalentemente ligados ao componente  $E_2$ . Dihidrolipoamida acetiltransferase,  $E_2$ , é responsável pela transferência dos grupos acetila da S-acetildihidrolipoamida para a CoA. Dihidrolipoamida é reoxidada por  $E_3$ , a dihidrolipoamida desidrogenase, com produção de NADH (De Marcucci & Lindsay, 1985).

Duas outras enzimas, com funções regulatórias, encontram-se associadas não covalentemente ao complexo piruvato desidrogenase: a [piruvato desidrogenase (lipoamida)] quinase (EC 2.7.1.99) e a [piruvato desidrogenase (lipoamida)] fosfatase (EC 3.1.3.43). A quinase encontra-se fortemente ligada a  $E_2$  e co-purifica com o complexo, enquanto que a fosfatase se associa de uma forma fraca (Teague et al., 1982), ligando-se a  $E_2$  na presença de  $Ca^{2+}$  (Pettit et al., 1972, citado por Teague et al., 1982). Como o complexo piruvato desidrogenase e suas duas enzimas regulatórias estão localizados no compartimento membrana interna/matriz mitocondrial, alterações nas concentrações de  $Ca^{2+}$  livre intramitocondrial podem desempenhar um papel importante na

regulação da atividade da piruvato desidrogenase; porém, essa relação ainda não está estabelecida (Teague et al., 1982).

A oxidação do piruvato pelo complexo piruvato desidrogenase é um ponto chave na regulação do metabolismo dos carboidratos como um todo e diferentes mecanismos ocorrem entre os organismos. Em E. coli, os componentes  $E_2$  e  $E_3$  são regulados alostericamente, sendo  $E_2$  inibido pela acetil CoA e ativado pela CoA e  $E_3$  inibido por ATP e NADH e ativado por AMP e  $NAD^+$ . A carga de energia do adenilato e as taxas  $NAD^+/NADH$  controlam, assim, a atividade de  $E_3$ . O estado de energia líquido da célula afeta diretamente a produção de acetil CoA e, assim, a taxa do ciclo do ácido cítrico (Rawn, 1989). Em mamíferos, além do mecanismo alostérico, a atividade da piruvato desidrogenase é também regulada por modificação covalente, mais especificamente por um mecanismo de fosforilação reversível (Roche & Cate, 1977; Yeman et al., 1978; Weller, 1979; Kresze & Ronft, 1980; Reed & Pettit, 1981 e 1984; Randle et al., 1981; Teague et al., 1982; Tzagoloff, 1982; Dahl et al., 1987; Rawn, 1989). Uma consequência desse tipo de regulação é que quando o pool de ATP intramitocondrial é alto, isto é, sob condições de fosforilação oxidativa intensa, a atividade do complexo piruvato desidrogenase é suprimida e, quando baixo, a utilização oxidativa do piruvato é alimentada pela ativação do complexo (Tzagoloff, 1982). Nenhuma evidência foi, inicialmente, encontrada para a fosforilação do complexo piruvato desidrogenase de levedura, quer em extratos brutos

quer em preparações purificadas (Kresze & Ronft, 1981a), o que parecia ser uma exceção em organismos eucariotos. Posteriormente, no entanto, foi demonstrado que o complexo purificado de levedura sofre fosforilação e inativação na presença de ATP-Mg e piruvato desidrogenase quinase purificada de rim bovino, bem como desfosforilação e reativação na presença de piruvato desidrogenase fosfatase purificada e  $Mg^{2+}$  (Uhlinger et al., 1986). A organização e as massas moleculares das subunidades do complexo de levedura são similares aos de mamíferos e virtualmente idênticos aos de bactérias gram-positivas, mas diferem significativamente dos complexos de bactérias gram-negativas (Kresze & Ronft, 1981b).

**Piruvato descarboxilase**, PDC, a enzima objeto de estudo do presente trabalho, é distinta do componente  $E_1$  do complexo piruvato desidrogenase, também conhecido como piruvato descarboxilase. Ao contrário do referido por Green (1987), a enzima é classificada pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica para Nomenclatura e Classificação de Reações Catalisadas por Enzimas (1984) como EC 4.1.1.1, sendo, portanto, uma carboxi-liase; já o componente  $E_1$  se encontra entre as oxidorreduases que atuam em grupos aldeído ou oxo como doadores de hidrogênio ou elétron tendo um composto de dissulfeto como acceptor (EC 1.2.4.1). O próprio Green publicou, posteriormente, um artigo (Green, 1989) em que, através de um estudo de homologia de seqüências protéicas por computador (programa FASTP), conclui que piruvato descarboxilase é semelhante à acetolactato sintetase

(produto do gene ILV 2 de S. cerevisiae), uma enzima da via altamente conservada da biossíntese de isoleucina-valina, e não à subunidade E<sub>1</sub> da piruvato desidrogenase.

A perda do grupo carboxila do piruvato por ação de PDC é uma simples descarboxilação e não envolve a sua oxidação líquida. A reação é irreversível e a enzima requer  $Mg^{2+}$  e uma coenzima fortemente ligada, tiamina pirofosfato, TPP, para sua atividade. O grupo ceto do piruvato se liga covalentemente ao anel tiazólico da coenzima por adição nucleofílica. Em seguida,  $CO_2$  é liberado, sendo o intermediário da descarboxilação, 2( $\alpha$ -lactil)TPP, estabilizado por ressonância. A protonação do aducto descarboxilado substrato-enzima, freqüentemente referido como "aldeído ativo", forma, então, hidroxietil-TPP. Finalmente, a recomposição da ligação carbonila no substrato fornece a força motriz para a dissolução da ligação carbono-carbono entre substrato e coenzima. Acetaldeído é produzido e a forma aniônica de TPP é regenerada (Apêndice C).

Holzer et al. (1963) registram que piruvato descarboxilase foi descoberta em levedura por Neuberg & Karczag em 1911, tendo sido demonstrado por Auhagen, em 1932, que a mesma requer uma coenzima, cuja estrutura foi elucidada por Lohmann & Schuster, em 1937, como sendo a da tiamina pirofosfato (TPP). Os autores citam ainda que, além do TPP, a enzima requer  $Mg^{2+}$  como cofator.

PDC de levedura se comporta como uma enzima alostérica. A forma sigmoideal da curva velocidade de reação x concentração

de substrato indica que sua atividade catalítica é regulada pelo substrato (Boiteux & Hess, 1970; Hübner et al., 1978; Schellenberger & Hübner, 1978), tendo-se demonstrado que, na ausência do ativador, a enzima é potencialmente inativa (Hübner & Schellenberger, 1986). Para PDC de Zymomonas mobilis, uma cinética normal de Michaelis-Menten foi relatada (Neale et al., 1987).

Pelo número de sítios de ligação do TPP estimado (Ullrich et al., 1966), quatro cadeias polipeptídicas de PDC foram previstas, cada uma contendo um sítio ativo. Inicialmente, porém, estudos de desnaturação em cloreto de guanidina 6 M resultaram na formação de subunidades que migram na ultracentrífuga como um pico único e simétrico de massa molecular que corresponde à metade daquele da proteína intacta, indicando que a enzima consiste de duas subunidades em vez das quatro esperadas (Ullrich & Kempfle, 1969). Isso foi reforçado pela demonstração de que, em pH alcalino, a enzima se dissocia em subunidades com metade da massa molecular, as quais, na presença de TPP e  $Mg^{2+}$ , reconstituem a holoenzima dimérica ativa de mesma massa molecular que a nativa original (Gounaris et al., 1971). Tratamento com uréia não dissocia a enzima em subunidades, mas a desnatura quase irreversivelmente e cliva parcialmente o TPP (Ullrich et al., 1966). Através de PAGE-SDS, no entanto, a enzima se dissocia em subunidades correspondentes a um quarto do peso original. Isso demonstra que a enzima é, na realidade, um tetrâmero ou um "dímero de dímeros" (Hopmann, 1980) e sugere que a

associação de cada par de dímeros se dá por interações hidrofóbicas (forças de van der Waals), o que está de acordo com a não dissociação em pH alcalino. Na associação dos dímeros para formação do tetrâmero ativo, interações outras, tais como associação de dipolos de resíduos de cadeias laterais, pontes de hidrogênio ou interações eletrostáticas, devem estar envolvidas. Sendo uma proteína citoplasmática, fazendo parte, portanto, de um ambiente redutor, a participação de pontes de dissulfeto na estrutura nativa não é esperada, o que foi comprovado por Brauner & Ullrich (1972).

O presente estudo é parte de um programa de determinação dos mecanismos de regulação de PDC de levedura em desenvolvimento no Imperial College of Science, Technology and Medicine - Universidade de Londres (Lancashire et al., 1981; Cheung, 1985; Green, 1987; Wright et al., 1989) e teve como objetivo primordial contribuir para a elucidação da sua estrutura através da análise direta da enzima.

Para eliminar dúvidas na interpretação dos resultados relacionadas ao polimorfismo genético, uma linhagem haplóide de levedura, Saccharomyces cerevisiae MC 16, foi utilizada. Sua multiplicação ficou ao encargo da planta piloto do Imperial College, que seguiu, inicialmente, sua metodologia de rotina. Numa primeira tentativa de purificar a enzima, no entanto, alguns problemas foram detectados.

Em primeiro lugar, o meio utilizado era à base de extrato de levedura, peptona e dextrose (YEPD), suplementado com adenina, pois a linhagem usada é deficiente para essa base.

Embora excelente para o crescimento de levedura e amplamente empregado em trabalhos de microbiologia, bioquímica e genética, tal meio não é adequado quando se tem em vista a purificação de proteínas outras que não proteases. Isso porque, tendo como fonte de nitrogênio a peptona, a levedura é induzida a produzir proteases a fim de hidrolizá-la a peptídeos e aminoácidos assimiláveis pela célula. As proteases, todavia, terão um efeito nefasto durante a purificação e estocagem da enzima de interesse. Pringle (1975) discute o problema de artefatos proteolíticos em estudos de enzimas e outras proteínas de leveduras e apresenta um ampla lista de casos conhecidos, inclusive com piruvato descarboxilase, que pode ser tanto inativada como modificada por proteases. Zehender et al. (1987) relataram que, diante da impossibilidade de uma análise química detalhada de PDC de levedura devido à ação incontrollável de proteinases contaminantes, optaram pela investigação da enzima de germen de trigo como alternativa prática.

Assim sendo, no presente trabalho, a peptona foi substituída por sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Tiamina foi introduzida de modo a garantir que PDC não fosse limitada pela sua coenzima. Sais minerais foram também adicionados. As concentrações de todos esses nutrientes seguiram a formulação de uma base de nitrogênio para testes de assimilação de carbono por leveduras dos Laboratórios Difco, segundo Kreger-Van Rij (1984). Embora o extrato de levedura seja fonte de vitaminas, a quantidade de tiamina



fornecida, 3µg/g numa análise típica (Difco Laboratories/UK Division, comunicação pessoal), equivale a apenas 7,5% da recomendada, quando 1% de extrato de levedura é usado no meio de cultura. As concentrações de glicose, extrato de levedura e sulfato de adenina foram mantidas como no meio de uso corrente pelo laboratório e pela planta piloto.

Outro problema relativo à multiplicação da levedura diz respeito à aeração. Nas fermentações previamente realizadas pela planta piloto, o processo transcorria em anaerobiose para direcionar o metabolismo para a via de produção de etanol e, conseqüentemente, favorecer a síntese de PDC. Contudo, oxigênio molecular é essencial à síntese de ergosterol (Andreasen & Stier, 1953; Proudlock et al., 1968; Nes et al., 1978; Kirsop, 1982), estando este envolvido na ciclização do esqualeno e subsequente desmetilação do lanosterol (Parks, 1978). O ergosterol, que é o esterol predominante em fungos, podendo constituir até 10% do peso seco celular, se encontra em dois "pools": como esterol livre, disponível para a biossíntese de membrana, e como éster de esteril, ou seja, esterol esterificado por ácidos graxos de cadeia longa, que é estocado em gotículas de lipídios no citossol. Sua biossíntese é um processo dispendioso para a célula; envolve pelo menos 25 reações e requer 10 moléculas de ATP e 16 de NADPH por molécula de ergosterol formada, sem contar com os 12 equivalentes de ATP necessários à transmetilação para o C-24 da cadeia lateral (Rodriguez et al., 1985). Em geral, os esteróis têm sido

vistos como componentes estruturais de membranas, servindo como moduladores da sua fluidez para evitar alterações drásticas com as flutuações das condições ambientais (Demel & De Kruffy, 1976). Uma segunda função, mais específica, foi sugerida em Mycoplasma capricolum (Dahl et al., 1981) e, posteriormente, confirmada em Saccharomyces cerevisiae (Ramgopal & Bloch, 1983). Essa função envolve a regulação do consumo de ácidos graxos insaturados e, portanto, a síntese de fosfolipídios, a qual pode estar coordenadamente controlada com a biossíntese de proteínas.

Assim sendo, experimentos preliminares visando determinar as condições adequadas a uma boa produção de PDC em fermentador e estabelecer métodos que garantissem sua estabilidade durante a estocagem foram necessários.

Durante a purificação, três formas da enzima separáveis por cromatografia de troca iônica foram isoladas. Essa subdivisão em múltiplos picos, fato também observado por outros pesquisadores (Katsumata et al., 1969; Gounaris et al., 1971; Ludewig & Schellenberger, 1974), levou à formulação das seguintes hipóteses:

- 1) **Dissociação tetrâmero-dímero/holoenzima-apoenzima** - PDC existiria na célula como uma proteína dimérica e durante a purificação, devido à condição de concentração, assumiria a forma tetramérica, sendo essa uma interação fraca de dímeros; a dissociação seria rápida e a reassociação lenta.

Estudos de dissociação mostraram que o tetrâmero de PDC

está associado via duas formas distintas de interação de subunidade; tratamento alcalino causa dissociação em dois dímeros de massas moleculares idênticas com simultânea liberação dos cofatores TPP e  $Mg^{+2}$ ; posterior dissociação a monômeros ocorre apenas após desnaturação irreversível com agentes desnaturantes fortes, tais como SDS e hidrocloreto de guanidina 6M (Gounaris et al., 1971 e 1975; Schellenbenger e Hübner, 1978; Hopmann, 1980; Ullrich, 1982). Através de uma análise com fontes de radiação de alto brilho, König et al.(1992) verificaram que, na faixa de pH 6,8-8,3, soluções de PDC com concentrações de 2-3mg/ml consistem de um equilíbrio entre tetrâmeros e dímeros, o qual só é deslocado para um dos oligômeros nos extremos da faixa de pH; em pH 6,2 só existem tetrâmeros enquanto que em pH 8,4 as soluções consistem puramente de dímeros. Os autores citam que esses resultados foram recentemente confirmados por ultracentrifugação por Hübner et al.(dados não publicados) e propõem que, no citossol, um acúmulo de piruvato deve resultar numa redução do pH, deslocando o equilíbrio para a forma tetramérica — única cataliticamente ativa —, constituindo-se num mecanismo de regulação de PDC ao nível molecular. As condições de purificação da enzima utilizadas nesta tese, pH 6,3, permitem, assim, que essa hipótese seja descartada a priori.

2) **Fosforilação reversível** - PDC seria uma enzima regulada por fosforilação reversível e, portanto, duas formas da enzima (fosforilada e desfosforilada) seriam esperadas.

A fosforilação reversível é um mecanismo de modificação pós-tradução de grande importância no controle de processos celulares e pode estar relacionada com as múltiplas formas cromatográficas de PDC. Proteínas reguladas por esse tipo de mecanismo são amplamente encontradas tanto em procariotos como em eucariotos (Roche & Cate, 1977; Yeman et al., 1978; Reed & Pettit, 1981; Teague et al., 1982; Randle et al., 1981 e 1984; Strålfors & Belfrage, 1984; Pilkis et al., 1984; Fugisawa et al., 1984; Kuehn, 1984; Rose & Jacob, 1984; Nimmo, 1984; Dahl et al., 1987). Em leveduras, as enzimas frutose 1,6-bifosfatase, glutamato desidrogenase NAD-dependente e piruvato desidrogenase podem ser citadas. (Holzer, 1984; Hemmings, 1984; Uhlinger et al., 1986). Para a própria PDC, uma recente análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear revelou duas fosfoserinas por tetrâmero; quanto ao papel da fosforilação da enzima, porém, evidências indicaram o não envolvimento no processo catalítico ou sua regulação (Hübner et al., 1992).

3) **Proteólise** - PDC seria um tetrâmero formado de subunidades idênticas,  $\alpha$ , que, sob ação proteolítica, quer por um mecanismo fisiológico quer por um artefato de purificação, originaria  $\alpha'$  com liberação de um pequeno peptídeo, de modo que o processo não seria perceptível por métodos de determinação de massa molecular como filtração em gel e PAGE-SDS.

Proteólise seletiva é um mecanismo de regulação metabólica, colocando as proteases como mediadores de processos fisiológicos. É o caso da ativação de zimogênios, de proteínas nascentes e de pré-neuropeptídios. Nesses processos, está implícita uma ação limitada de uma protease para gerar uma molécula que é resistente à posterior proteólise; daí a expressão "proteólise limitada" frequentemente empregada. Proteinases envolvidas em tais reações regulatórias foram isoladas por Wolf (1984), citado por Zimmermann (1985), a partir de mutantes de levedura deficientes para as proteinases A e B e as carboxipeptidases Y e S, estando as proteinases residuais relacionadas, por exemplo, com o processamento do fator alfa. Foi ainda relatado por Holzer (1984), citado por Zimmermann (1985), que frutose 1,6-bifosfatase é rapidamente inativada quando glicose é adicionada a células de levedura em crescimento numa fonte de carbono que requer a gluconeogênese, sendo a inativação iniciada por fosforilação reversível, seguida de clivagem proteolítica. Uma excelente revisão sobre o assunto foi publicada em 1987 por Bond & Beynon.

Proteólise tem-se também apresentado como um sério problema durante tentativas de se isolarem e/ou caracterizarem proteínas de levedura. A ação de proteases sobre a proteína de interesse pode levar a perdas de atividade, o que tem sido observado em muitos estudos de proteínas de levedura. Quando ocorre simplesmente inativação, sem produção de formas ativas modificadas, pode-se considerar

o artefato proteolítico como benigno. Em muitos casos, porém, formas parcialmente degradadas, mas ainda ativas, são produzidas. Em alguns casos, as formas nativas e as modificadas são vistas como aparentes isoenzimas, enquanto que em outros a forma nativa pode desaparecer completamente. A modificação, mesmo de uma pequena proporção da proteína total, pode levar a resultados bastante confusos como, por exemplo, parâmetros catalíticos ou perfis isoenzimáticos. Modificações que ocorrem com pouca ou nenhuma perda de atividade são particularmente perigosas como artefatos proteolíticos, pois, sendo relativamente difíceis de se detectar, podem levar ao estudo de uma forma da proteína que não existe na célula e, portanto, a conclusões imprecisas sobre as suas funções biológicas.

Na maioria dos casos, o padrão de digestão de proteínas nativas por proteases é do tipo "tudo ou nada", pois a clivagem da primeira ligação peptídica reduz a flexibilidade de toda a estrutura. Nesses casos, a taxa de perda de atividade de uma enzima na presença de uma protease, por exemplo, é uma maneira simples de se distinguir uma flexibilidade conformacional reversível de uma desnaturação irreversível. Muitas proteínas, especialmente as destinadas a sobreviver num ambiente extracelular hostil, são notavelmente resistentes à proteólise porque suas estruturas terciárias são rígidas (ex.: subtilisina); porém, algumas podem ser seletivamente clivadas por proteases com nenhum efeito sobre a atividade e pouco sobre a estabilidade.

A contaminação de preparações altamente purificadas de PDC pela protease A e pelo precursor inativo da protease B foi relatada, havendo indicações de que protease A degrada PDC sem alterar sua taxa de atividade, enquanto que protease B parece agir seletivamente de tal forma que PDC perde sua capacidade de clivar o 2-hidroxietil TPP, mas retém sua atividade na formação do complexo (Juni & Heym, 1968). Protease A é uma endopeptidase de levedura de massa molecular 60000 D e ponto isoelétrico em torno de 3,7; a enzima é estável em pH 5-6, em temperatura de até 50°C, insensível ao EDTA, PCMB, DFP e PMSF e sensível à pepstatina (Pringle, 1975). A inibição exercida pela pepstatina é pH dependente; máxima inibição é observada em pH 5; em pH 3 e pH 7, uma inibição completa não é obtida, mesmo na presença de excesso do inibidor (Magni et al., 1982). Protease B é também uma endopeptidase de levedura, de massa molecular de cerca de 82000 D e ponto isoelétrico em torno de 5; a enzima é ativa em pH 4,8-10, não é afetada por EDTA, mas pode ser completamente inibida por PCMB, DFP e PMSF (Pringle, 1975).

A ação de endopeptidases pode ser facilmente percebida pelo surgimento de polipeptídios de baixa massa molecular em géis de eletroforese em condições desnaturantes (PAGE-SDS). Degradações extensivas, após adição de SDS, foram observadas em proteínas de levedura altamente purificadas, a maioria das quais aparentemente teria sobrevivido, numa forma mais ou menos intacta, aos processos de purificação e de manuseio como proteínas nativas (Pringle, 1975).

A ação de exopeptidases, contudo, embora também sendo freqüentemente acelerada por tratamento desnaturante, tem seus efeitos mais dificilmente detectáveis, a menos que os aminoácidos terminais da cadeia peptídica sejam examinados ou um método para determinação da massa molecular capaz de detectar a perda de um único aminoácido seja empregado.

**4) Diferentes subunidades/isoenzimas** - PDC seria um tetrâmero formado por subunidades distintas.

A estrutura das subunidades que formam o tetrâmero de PDC é uma questão bastante controversa. Tanto um como dois tipos de subunidades ou duas diferentes isoenzimas têm sido descritos (Gounaris et al., 1971; Ludewig et al., 1974; Hübner et al., 1975; Hopmann, 1980; Ullrich, 1982; Schellenberger, 1982; Sieber et al., 1983; Zehender & Ullrich, 1985; Kuo et al., 1986).

Uma única banda de cerca de 60 KD é, geralmente, observada em PAGE-SDS (Gounaris et al., 1975; Green, 1987). Embora duas bandas monoméricas tenham sido observadas por alguns autores (Hopmann, 1980; Ullrich, 1982; Sieber et al., 1983; Zehender & Ullrich, 1985; Kuo et al., 1986), é possível que a de menor massa molecular tenha se originado por proteólise da maior, quer fisiologicamente, quer como um artefato de purificação. Além disso, como leveduras de cervejaria de ploidia desconhecida foram utilizadas nesses estudos, a possibilidade de um polimorfismo genético não pode ser descartada. A maioria das linhagens de S. cerevisiae cultivadas em



laboratório é haplóide ou diplóide, porém linhagens industriais são predominantemente diplóides ou poliplóides (Pretorius & Westhuizen, 1991). Zehender & Ullrich (1985) sugeriram que a composição de aminoácidos das duas bandas é compatível com proteólise, enquanto que Kuo et al. (1986) mostraram que as duas formas se associam in vivo originando uma enzima plenamente ativa. Essas informações foram consideradas por Wright et al. (1989) como suficientes para a conclusão de que, pelo menos em leveduras de cervejaria, subunidades distintas se associam para formar PDC com uma conformação  $\alpha_2\beta_2$ ; porém, de acordo com Green (1987), os dados apresentados não são conclusivos.

A dúvida com relação a uma estrutura  $\alpha_2\beta_2$  para PDC é reforçada por estudos com linhagens de leveduras haplóides. Schmitt & Zimmermann (1982) identificaram mutantes defectivos para a atividade da enzima, os quais caíram em dois grupos de complementação, PDC 1 e PDC 2. O gene PDC 1 foi clonado (Schmitt et al., 1983), seqüenciado (Kellermann et al., 1986) e sua expressão e regulação têm sido bastante estudadas (Green, 1987; Butler & McConnell, 1988; Kellermann & Hollenberger, 1988; Candy et al., 1991). As seguintes evidências indicaram que PDC 2 não é um gene estrutural: 1. os alelos pdc 2, ao contrário dos mutantes pdc 1, não mostraram o fenótipo de dominância parcial esperado para mutações do gene estrutural; 2. os extratos do mutante pdc 2 não apresentaram qualquer diferença cinética em relação à ligação do piruvato ou do TPP; em contraste, ambos os alelos hipo-

mórficos de pdc 1 (pdc 1-14 e pdc 1-30) mostraram afinidade por TPP alterada; 3. o gene PDC 2 clonado hibridizou com um mRNA de concentração muito baixa para codificar um segundo gene estrutural. Um possível papel para PDC 2 a nível de pós-transcrição foi proposto por Schmitt et al. (1983).

Se, por um lado, o aumento da atividade de PDC em decorrência de uma superprodução de PDC 1 clonado num plasmídeo de alto número de cópias (Schmitt et al. 1983) indica a existência de apenas um gene estrutural, por outro lado, a hibridação de PDC 1 a uma segunda seqüência, classificada como um pseudogene, no genoma de levedura (Schmitt et al., 1983; Seehaus et al., 1985) revela a possibilidade de um segundo gene estrutural. Numa análise preliminar, por espectrometria de massa, de PDC purificada a partir de uma linhagem haplóide (Cheung, 1985), apenas metade dos peptídios produzidos por proteólise com tripsina e brometo de cianogênio correspondeu ao produto do gene PDC 1 previsto a partir da seqüência de nucleotídios (Kellermann et al., 1986). A outra metade poderia, assim, ser codificada por um segundo gene estrutural e, nesse caso, poder-se-ia esperar que os alelos pdc 1 isolados por Schmitt & Zimmermann (1982) representassem dois loci gênicos em vez de um. Isso foi investigado por Wright et al. (1989) que demonstraram que a mutação pdc 1-30 não é alélica nem com pdc 1-8 e pdc 1-14, nem com pdc 2-122 e, portanto, identificaram um terceiro gene, **PDC 3**, tendo o mutante pdc 1-30 passado a ser designado pdc 3-30. O gene PDC 3 foi clonado e caracterizado pelos

autores, mas o tamanho, a quantidade e a regulação de seu transcrito indicaram que é improvável tratar-se de um segundo gene estrutural para PDC, tendo sido sugerido um papel ou na regulação de um gene estrutural ainda não descoberto ou na modificação pós-tradução da enzima.

Outro fragmento de DNA, envolvido na expressão de PDC 1, denominado **PDC 4** foi clonado por complementação de mutantes *pdc* por Seehaus (1986), citado por Seeboth et al. (1990). Estudos de deleção do gene estrutural PDC 1 (Schaaf et al., 1989) revelaram um fenótipo completamente diferente dos obtidos por Schmitt & Zimmermann (1982) através de mutações de ponto. Enquanto os mutantes *pdc 1* apresentaram semidominância e um, inclusive, completa inibição do crescimento em glicose e nenhuma atividade específica de PDC detectável *in vitro* (*pdc 1-8*), a deleção de grande parte da região codificadora de PDC 1 levou a mutantes capazes de fermentar glicose com quase metade da atividade específica da enzima em comparação com a linhagem selvagem. Além disso, um mRNA do mesmo tamanho que o transcrito a partir de PDC 1 foi encontrado nesses mutantes. Os autores concluíram que a sequência homóloga a PDC 1, e inicialmente descrita como um pseudogene, funciona também como um gene estrutural para piruvato descarboxilase e que a enzima pode ser composta de duas subunidades ligeiramente diferentes. Resultados similares foram obtidos por Seeboth et al. (1990) através de um experimento de substituição gênica onde, por deleção, o gene PDC 1 foi substituído pelo da  $\beta$ -lactamase. O mutante *pdc 1*<sup>o</sup>

foi capaz de crescer em glicose e exibiu 60 a 70% da atividade de PDC da linhagem selvagem. Os autores demonstraram que o efeito se deve a uma expressão aumentada de **PDC 5**, um segundo gene estrutural homólogo a PDC 1 e fracamente expresso na linhagem selvagem. A deleção de PDC 5 não tem efeito na atividade específica de PDC, porém mutantes duplos *pdc 1° pdc 5°* não apresentam atividade enzimática detectável, indicando que os genes para PDC parecem estar sobre autorregulação ao nível de transcrição (Hohmann & Cederberg, 1990).

Um terceiro gene estrutural para PDC em *S. cerevisiae* homólogo a PDC 1, **PDC 6**, foi descrito por Hohmann (1991). O gene parece não contribuir para a atividade total de PDC da célula durante o crescimento em glicose, uma vez que o duplo mutante obtido por deleção de PDC 1 e PDC 5, embora possuindo PDC 6, não apresentou atividade enzimática detectável e nenhum mRNA para PDC 6 foi encontrado em tais células. Além disso, sua deleção não acarretou queda de atividade no tipo selvagem ou em quaisquer das combinações de mutações para PDC. Por outro lado, PDC 6 funcionou como um gene estrutural para PDC em mutantes derivados da linhagem *pdc 1° pdc 5°* nos quais PDC 6 foi duplicado sob o controle do promotor PDC 1. Esses mutantes fermentam glicose e apresentam atividade para PDC mostrando que PDC 6 é, de fato, um gene estrutural para a enzima.

Em resumo, PDC 1 codifica para a principal isoenzima de PDC; PDC 5 pode ser necessário para que a enzima atinja sua plena atividade em determinadas condições, provavelmente

durante a germinação de esporos; e PDC 6 parece contribuir para a atividade total, principalmente durante o crescimento em fontes de carbono não fermentescíveis (Hohmann, 1991).

O seqüenciamento, pelo menos parcial, das três proteínas isoladas neste trabalho, permitiria a correlação com as seqüências previstas e forneceria a prova definitiva de suas correspondências a cadeias polipeptídicas idênticas ou distintas.

Na investigação das hipóteses levantadas como origem das três formas de PDC isoladas cromatograficamente neste trabalho, a estimativa da massa molecular por PAGE-SDS e filtração em gel, a determinação do ponto isoelétrico, bem como a análise do comportamento em géis de eletroforese em condições desnaturante e nativa, podem fornecer informações úteis. Entretanto, a análise da estrutura primária e a determinação precisa da massa molecular por espectrometria de massa se apresentam como uma abordagem ideal.

A espectrometria de massa tem desempenhado um importante papel na determinação da estrutura de biomoléculas a partir da década de setenta devido a alguns princípios fundamentais peculiares à técnica, quais sejam: (1) **sensibilidade:** é o mais sensível dos métodos aplicados à elucidação de estrutura ou à quantificação, sendo aplicável rotineiramente a quantidades de amostra da ordem de microgramas ou, em casos favoráveis, de picogramas; o progresso na física de geração, análise e detecção de massa de íons pode, eventualmente, levar à sensibilidade máxima de geração, análise e detecção

de um único íon, sendo que a detecção já é uma realidade; (2) **especificidade:** como o método fornece uma medida físico-química exata (massa com uma precisão de cinco casas decimais, por exemplo), sua especificidade é incomparavelmente superior a de outras "sondas de estrutura" amplamente utilizadas, tais como o radioimunoensaio; (3) **pureza da amostra:** não requer amostras puras, o que é uma vantagem única sobre métodos químicos clássicos ou espectroscópicos de elucidação de estrutura (Morris, 1980). Vale ainda ressaltar que a técnica é aplicável a todos os elementos, uma vez que massa é uma das duas qualidades fundamentais na física que caracterizam a matéria em geral, sendo a outra a frequência, que é também amplamente utilizada para propósitos analíticos em técnicas de espectroscopia (ultravioleta, infravermelho, Raman, microondas, raio x e ressonância magnética nuclear) (Brunnée, 1982).

Para a geração de informação de sequência de aminoácidos em peptídios e proteínas, o método mais usado até o início da década de oitenta foi a espectrometria de massa por impacto eletrônico, EI-MS. Esse método, porém, apresenta algumas desvantagens, quais sejam: (a) necessidade de derivatização das amostras a seus derivados voláteis N-acetil permetil; (b) necessidade de quantidades relativamente grandes de amostra (superiores a 5 nanomols); (c) desprovimento de íons moleculares num espectro EI típico devido à alta energia interna a eles transferida.

A introdução do bombardeamento por átomos acelerados como

um método de ionização da amostra, FAB-MS, em 1981, por Barber e colaboradores, deu uma significativa contribuição à área de análise estrutural de biopolímeros (Barber et al., 1981; Morris et al., 1981; Williams et al., 1982). A técnica se aplica a substâncias polares ou termolábeis, sem prévia derivatização (como acetilação/permetilação). Isso elimina uma etapa tediosa e consumidora de tempo e material na conversão a derivados suficientemente voláteis para serem ionizados por impacto eletrônico ou ionização química; possíveis efeitos colaterais relacionados com a modificação da estrutura básica, o que dificulta a interpretação do espectro, são também evitados. A dessorção de plasma, PD, e a de campo, FD, foram também aplicadas na década de setenta; porém, no primeiro caso, um equipamento especial é requerido (Biemann, 1988) e, no último, dificuldades relacionadas ao preparo da amostra (Morris, 1982a), à instabilidade do espectro (König et al., 1983) e à falta de fragmentação lógica (Morris, 1982b) reduzem bastante seus valores no seqüenciamento de peptídios como técnicas de rotina. FAB-MS, por sua vez, é uma técnica simples, tanto com relação à adaptabilidade aos espectrômetros de massa disponíveis como quanto ao procedimento. A amostra é aplicada num solvente adequado (100mM HCl, MeOH, por exemplo) a uma matriz de glicerol/tioglicerol ou mono-nitrobenzil álcool (MNBA) num alvo metálico e bombardeada com um feixe de átomos (argônio, xenônio ou césio) acelerados. Assim, é ionizada pela colisão com átomos e feixes de íons de longa vida são gerados e

analisados quanto às suas massas (Morris, 1982a e b). Em combinação com a espectrometria de massa de alto campo, HF-MS, métodos para a determinação da massa molecular de peptídios cada vez maiores foram sendo desenvolvidos (Dell & Morris, 1982; Barber et al., 1982 e 1983; Buko et al., 1983 a e b; Bateman et al., 1985). Assim, hoje, massas moleculares na faixa de 10 a 15 KD podem ser obtidas com os espectrômetros de massa comercialmente disponíveis (Chatterjee, 1989). Muitos biopolímeros de interesse, no entanto, ultrapassam consideravelmente essa faixa de massa. O conceito de "Mapeamento-FAB", que descreve o exame ou a triagem de digestos e subdigestos protéicos (químicos ou enzimáticos) pelo procedimento HF-MS no modo FAB, foi introduzido em 1983 especificamente para lidar com questões de estrutura de grandes biopolímeros, incluindo enzimas, receptores e proteínas recombinantes (Morris et al., 1983). O conceito foi aplicado a uma gama de importantes biopolímeros, tais como peptídio relacionado com o gene da calcitonina humana (Morris et al., 1984), insulina (Morris & Pucci, 1985), apolipoproteína B (Knott et al., 1985 e 1986), proteína transportadora de glicose (Mueckler et al., 1985; Cairns et al., 1987), antitrombina "Northwick Park" (Erdjument et al., 1987 e 1988),  $\alpha_1$ -antitripsina (Greer et al., 1988) e proteína de ligação do cálcio sarcoplasmático (Aubagnac et al., 1988).

O mapeamento-FAB envolve uma combinação de técnicas químicas e/ou enzimáticas para a geração de pequenos



peptídios dentro de uma faixa de massa compatível com a resolução do espectrômetro de massa utilizado. Em muitos casos, a conformação tridimensional de uma proteína impede, estericamente, a aproximação de uma molécula das dimensões de uma enzima e, portanto, sítios de clivagem potenciais no interior do substrato protéico permanecem inacessíveis, o que resulta em proteólise limitada. Por outro lado, os efeitos do impedimento estérico sobre a aproximação de uma molécula pequena, tal como o brometo de cianogênio (CNBr), não são, usualmente, significantes. Assim, empregando-se condições experimentais apropriadas, ligações específicas podem ser quimicamente clivadas em fragmentos peptídicos grandes, com menos estruturas secundária e terciária, adequados à proteólise enzimática. A mistura do digesto resultante é, então, analisada por FAB-MS, sendo o espectro de massa obtido denominado "Mapa-FAB". Um mapa-FAB típico contém uma série de sinais de intensidade variável. Os sinais de massa,  $[M + H]^+$ , devem corresponder a peptídios derivados da amostra, os quais podem ser mapeados na estrutura antecipada, se conhecida, demonstrando se a seqüência primária está correta. Quanto maior a proteína mais complexo é o mapa dos vários sinais de massa na seqüência; em tais casos, um programa de computador pode ser empregado (M-Scan Ltd., Ascot, UK, & R. Mc Dowell, Imperial College of Science, Technology and Medicine, Londres, UK). Esse programa consiste de duas seções principais, sendo um banco de dados para seqüências protéicas e um programa de busca. A seqüência

protéica em análise é estocada no banco de dados e o programa de busca é capaz de localizar peptídios ao longo da sequência protéica com base nas suas massas moleculares. Para cada valor de massa, freqüentemente existe uma série de seqüências, derivadas da seqüência prevista. Entretanto, conhecendo-se a especificidade do digesto (por exemplo, resíduos de lisina ou arginina são esperados em peptídios gerados por digestão tríptica), muitas das possibilidades de seqüência podem ser descartadas por não satisfazerem às condições de digestão. As identidades dos sinais são, subseqüentemente, validadas por manipulações química e enzimática do digesto, seguidas de mapas-FAB adicionais após cada tratamento. Os sinais do primeiro mapa-FAB devem se deslocar de uma forma previsível. Deslocamentos de massa inesperados, freqüentemente, indicam modificações pós-tradução, as quais, às vezes, podem ser deduzidas pelo valor numérico da diferença de massa. Assim, o N-terminal dos diversos fragmentos peptídicos pode ser acessado por um ou dois passos da degradação subtrativa de Edman. Da mesma forma, o C-terminal pode ser confirmado pela digestão com carboxipeptidase B, CpB, uma enzima muito útil para uso em combinação com a tripsina por ser específica para clivar apenas resíduos de arginina e lisina C-terminais. Uma comparação do mapa-FAB tríptico com o produzido após subdigestão por CpB identifica o C-terminal da proteína, pois o peptídio correspondente não apresenta deslocamento de massa, a menos que o aminoácido dessa região seja lisina ou

arginina.

Outras digestões, tais como as efetuadas pela protease V8 e pela quimotripsina, podem fornecer dados de interesse para o mapeamento. A primeira é uma enzima extracelular, isolada de Staphylococcus aureus, específica para clivagem no lado C-terminal de ligações peptídicas dos resíduos dos ácidos glutâmico e aspártico; as condições da reação podem, ainda, ser ajustadas para a clivagem em apenas um dos aminoácidos. A última é uma enzima específica para clivagem no lado C-terminal de ligações peptídicas de triptofano, tirosina, fenilalanina e leucina, embora outros resíduos possam também ser hidrolisados numa taxa mais lenta.

O bombardeamento de moléculas por átomos acelerados é um processo suave de ionização que não produz fragmentação, resultando num espectro de massa contendo apenas íons moleculares, o que é tomado como uma vantagem no mapeamento-FAB, pois misturas complexas podem ser examinadas diretamente sem receio de que o espectro se torne não interpretável. Como a probabilidade de dois peptídios de qualquer digesto de uma proteína terem a mesma massa molecular é baixa, o mapa-FAB é um diagnóstico preciso, determinado pela presença ou ausência de certos componentes peptídicos, da fidelidade da sequência derivada do gene. Como visto, cada íon identificado no espectro pode ser confirmado por manipulação química ou enzimática da mistura do digesto numa forma previsível. Mutações de ponto são geralmente visualizadas como deslocamentos de massa, cujos valores numéricos revelam a

identidade do aminoácido substituinte. O seqüenciamento do DNA é um processo rápido de elucidação da estrutura de grandes proteínas, porém a identificação positiva de códons de iniciação, terminação e introns requer comparação com seqüências de aminoácidos de modo a evitar uma má interpretação da região codificada do DNA. Uma seqüência de aminoácidos sem terminação, às vezes sem sentido, pode ser derivada simplesmente pela omissão ou identificação incorreta de uma única base durante a leitura da seqüência do DNA. A observação incorreta de um códon de terminação é uma segunda causa de erro.

Em relação a outros métodos de seqüenciamento, o mapeamento-FAB apresenta a vantagem de permitir uma rápida confirmação ou correlação com alta sensibilidade de qualquer estrutura primária antecipada (Morris, 1982; Biemann, 1982 e 1988; Mueckler et al., 1985; Biemann & Martin, 1987; Greer et al., 1988). Outrossim, a detecção de mecanismos de modificação pós-tradução - como bloqueio do N- ou do C-terminais, processamento proteolítico, pontes de dissulfeto, glicosilação ou fosforilação - a partir da seqüência do DNA é impossível. Tais mecanismos são identificados pelo mapeamento-FAB (Williams et al., 1982; Robb et al., 1983; Naik et al., 1985; Morris & Pucci, 1985; Eckart, 1986; Eckart et al., 1986; Biemann & Martin, 1987; Erdjument et al., 1987; Greer & Morris, 1987).

Embora tenha sido relatado que o N-terminal de PDC é um resíduo de histidina (Gounaris et al., 1975), tentativas de

seqüenciá-lo utilizando as formas isoladas neste trabalho, quer pelo procedimento manual de Edman-dansil (Edman, 1956; Gray & Hartley, 1963), quer pela degradação de Edman em seqüenciador de fase gasosa automático, foram ineficazes; os sintomas clássicos de um N-terminal bloqueado, ou seja, nenhum sinal para PTH-aminoácido no primeiro ciclo, mas múltiplos sinais gradualmente aparecendo nos ciclos seguintes, foram revelados, fato este já constatado anteriormente por Cheung (1985). Assim, a estratégia do mapeamento-FAB foi selecionada como um método altamente adequado à análise da seqüência primária da enzima PDC. A técnica é também aplicável a proteínas de seqüências desconhecidas, com ênfase na elucidação de seqüências peptídicas curtas, tipicamente seis a doze resíduos de aminoácidos, para a produção de sondas de oligonucleotídeos sintéticos com vistas à triagem de bancos genômicos. Peptídios contendo resíduos de metionina e de triptofano são mais adequados à geração de sondas, pois, ao contrário de outros aminoácidos, não possuem códons degenerados. Resíduos de metionina, em geral, ocorrem com pouca freqüência em proteínas; portanto, a clivagem com brometo de cianogênio, além de produzir peptídios contendo metionina, apresenta a vantagem de gerar grandes fragmentos peptídicos com estruturas secundária e terciária reduzidas, os quais podem ser posteriormente digeridos com enzimas.

É interessante observar que o mesmo fato que torna o mapeamento-FAB vantajoso na análise de misturas complexas, ou

seja, o baixo grau de fragmentação, é a principal limitação do método com relação à obtenção de informações de sequência que permitam a elucidação da estrutura de proteínas de sequências desconhecidas. A purificação dos peptídios da mistura do digesto por métodos como HPLC, com identificação de cada peptídio isolado por espectrometria de massa complementada por métodos clássicos de sequenciamento de proteínas, tais como degradação de Edman em sequenciador de fase gasosa automático, é imprescindível, sendo a etapa limitante na velocidade do sequenciamento. Em geral, pequenos peptídios (menos de dez aminoácidos) dão um número razoável de íons de fragmento, mas o grau de fragmentação cai com o aumento do tamanho (Biemann & Martin, 1987) e, em alguns casos, mesmo com pequenos peptídios, nenhuma fragmentação é obtida (Morris et al., 1981). O uso de uma matriz química, freqüentemente, mascara a informação de íons de fragmentos na região de baixa massa (Johnson et al., 1987a; Tomer et al., 1988b). Tais íons são mais prontamente observados quando se usa uma quantidade relativamente grande (5-100µg de um peptídio puro), enquanto que, em misturas ou em baixos níveis, são obtidos principalmente íons parentais (Biemann & Martin, 1987). Além disso, no caso de misturas, as relações íons parentais/íons filhos, fundamentais para a elucidação da estrutura, são de difícil estabelecimento (Tomer et al., 1988b).

Logo após a introdução da técnica FAB-MS, a demonstração por Morris et al. (1981) de que a fragmentação de peptídios e

carboidratos é mínima levou os autores à investigação da aplicação de varredura ligada B/E usando um gás de colisão para aumentar a produção de íons de fragmentos. Os primeiros resultados, no entanto, foram desencorajadores, pois grandes quantidades de amostra (mais de 10nmols) foram necessárias e os dados do espectro B/E-CAD, mesmo para peptídios relativamente pequenos, foram de baixa intensidade e com pouca informação de seqüência; além disso, limitações do próprio instrumento, na época, tornaram o método não atrativo para o estudo potencial de peptídios de alta massa ou misturas de peptídios (Morris et al., 1989). Revendo as características do espectrômetro de massa de alto campo de dois setores ZAB-2SE (manufaturado pela VG Analytical Ltd. Manchester, UK), tanto em relação à sensibilidade, como à melhoria do software para computador, que toma a média da soma de varreduras ("Multi-Channel Acquisition mode-MCA"), os autores decidiram reavaliar o potencial da varredura ligada em estudos de seqüenciamento de biopolímeros. A técnica foi, assim, selecionada para, juntamente com o mapeamento-FAB, investigar possíveis diferenças nas seqüências das três formas da proteína isoladas e correlacioná-las com as derivadas dos genes PDC 1, PDC 5 e PDC 6.

Neste trabalho, a espectrometria de massa foi ainda utilizada como um método preciso e altamente sensível para a determinação da massa molecular de PDC. Em geral, estimativas da massa molecular de proteínas grandes são obtidas por filtração em gel ou por PAGE-SDS usando uma curva de calibração obtida a partir de uma série de proteínas de massa molecular conhecida. Esses métodos, no entanto, além de

fornecerem apenas valores aproximados, devem ser aplicados com cautela, pois comportamentos anômalos podem ser observados (Haschemeyer & Haschemeyer, 1973; Sano et al., 1976; Hames, 1981). O método clássico da velocidade de sedimentação, embora preciso, depende da determinação cuidadosa de parâmetros físico-químicos (densidade e viscosidade do solvente e volume específico parcial da proteína em relação à água a 20°C), o que o torna laborioso e exige a habilidade de um técnico altamente qualificado, além de requerer uma ultracentrífuga analítica, instrumento que se encontra disponível em poucos laboratórios do mundo.

A determinação da massa molecular por espectrometria de massa tem-se estendido a biopolímeros de alta massa molecular com base na ionização por eletrospray, ESI. A técnica foi introduzida por Dole et al. (1968), porém só tomou impulso na década de oitenta, após os trabalhos de Yamashita & Fenn (1984), Whitehouse et al. (1985) e outros.

Uma técnica de determinação da massa molecular simples, rápida e precisa tem um grande impacto no campo da análise estrutural de biopolímeros. Assim, por exemplo, uma sequência derivada de um gene pode ser rapidamente checada para deleções, inserções ou modificações pós-tradução. No caso particular de PDC, uma determinação precisa da massa molecular das três formas isoladas neste trabalho é de grande valia para uma correlação com as sequências derivadas dos genes, bem como para uma estimativa do grau de diferenciação das sequências das formas isoladas.



## M A T E R I A L E M É T O D O S

### MICRORGANISMO UTILIZADO

Saccharomyces cerevisiae MC16 MAT $\alpha$  leu2-3 his4-712<sup>fs</sup> ade2-1 lys2-1 SUF2 (fonte: Beggs, 1978).

### EFEITO DA AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE PDC

Dois experimentos foram realizados em fermentador de 10 l, sendo um em aerobiose por 10 horas seguida de anaerobiose pelas 10 horas subseqüentes e o outro em anaerobiose durante toda a fermentação.

#### 1. Condições de cultivo

Com exceção da aerobiose e da anaerobiose, mantidas por borbulhamento de ar a 2 vvm e desligamento do ar, respectivamente, ambos os experimentos foram desenvolvidos em condições idênticas, quais sejam:

**Meio de cultura:** 10% glicose; 1% extrato de levedura; 0,5% sulfato de amônio; 0,005% sulfato de adenina; 0,4mg/l hidrocloreto de tiamina; 0,05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,01% CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,01% NaCl; água destilada q.s.p. 8 l. A glicose foi dissolvida em 4 l de água e autoclavada separadamente para evitar caramelização e os demais componentes do meio,

exceto a tiamina, foram dissolvidos nos 4 l restantes e autoclavados. Para a tiamina, tomou-se 1,6ml de uma solução 0,2% esterilizada por filtração.

**pH:** não controlado

**Temperatura:** 30°C

**Agitação:** 600 rpm

**Inóculo:** 10% de uma cultura contendo  $1,5-2 \times 10^7$  células/ml crescidas por uma noite em frascos agitados em meio idêntico ao usado no fermentador.

As fermentações foram acompanhadas pela determinação, a cada duas horas, dos seguintes parâmetros:

- número total de células
- percentagem de células em brotamento
- densidade celular
- consumo de açúcar
- produção de etanol
- teor de proteína total
- atividade enzimática

Amostras foram coletadas assepticamente em intervalos de duas horas. Para os três primeiros parâmetros, o crescimento foi paralisado pela adição de uma parte de formaldeído concentrado (37-40%) a nove partes da cultura (Pringle & Mor, 1975). Essas amostras foram mantidas a 4°C até o final da fermentação, quando foram analisadas. Para os demais parâmetros, foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi mantido a -20°C para obtenção do extrato bruto para análise de proteína total e da atividade enzimática.

## 2. Preparo do extrato bruto

O pellet foi lavado em água destilada para remoção de resíduos de meio de cultura e recentrifugado, descartando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o novo pellet em tampão fosfato de potássio 20mM pH 7, contendo 1mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 $\mu$ M TPP, 0,1mM PMSF, 10<sup>-3</sup>mM pepstatina A (Sigma P4265) e 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma M 6250). Para o preparo da solução de pepstatina A, dissolver inicialmente em bicarbonato de amônio 0,1M e só então completar o volume com água. PMSF se hidrolisa rapidamente e, assim, a solução deve ser preparada em isopropanol e adicionada ao tampão imediatamente antes de seu uso. A quantidade de tampão usada foi a suficiente para se obter uma concentração de  $\sim 2 \times 10^8$  células/ml, que é considerada ótima para obtenção de extrato (Green, 1987). Portanto, a quantidade de amostra coletada e o volume de tampão dependeram da fase de crescimento. Assim, no início da fermentação ( $\sim 2-5 \times 10^6$  células/ml) foram coletados 200ml de amostra e o pellet foi ressuspensão em 2-5ml de tampão; na fase exponencial ( $0,5-2 \times 10^7$  células/ml) foram também coletados 100ml de amostra, porém foram usados 2,5-10ml de tampão; e na fase estacionária ( $0,5-2 \times 10^8$  células/ml), 10ml de amostra e 2,5-10ml de tampão. Aliquotas de 1ml dessas suspensões de células foram transferidas para tubos de centrífuga Sterelin de 10ml, fundo cônico e tampa rosqueada, contendo 3g de pérolas de vidro de 0,4-0,5mm de diâmetro (Jencons Nº 8 Ballontini) tratadas com ácido. Na prática,

pode-se considerar que dois tubos de Eppendorf de 0,7ml cheios equivalem a aproximadamente 3g de pérolas. Os tubos contendo 1ml de suspensão de células + 3g de pérolas foram, então, colocados num equipamento, especialmente idealizado para a produção de extratos de levedura (Green, 1987), dispostos numa câmara fria (4°C), onde foram submetidos à agitação máxima por 2 minutos para rompimento das células.

O equipamento de Green (Apêndice D) é uma adaptação de um agitador de tubo de uso comum em laboratório. Para tal, a borracha onde o tubo se apóia foi removida e um béquer de polipropileno de 600ml foi aparafusado em seu lugar. Uma placa de poliestireno de 4cm de espessura e com diâmetro equivalente ao do béquer foi inserida no mesmo e perfurada, de modo a se obterem orifícios que acomodassem perfeitamente os tubos. O equipamento foi fixado a um pedestal passando-se uma fita gomada em volta do béquer e uma tampa foi adaptada para evitar o movimento dos tubos para fora com a vibração.

Após rompimento das células, as pérolas de vidro foram centrifugadas em centrífuga de bancada a 2000g por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para tubo de Eppendorf de 1,5ml e clarificado em microcentrífuga a 4°C, velocidade máxima, por 15 minutos. O sobrenadante límpido (extrato bruto) foi transferido para outro tubo de Eppendorf e usado para a determinação de proteína total e atividade de PDC.

### 3. Métodos Analíticos

#### 3.1. Número total de células e percentagem de células em brotamento

Células totais e em brotamento foram contadas em câmara de Neubauer melhorada a partir do hematocímetro Spencer (French & Hebert, 1980).

A câmara de Neubauer apresenta dois raiados quadrados de  $9\text{mm}^2$  de área e 0,1mm de profundidade, cada um dos quais divididos em 9 quadrados principais de  $1\text{mm}^2$ . Cada quadrado principal central é subdividido em 25 quadrados secundários de 0,2mm de lado, os quais são, por sua vez, subdivididos em 16 quadrados menores de 0,05mm de lado.

As células foram contadas em todo o quadrado principal central, para o que as culturas, que tiveram seus crescimentos paralisados por formaldeído, foram diluídas de forma a se obter cerca de 200 a 400 células, o que corresponde a  $2-4 \times 10^6$  células/ml, certificando-se de que as células se apresentavam uniformemente distribuídas. Com esse critério, obteve-se um coeficiente de variação de, no máximo, 10%. Considerando-se que o desvio padrão de uma contagem, devido unicamente a efeitos estatísticos, é igual à raiz quadrada do número de células contadas (Berkson et al., 1940), pode-se deduzir que suspensões muito diluídas levam a uma maior margem de erro. Suspensões muito concentradas, por outro lado, apresentam problema de agregamento das células,

aumentando também a margem de erro. Uma célula com um broto foi contada como uma única célula até que a citocinese ocorresse e mãe e filha fossem fisiologicamente separadas, de acordo com critério de Pringle & Mor (1975).

O número de células por mililitro foi obtido considerando-se que a área contada ( $1\text{mm}^2$ ), com uma profundidade de  $0,1\text{mm}$ , corresponde a um volume de  $0,1\text{mm}^3$ .

Assim:  $0,1\text{mm}^3$  - x células

$1000\text{mm}^3$  (1 ml) - y

$$y = 10^4 x$$

O valor obtido teve, ainda, que ser multiplicado pelo fator de diluição, que inclui a diluição feita na adição de formaldeído (1:10) e a efetuada para a contagem.

Portanto:  $\text{n}^\circ \text{ células/ml} = 10^4 x.f$  ,

onde: x =  $\text{n}^\circ$  de células contadas em todo o quadrado principal central

f = fator de diluição

Cada contagem foi realizada em duplicata. As células em brotamento foram expressas como percentagem do número total de células.

### 3.2. Densidade celular

A densidade celular foi medida pela absorbância a  $600\text{nm}$ . Foram testados, como brancos, os sobrenadantes obtidos pela centrifugação das culturas, porém as diluições usadas foram

tão elevadas (1:5 a 1:500) que suas absorbâncias foram nulas. Assim, foi usada água destilada como branco. O peso seco foi calculado, a partir da  $A_{600}$ , pela equação derivada de dados apresentados por Pringle & Mor (1975):  $y = 0,16371x - 0,03156$ ;  $r^2 = 0,99991$ .

### 3.3. Consumo de açúcar

Açúcares redutores foram determinados espectrofotometricamente pelo método fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956): 1ml de soluções padrões, amostras e água destilada (branco) foi colocado em tubos de ensaio de 16-20 x 150 mm; 50µl de fenol a 80% em peso (preparado pela adição de 20g de água destilada a 80g de fenol grau reagente, redestilado) foram adicionados e, em seguida, 5ml de ácido sulfúrico (95,5%, densidade 1,84) com pipeta de escoamento rápido (cortada no bico) e diretamente no líquido. Os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos, agitados e colocados em banho-maria a 25-30°C por 10 a 20 minutos.

A curva padrão foi determinada a partir de uma solução estoque de 1mg/ml de glicose. Soluções contendo 10-70µg/ml foram preparadas, de modo que na mistura final obteve-se 10-70µg/6ml ou 1,67-11,67µg/ml.

A leitura foi feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-240 a 490nm.

### 3.4. Produção de etanol

Etanol foi determinado por cromatografia gás-líquida, usando um cromatógrafo Philips PU 4500 equipado com detector de ionização de chama e coluna de vidro medindo 1,5m de comprimento e 3,5mm de diâmetro interno, empacotada com Poropak a 80-100 mesh (Waters associates, Inc. Milford, Mass.). A coluna foi operada isotermicamente a 180°C, tendo as temperaturas do injetor e do detector sido ajustadas para 225°C e 250°C, respectivamente. A chama foi mantida com uma mistura de ar e hidrogênio com fluxos fixos de 240ml/min. e 40ml/min., respectivamente. O gás de arraste (N<sub>2</sub>) teve seu fluxo mantido em 40ml/min. Foi usado n-propanol como padrão interno; assim, a solução padrão continha: 1ml etanol 5% e 50µl n-propanol, enquanto que a amostra continha: 1ml sobrenadante (obtido por centrifugação da cultura a 4000 rpm por 5 minutos) e 50µl n-propanol. Alíquotas de 1µl foram usadas para injeção, tendo cada amostra sido analisada em triplicata; o padrão foi também corrido em triplicata para obtenção de um fator de resposta médio. As áreas dos picos cromatográficos foram calculadas por meio de um computador integrador Shimadzu Chromatopac C-R 3 A. A concentração de etanol na amostra foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$[\text{etoh}]_a = \frac{[\text{etoh}]_p / A_{(\text{etoh})p}}{(n\text{-propanol})_p / A_{(n\text{-propanol})p}} \cdot \frac{[n\text{-propanol}]_a}{A_{(n\text{-propanol})a}} \cdot A_{(\text{etoh})a}$$



onde:

$[\text{etoh}]_a$  = concentração de etanol na amostra

$[\text{etoh}]_p$  = concentração de etanol na solução padrão

$A_{(\text{etoh})a}$  = área do etanol na amostra

$A_{(\text{etoh})p}$  = área do etanol na solução padrão

$[\text{n-propanol}]_a$  = concentração de n-propanol na amostra

$[\text{n-propanol}]_p$  = concentração de n-propanol na solução padrão

$A(\text{n-propanol})_a$  = área do n-propanol na amostra

$A(\text{n-propanol})_p$  = área do n-propanol na solução padrão

Sendo  $[\text{n-propanol}]_a = [\text{n-propanol}]_p$ , a fórmula pode ser simplificada a:

$$[\text{etoh}]_a = \frac{[\text{etoh}]_p}{A_{(\text{etoh})p}} \cdot A_{(\text{n-propanol})p} \cdot \frac{A_{(\text{etoh})a}}{A_{(\text{n-propanol})a}},$$

onde o termo  $\frac{[\text{etoh}]_p}{A_{(\text{etoh})p}} \cdot A_{(\text{n-propanol})p}$  corresponde ao fator de

resposta, o qual é multiplicado pela relação das áreas dos picos do etanol e do padrão interno obtida para cada amostra, determinando-se, assim, a concentração de etanol na amostra.

### 3.5. Proteína total

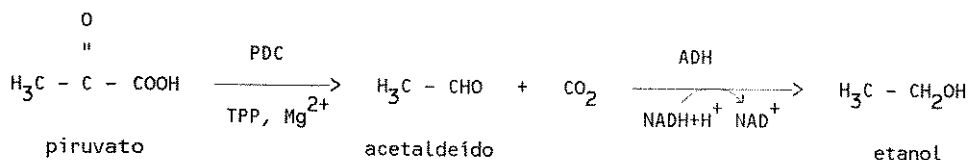
Proteína total foi determinada pela mudança do pico de absorção de uma solução ácida de azul brilhante de Coomassie G-250 de 465nm para 595nm, quando o corante se liga à proteína. Este método tem sido bastante utilizado por ser sensível, rápido e, pelo menos, tão preciso quanto o de Lowry

(Scopes, 1982). O problema de adsorção do corante à cubeta foi eliminado pelo uso de cubetas descartáveis. O método utilizado foi o recomendado pelos Laboratórios Bio Rad (1981), que consiste em uma adaptação do descrito originalmente por Bradford (1976), tendo-se seguido o procedimento micro: 0,8ml de soluções padrões, amostras adequadamente diluídas e tampão (branco) foram colocados em tubos de ensaio e 0,2ml de reagente corante concentrado [azul brilhante de Coomassie G-250 a 0,05% (p/v), etanol a 23,5% (p/v), e ácido fosfórico a 42,5% (p/v)] foram adicionados; homogenizou-se, evitando formação de espuma; após 5 a 20 minutos, fez-se a leitura de  $A_{595}$  contra o branco reagente.

Como proteína padrão foi usada albumina de soro bovino. Partindo de uma solução estoque de 1mg/ml, foi obtida uma solução 0,1mg/ml e, a partir desta, foram preparadas soluções de modo a fornecerem de 1 a 10µg/ml na mistura final da reação. Os padrões foram preparados no mesmo tampão usado para as amostras, qual seja: 20mM  $K_3PO_4$  pH 7; 1mM  $MgSO_4$ ; 10µM TPP; 0,1mM PMSF;  $10^{-4}$ mM pepstatina A; e 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol.

### 3.6. Ensaio enzimático

A atividade de PDC foi determinada pelo método de Ullrich (1970), que consiste no acoplamento da reação desta enzima a da álcool desidrogenase (ADH), como segue:



A pré-incubação com TPP e  $\text{Mg}^{2+}$  garante a saturação de PDC pelos seus cofatores. A redução do acetaldeído a etanol é monitorada pelo desaparecimento de  $\text{NADH+H}^+$  (que absorve fortemente a 340nm) à medida que é oxidado a  $\text{NAD}^+$  (o qual não apresenta absorção a 340nm). A queda de absorbância a 340nm foi acompanhada por 3 minutos num espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-240, equipado com unidade de programa opcional modelo OPI-2 e impressora gráfica UV-240, seguindo-se o procedimento para ensaio de velocidade com tempo "lag" de 5 segundos e intervalo de 18 segundos, dando dez leituras num período de 3 minutos; as diferenças entre cada leitura e a imediatamente anterior devem ser constantes, indicando que uma cinética de primeira ordem está sendo analisada; isso é comprovado pelo registro do gráfico que deve ser uma linha reta. A quantidade de enzima utilizada no ensaio foi ajustada, tanto na mistura de pré-incubação, como na de reação, de tal forma que a inclinação da reta formasse um ângulo de aproximadamente  $45^\circ$ , sempre que possível. A mistura de pré-incubação, preparada em tubos de Eppendorf de 1,5ml, conteve, num total de 1ml: 0,1ml 20mM TPP (Boehringer mannheim nº 133051); 0,1ml 20mM  $\text{MgSO}_4$  e 0,8ml solução enzimática (xµl enzima + xµl 0,2M tampão citrato pH 6,0). A pré-incubação foi realizada à temperatura ambiente por 30

minutos. A mistura de reação, preparada diretamente na cubeta, constou de: 0,1ml 1M piruvato de sódio (Boehringer mannheim nº 128147); 0,1ml 0,5mg/ml álcool desidrogenase 400 U/mg (de levedura, liofilizada, Boehringer mannheim nº 102717); 2,7ml solução de enzima (xµl enzima pré-incubada + xµl 0,2M tampão citrato pH 6,0); volume total: 3ml. O espectrofotômetro foi zerado com a cubeta de reação e uma cubeta de referência contendo: 0,1ml 1M piruvato de sódio; 0,1ml 0,5mg/ml ADH-400U/mg e 2,8ml 0,2M tampão citrato pH 6,0. A reação foi iniciada com a adição de 0,1ml 5mM NADH (sal dissódico, Sigma nº N8129) à cubeta de reação. Cubetas de plástico descartáveis foram utilizadas. As soluções de TPP, piruvato, ADH e NADHNa<sub>2</sub> foram sempre preparadas no dia de uso e mantidas no gelo até o momento do ensaio. O tampão foi conservado a 4°C, sendo deixado à temperatura ambiente no dia de uso, de modo que o ensaio enzimático fosse realizado à temperatura ambiente (em torno de 25°C).

O cálculo para a atividade enzimática foi efetuado pela fórmula:

$$\text{Atividade enzimática (U/ml)} = \frac{A_{340}/\text{min.}}{E_{340}} \cdot f ,$$

onde:

$A_{340}/\text{min.}$  = decréscimo de absorbância a 340nm por minuto

$E_{340}$  = coeficiente de extinção milimolar a 340nm para NADH = 6,22cm<sup>2</sup>/µmol

f = fator de diluição

#### 4. Análise dos dados de crescimento

Os seguintes conceitos e fórmulas foram utilizados para a análise dos dados em termos dos diversos parâmetros de crescimento (Pirt, 1975; Sukatsch & Dziengel, 1987; Orlowski & Barford, 1987):

##### 4.1. Taxa específica de crescimento ( $\mu$ )

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{\Delta t}$$

4.2. Fator de conversão substrato-biomassa ( $Y_{x/s}$ ) - definido como a relação entre a biomassa ou massa celular produzida (peso seco) e a massa de substrato consumida. Expresso em  $g.g^{-1}$  ou  $g.mol^{-1}$ .

$$Y_{x/s} = dx/ds$$

4.3. Fator de conversão substrato-produto ( $Y_{p/s}$ ) - relação entre a massa de produto formada e a massa de substrato consumida. Expresso em  $g.g^{-1}$  ou  $g.mol^{-1}$  ou  $U.mol^{-1}$ , conforme o produto.

$$Y_{p/s} = dp/ds$$

4.4. Quociente metabólico ou taxa metabólica específica para utilização de substrato ( $q_s$ ). Expresso em  $mol.(gh)^{-1}$

$$q_s = \frac{1}{x} \frac{ds}{dt}$$

4.5. Quociente metabólico ou taxa metabólica específica para formação de produto ( $q_p$ ). Expresso em  $\text{mol.}(\text{gh})^{-1}$  ou  $\text{mg.}(\text{gh})^{-1}$  ou  $\text{U.}(\text{gh})^{-1}$ , dependendo do produto.

$$q_p = Y_{p/x} \cdot \mu \quad , \quad \text{onde:} \quad Y_{p/x} = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}}$$

4.6. Quociente de Pasteur ( $P_Q$ ) - relação entre as taxas volumétricas de consumo de substrato em condições aeróbica e anaeróbica.

$$P_Q = \frac{Q_{s.a}}{Q_{s.an}} \quad ,$$

onde:

$$Q_s = \frac{ds}{dt} \quad (\text{expresso em } \text{g.}(\text{lh})^{-1})$$

$Q_{s.a}$  = taxa volumétrica de consumo de substrato em condições aeróbicas

$Q_{s.an}$  = taxa volumétrica de consumo de substrato em condições anaeróbicas

$P_Q = 1$  indica que não existe nenhum efeito regulatório com relação ao oxigênio

A fase exponencial, em termos de consumo de açúcar, produção de biomassa (peso seco) e produção de metabólitos (etanol, proteína e PDC), foi determinada pela equação geral:

$$x = x_0 e^{\mu \Delta t} \quad ,$$

onde  $\mu$  e  $x_0$  são calculados através da linearização da mesma, ou seja:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu \Delta t$$

O programa para a linearização, incluindo o coeficiente de determinação, está apresentado no Apêndice E.

## ESTABILIDADE DE PDC EM DIFERENTES MÉTODOS DE ESTOCAGEM

A estabilidade da enzima PDC foi testada em seis métodos de estocagem, quais sejam: 1. a 4°C; 2. a -20°C; 3. a -70°C; 4. em 50% glicerol a -20°C; 5. em 50% glicerol a -70°C; e 6. em 75% sulfato de amônio a 4°C.

Para tal, foram utilizados os extratos brutos preparados nos experimentos de fermentação, tendo-se distribuído 1ml de cada extrato (de 2 em 2 horas), para cada método de estocagem, em tubo de Eppendorf.

A avaliação foi realizada após um mês, através da comparação da atividade enzimática com a observada no momento da estocagem.

O experimento foi também realizado com amostras da coluna DEAE-Sephacel, penúltima etapa de purificação da enzima, a qual foi estocada no próprio tampão usado na purificação, qual seja: tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, contendo os cofatores tiamina pirofosfato (10 $\mu$ M) e magnésio (1mM MgSO<sub>4</sub>), os agentes antiproteolíticos: PMSF (0,1mM) e pepstatina A (10<sup>-4</sup>mM) e o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (5mM).

## PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PDC

### 1. Preparo do inóculo, fermentação e coleta e rompimento das células

O inóculo foi preparado no dia anterior ao da fermentação através da transferência de uma alçada de cultura de levedura, crescida em placa YEPD durante uma noite, para frascos agitados (incubadora com agitação tipo giratória, 250 rpm, 30°C). A multiplicação foi feita em escala progressiva, partindo-se de 2 x 100ml de meio em frascos de Erlenmeyer de 500ml para 2 x 250ml em frascos de 1 l, seguindo-se 15 x 150ml em frascos de 500ml e, por fim, 8 x 1,5 l em frascos Kitasato de 4 l, de forma a se obterem 12 l de inóculo com uma concentração celular em torno de  $2 \times 10^7$  células/ml a ser usado em fermentadores de 60 l (capacidade útil). Todo o processo em frascos, até o momento da inoculação em dois fermentadores de 60 l, levou 33 horas. O meio de cultura utilizado para o preparo do inóculo e fermentação foi idêntico ao descrito nos experimentos de otimização da produção da enzima.

A fermentação, realizada em aerobiose, foi acompanhada pela contagem de células em câmara de Neubauer, para o que amostras foram coletadas de hora em hora, paralisando-se o crescimento pela adição de formaldeído (1ml do composto para 9ml de cultura). Quando o número de células atingiu  $1-2 \times 10^8$  células/ml, a fermentação foi interrompida.



As células foram colhidas pela passagem em centrífuga de fluxo contínuo (Sharples Equipment Division, Warminster, Pa.) até que o centrifugado se apresentou límpido. Em seguida, foram lavadas, para remoção de resíduos de meio de cultura, em água destilada a 4°C e recentrifugadas.

A pasta de células (1,6kg) foi ressuspensa em 2 volumes, por peso (ou seja, 3,2 l) de tampão fosfato 20mM, pH 7, a 4°C, obtido a partir de uma solução estoque 1M (26,537g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 53,125g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  para 1 l de água Milli Q), contendo 1mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 $\mu$ M TPP, 0,1mM PMSF, 0,1 $\mu$ M pepstatina A e 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol. Para o sulfato de magnésio, usou-se uma solução estoque de 2M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , enquanto que, para a tiamina pirofosfato, uma solução de 20mM, preparada sempre no dia de uso. Para o PMSF, partiu-se de uma solução estoque de 0,1M em isopropanol, enquanto que, para a pepstatina A, uma solução estoque de 1mM foi preparada dissolvendo-se o peptídeo em 0,1M bicarbonato de amônio até, no máximo, 20% do volume final, o qual foi completado com água Milli Q, após completa dissolução. Sendo o PMSF instável em solução aquosa, só foi adicionado ao tampão imediatamente antes de seu uso. Após ressuspensão, as células foram rompidas por três passagens em homogeneizador Manton-Gaulin (Manton-Gaulin Mfg.Co., Inc., Everett, Mass.) a uma pressão de 8000 lb/pol<sup>2</sup>. Entre cada passagem, o material foi colocado em câmara fria para manter a temperatura o mais próximo possível de 4°C. A fermentação e a coleta e rompimento das células foram executados na planta piloto do Departamento de Bioquímica e do Centro de

Biotecnologia do Imperial College, tendo a purificação da enzima sido efetuada no Laboratório de Química de Proteína do Centro de Biotecnologia.

## 2. Purificação de PDC

Toda a purificação da enzima foi realizada a 4°C. Os tampões utilizados foram pré-resfriados e as etapas de precipitação, diálise, cromatografia (inclusive empacotamento das colunas) e concentração por ultrafiltração, executadas em câmara fria.

Cada etapa foi monitorada pela determinação do teor de proteína total e da atividade enzimática. Nas etapas iniciais, isto é, até o fracionamento por sulfato de amônio, o teor protéico foi determinado pelo método dos Laboratórios Bio-Rad, conforme descrito anteriormente; nas cromatográficas, esse parâmetro foi acompanhado pela absorbância a 280nm, considerando-se que 1 Unidade de  $A_{280} \approx 1\text{mg}$  de proteína. A atividade enzimática foi determinada pelo ensaio descrito anteriormente. A formação do gradiente de tampão durante a eluição das colunas de troca iônica foi verificada pela medida da condutividade e posterior conversão à molaridade pela relação linear obtida.

A suspensão de células (~ 5 l), processada pela liberação da enzima, foi centrifugada a 9000 rpm, por 30 minutos, em centrífugas Sorval equipadas com rotores G53 e com temperatura regulada para 4°C. O pellet foi descartado e o **extrato**

**bruto** (~ 3,9 l) submetido à **precipitação por sulfato de estreptomicina** (Sigma S9137), para remoção dos ácidos nucleicos, usando-se 2,5g do sal do antibiótico por g de ácidos nucleicos numa solução de 30-40% em água Milli Q recém-preparada (Linn & Lehman, 1965). O teor de ácidos nucleicos foi estimado pela relação entre medidas de absorbância a 280 e 260nm, de acordo com a monografia de Adams (Califórnia Corporation for Biochemical Research), que se baseia nos coeficientes de extinção para enolase e ácidos nucleicos apresentados por Warburg & Christian (1942). Nos 3,9 l de extrato bruto, cerca de 30g de ácidos nucleicos foram encontrados, tendo-se usado, então, 75g de sulfato de estreptomicina em 200ml (q.s.p.) de água. A suspensão foi centrifugada a 9000 rpm por 1 hora, o pellet descartado e o sobrenadante submetido ao **fracionamento por sulfato de amônio**.

Sulfato de amônio, com baixo teor de metais pesados, especialmente preparado para uso em enzimologia (BDH), foi adicionado lentamente, com agitação suave, até uma concentração final de 45% (277g/l). Após dissolução completa do sal, a suspensão foi agitada suavemente por 1 hora. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação a 9000 rpm por 1 hora. O pellet foi descartado e mais sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante até uma concentração de 75% (206g/l). Como no primeiro fracionamento, a suspensão, após completa dissolução do sal, foi agitada suavemente por 1 hora e, em seguida, centrifugada a 9000 rpm por 1 hora. Nesse caso, porém, a enzima de interesse foi precipitada e,

portanto, o sobrenadante descartado e o pellet usado para as etapas seguintes da purificação.

O pellet (327g) foi ressuspenso em 2 volumes (654ml) de tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, mais aditivos, anteriormente citados. O volume foi completado para 1 l e a suspensão submetida à **diálise** em tubo de 6cm de diâmetro previamente tratado, como segue: 1. ebulição por 10 minutos em 2% bicarbonato de sódio + 1mM EDTA; 2. enxaguada em água Milli Q; 3. ebulição por mais 10 minutos em 1mM EDTA; 4. após resfriamento, lavagem por várias vezes em água Milli Q; os tubos, assim tratados, foram conservados em água Milli Q num recipiente de plástico, hermeticamente fechado, a 4°C. A suspensão protéica foi, então, dialisada, para liberação do sulfato de amônio, contra 90 l de tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, mais aditivos, distribuídos em 6 lotes de 15 l, que foram trocados duas vezes por dia. O tampão foi sempre preparado no momento de cada troca, usando água previamente resfriada a 4°C, para garantir a plena atividade dos agentes antiproteolíticos empregados. Como precaução extra, após cada 24 horas de diálise, adicionou-se 1 ml de 0,1M PMSF, 0,2ml de 0,5mM pepstatina A e 0,35ml de  $\beta$ -mercapto-etanol diretamente à suspensão protéica.

Após diálise, quando a condutividade da suspensão protéica foi praticamente igualada à do tampão, procedeu-se a uma centrifugação a 9000 rpm por 30 minutos, para remoção das proteínas precipitadas durante a diálise, seguida de filtração em lã de vidro, para remoção de lipídios.

A partir de então, a purificação se deu via três etapas cromatográficas (Figuras 3 e 4), quais sejam:

#### **Cromatografia de troca iônica em resina DE 52**

DE 52 é uma resina de troca aniônica, desenvolvida pela Whatman, na qual grupos dietilaminoetil estão ligados a um material de celulose microcristalino, apresentada na forma úmida, pré-inchada (Scopes, 1982). A resina foi empacotada em coluna Pharmacia K 50/60 (50mm de diâmetro interno x 60cm de comprimento) com um leito de 880ml, equilibrada com tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3 (contendo 1mM  $\text{MgSO}_4$ , 10 $\mu\text{M}$  TPP, 0,1mM PMSF, 10<sup>-4</sup>mM pepstatina A e 5mM  $\beta$ -mercapto-etanol). Após introdução da amostra (1,4 l), a coluna foi lavada com 4 l do tampão para remover as proteínas não adsorvidas. A eluição foi realizada com um gradiente linear de 10-100mM do mesmo tampão, tendo sido utilizado um volume total de 10 l, sendo 5 l de 10mM e 5 l de 100mM, dispostos em dois béqueres especiais situados exatamente no mesmo nível, com uma comunicação na base através de tubo de silicone, o qual foi bloqueado até o momento da eluição. O béquer com o tampão de 10mM, mantido agitado por uma barra magnética, continha uma saída na base, diametralmente oposta à comunicação entre os dois béqueres, a qual foi conectada ao topo da coluna através de uma bomba peristáltica para microtubo (Eyela, Rikakikai Ltd., Tokio) regulada para 190ml/h. Esse fluxo foi mantido desde a etapa em que a coluna

foi equilibrada; segundo o fabricante, a resina permite fluxos de 5 a 90cm/h e, portanto, de 98-1767ml/h para uma coluna de 5cm de diâmetro interno. A base da coluna, por sua vez, foi conectada a um coletor de frações LKB 2211, programado para coletar 300 frações de 25ml, tendo sido selecionado o modo de coleta por tempo. As frações que apresentaram atividade para PDC dentro de um mesmo pico cromatográfico formaram um pool, tem sido **dialisadas** contra tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3 mais aditivos, até atingir o equilíbrio; usaram-se 7,5 l de tampão, os quais foram trocados por mais 7,5 l, após cerca de 7 horas. Os dois picos obtidos, designados A e B, perfizeram um volume de 575 e 485ml, respectivamente, e foram tratados separadamente nas etapas posteriores de purificação. Antes de serem submetidas a uma nova cromatografia, as amostras foram filtradas em lã de vidro para remoção de qualquer vestígio de proteína precipitada, passível de causar danos à coluna.

### **Cromatografia de troca iônica em resina DEAE-Sephacel**

DEAE-Sephacel é também uma resina de troca aniônica, porém os grupos dietilaminoetil estão acoplados a um material de celulose melhorado, de forma esférica, proporcionando uma maior resolução (Scopes, 1982). Essa resina, desenvolvida pela Pharmacia, é também apresentada na forma úmida, pré-inchada, e foi empacotada em coluna Pharmacia K 26/40 (26mm de diâmetro interno x 40cm de comprimento) com um leito de 190ml, equilibrada como descrito para a coluna DE-52. Duas

dessas colunas foram corridas paralelamente, em condições idênticas, sendo uma para cada pico obtido na coluna anterior. Os volumes das amostras introduzidas foram de 575ml e 485ml para os picos A e B, respectivamente. As colunas foram lavadas com cerca de 4 volumes de tampão 10mM e, em seguida, eluídas com um gradiente linear formado por 750ml de tampão 10mM e 750ml de tampão 100mM, conforme descrito para a coluna DE-52. O fluxo, nesse caso, foi mantido em 40ml/h, sendo que o recomendado pelo fabricante da resina é de até 10cm/h e, portanto, de 53ml/h para uma coluna de 2,6cm de diâmetro. O coletor de frações foi programado para coletar 300 frações de 5ml. Da primeira coluna, eluíram dois picos ativos, designados A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, enquanto que, da segunda, apenas um pico, B, foi eluído.

#### **Cromatografia de filtração em gel Ultrogel AcA 22**

Ultrogel AcA 22 é um suporte para cromatografia de gel filtração da LKB, composto de uma rede homogênea de agarose (2%) intercalada com polímeros de acrilamida (2%) para conferir maior rigidez e menor porosidade, de forma esférica, fornecido como uma suspensão aquosa, para a faixa de fracionamento de 60 a 1000 KD (Scopes, 1982). O gel foi equilibrado e eluído com o mesmo tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, mais aditivos, utilizado nas etapas de purificação anteriores. Uma coluna Pharmacia K 50/100 (50mm de diâmetro interno x 100cm de comprimento) com um leito de

1,8 l foi empregada. Antes da cromatografia, as amostras foram concentradas até um volume de cerca de 2% do leito do gel (faixa recomendada: 0,5 - 4%) e uma concentração protéica de aproximadamente 20mg/ml, respeitando a regra de que a viscosidade da amostra não deve ultrapassar a do eluente por um fator maior que 2, o que corresponde a uma concentração de 70mg/ml (IBF/LKB - Product information Nº 200 9/2 IBF). A operação foi realizada em célula de ultrafiltração Amicon, modelo 8400 (capacidade: 400ml; volume mínimo agitado: 10ml), com membrana Diaflo PM 30-76mm (capacidade de retenção de partículas de massa molecular acima de 30 KD), tendo sido aplicada uma pressão de nitrogênio de 1 atm sendo a pressão máxima permitida de 5 atm (Amicon Corp., 1984). Um fluxo de 49ml/h ou 2,5cm/h foi mantido durante a cromatografia (fluxo recomendado: 2-3cm/h ou 39-59ml/h para uma coluna de 5cm de diâmetro interno) e 200 frações de 10ml foram coletadas. Os picos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e B da coluna DEAE-Sephacel foram cromatografados por filtração em gel separadamente, tendo resultado, cada um deles, em um único pico ativo.

### 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS)

O grau de pureza das frações da coluna Aca 22 foi analisado por PAGE-SDS, usando o sistema de tampão descontínuo, baseado no método de Laemmli (1970). O gel foi preparado como descrito por Hammes (1981), tendo-se, porém, reduzido a concentração de persulfato de amônio à metade,



pois foi observada uma polimerização muito rápida do gel, o que dificulta sua montagem. A concentração final de acrilamida no gel de resolução foi de 12,5%.

Detalhes da montagem das placas, do preparo do gel e das amostras, da corrida da eletroforese, assim como da coloração e da descoloração do gel são dados a seguir.

### **Montagem das placas**

Duas placas de vidro medindo 19 x 20cm e 16 x 20cm, lavadas com detergente e etanol ou acetona, separadas por espaçadores de 0,15mm colocados lateralmente e na base, são fixadas com grampos especiais, de modo a não permitir vazamento, o que deve ser checado com água destilada antes de se colocar o gel.

### **Preparo do gel**

#### Soluções estoque:

- a. tampão estoque para gel de resolução (3,0M Tris-HCl, pH 8,8) - 36,3g Tris e 48,0ml 1M HCl são misturados e levados a um volume final de 100ml com água. A solução é filtrada em papel de filtro Whatman nº1 e estocada a 4°C;
- b. tampão estoque para o gel de concentração (0,5M Tris HCl, pH 6,8) - 6,0g Tris são dissolvidos em 40ml de água destilada, titulados a pH 6,8 com 1M HCl (~ 40ml) e levados a um volume final de 100ml com água. A solução é

filtrada em papel de filtro Whatman nº1 e estocada a 4°C;  
c. tampão estoque para o tanque (0,25M Tris, 1,92M glicina, 1% SDS, pH 8,3) - 30,3g Tris, 144,0g glicina e 10,0g SDS são dissolvidos e levados a 1 l com água destilada. A solução é estocada a 4°C.

Gel de resolução: (12,5% acrilamida)

|                                      | Para 40ml |
|--------------------------------------|-----------|
| acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)    | 16,7ml    |
| tampão estoque para gel de resolução | 5,0ml     |
| água destilada                       | 16,9ml    |
| TEMED                                | 0,02ml    |

A solução é degaseificada a vácuo e, então, adiciona-se:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| 10% SDS                   | 0,4ml |
| 1,5% persulfato de amônio | 1,0ml |

Imediatamente após a adição de persulfato de amônio (recém-preparado), o gel é colocado entre as placas de vidro pré-montadas, com a ajuda de uma pipeta de 10ml. Uma fina camada (~ 0,5cm) de propanol-2 ou butanol-1 é colocada sobre a superfície do gel para que esta fique perfeitamente plana. Após polimerização, o propanol/butanol é drenado e a superfície do gel lavada cuidadosamente com água destilada duas ou três vezes; as placas são, então, secas com papel de filtro e estarão prontas para receber o gel de concentração.

### Gel de concentração (3,75% acrilamida)

|                                         | Para 20ml |
|-----------------------------------------|-----------|
| acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)       | 2,5ml     |
| tampão estoque para gel de concentração | 5,0ml     |
| água destilada                          | 11,8ml    |
| TEMED                                   | 0,015ml   |

A solução é desgaseificada a vácuo e, então, adiciona-se:

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| 10% SDS                   | 0,2ml |
| 1,5% persulfato de amônio | 0,5ml |

O gel é colocado sobre o de resolução e o pente é inserido imediatamente.

### **Preparo da amostra**

Um volume de cada amostra equivalente a ~ 20-40µg de proteína é colocado em tubo de Eppendorf e desidratado em centrífuga a vácuo (1 atm) tipo "gyro-vap" (Howe). Imediatamente antes da eletroforese, 25µl de tampão da amostra são adicionados e a suspensão é aquecida em banho-maria a 100°C por 1 minuto.

Tampão da amostra: 0,0625M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,002% azul de bromofenol, preparado, na hora do uso, como segue:

|                          | Para 10ml |
|--------------------------|-----------|
| 0,5M Tris-HCl, pH 6,8    | 1,25ml    |
| 10% SDS                  | 2,5ml     |
| $\beta$ -mercaptoetanol  | 0,5ml     |
| glicerol                 | 1,0ml     |
| 0,02% azul de bromofenol | 1,0ml     |
| água                     | 4,25ml    |

### **Montagem da placa de gel no tanque e corrida da eletroforese**

Após completa polimerização do gel de concentração, o pente e o espaçador da base são cuidadosamente removidos e a placa de gel fixada no tanque com tantos grampos quantos caibam. Prepara-se o tampão de uso do tanque (100ml tampão estoque + 900ml água) e colocam-se 500ml na parte superior. Deve-se verificar se não existe vazamento, ou seja, se a parte inferior está seca. Só então adicionam-se 500ml de tampão na parte inferior.

As amostras são, então, colocadas no gel, nos espaços feitos pelo pente, e a corrida iniciada a 40V. Se a eletroforese for corrida durante a noite, essa voltagem pode ser mantida e aumentada no dia seguinte para acelerar o processo.

### **Coloração com azul de Coomassie**

O azul de Coomassie R250 (0,1%) é dissolvido em água: metanol: ácido acético glacial (5:5:2 por volume), como segue:

|                        |          |
|------------------------|----------|
| azul de Coomassie R250 | 1g       |
| água                   | 416,67ml |
| metanol                | 416,67ml |
| ácido acético glacial  | 166,67ml |

A solução é filtrada em papel de filtro Whatman nº 1.

O gel é transferido para um recipiente adequado, coberto com corante e deixado por, pelo menos, 6 horas à temperatura ambiente.

#### **Descoloração**

O corante é transferido para um frasco (pode ser reutilizado várias vezes) e o gel é coberto com a seguinte solução:

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| ácido acético glacial | 200ml |
| metanol               | 900ml |
| água                  | 900ml |

A solução é trocada várias vezes até que o gel tenha sido adequadamente descorado.

#### **4. Estocagem de PDC**

As frações ativas da coluna ACA 22 foram concentradas por ultrafiltração a uma concentração de ~ 20 mg/ml, como descrito anteriormente. Parte do material (3ml) de cada pico foi liofilizada, para o que as amostras foram primeiramente dialisadas contra 4 l de água Milli Q com uma troca de mais 4 l.

O restante foi distribuído em alíquotas de 1ml em frascos de polipropileno estéreis, capacidade 5ml, com tampa rosqueável (tipo Bijou), contendo 1ml (1,26g) de glicerol. Uma atmosfera de nitrogênio foi introduzida com auxílio de pipeta Pasteur e as tampas, após rosqueadas, foram envolvidas com parafilme, para evitar qualquer dano decorrente de oxidação durante a estocagem. As amostras liofilizadas foram mantidas a 4°C e as demais a -20°C.

## **ANÁLISE DA ESTRUTURA DAS FORMAS DE PDC ISOLADAS**

### **1. Determinação da massa molecular**

A massa molecular de PDC foi estimada por PAGE-SDS pelo sistema de eletroforese PhastSystem, da Pharmacia, bem como pela filtração em gel por FPLC. A massa molecular precisa foi obtida por espectrometria de massa com ionização por eletrospray, técnica que será descrita posteriormente.

O sistema de eletroforese PhastSystem, combina a velocidade e a reprodutividade da técnica FPLC com a alta resolução da eletroforese. Para separações por PAGE-SDS, a corrida leva apenas cerca de 30 minutos, devido ao gel empregado (Phast-Gel), que possui, aproximadamente, 0,45mm de espessura e 45mm de comprimento (sendo 13mm para o gel de concentração e 32mm para o gel de separação), e ao sistema de tampão contido em duas tiras de 2% de agarose (uma para o anodo e outra para o catodo). A rapidez da coloração e da descoloração, por sua

vez, cerca de 30 minutos para a coloração com azul de Coomassie e de 60 minutos para o nitrato de prata, se deve à combinação das características do gel com soluções aquecidas e agitação controlada. O gel é fino, de modo que os reagentes penetram rapidamente por toda a matriz; soluções aquecidas e agitação controlada aceleram a transferência de massa, tornando o processo ainda mais rápido; além disso, todas as soluções são bombeadas para dentro e para fora da câmara de processamento automaticamente. O gel e as tiras de tampão são fornecidos pelo fabricante prontos para uso.

Para a determinação da massa molecular de PDC, foi empregado o PhastGel homogêneo 12,5%, cuja concentração do gel de poliacrilamida (%T) é de 6% e de 12,5% e a do "crosslinker" (%C), de 3% e de 2%, para as zonas de gel de concentração e de separação, respectivamente. O sistema de tampão do gel consiste de 0,112M acetato e 0,112M Tris, pH 6,5, enquanto que as tiras de tampão contêm: 0,2M tricina, 0,2M Tris e 0,55% SDS, pH 8,1. Para as amostras, o seguinte tampão foi utilizado: 10mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 2,5% SDS, 10% sacarose e 0,01% azul de bromofenol. O tampão foi preparado como uma solução estoque 2x e diluído adequadamente de acordo com o volume de amostra utilizado, o qual foi ajustado de modo a fornecer 200ng de proteína/ $\mu$ l; para o padrão, foi usada uma concentração de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l. Apenas 1 $\mu$ l de cada amostra é aplicado no gel, o que é feito automaticamente. O gel foi corado com nitrato de prata, tendo-se usado o Kit da Pharmacia (cat.nº17-0617-01),

de acordo com instruções do fabricante (Pharmacia, 1987).

Para a determinação da massa molecular por filtração em gel, foi empregado um sistema FPLC da Pharmacia. A coluna utilizada, Du Pont GF-250, tem as seguintes características: dimensões - 9,4mm de diâmetro interno e 250mm de comprimento; material de empacotamento - suporte de sílica estabilizada por zirconia e, posteriormente, modificada por um organosilano hidrofílico, o que resulta em uma fase estacionária homogênea, monomérica e hidrofílica de características superiores; faixa de fracionamento - a coluna separa proteínas de massa molecular de 400000 a 4000 D, com uma faixa de fracionamento ótima de 250000 a 10000 D, considerando-se macromoléculas esféricas, como, por exemplo, proteínas globulares. Como fase móvel, foi usado o mesmo tampão da purificação, porém a concentração foi aumentada para 0,1M para evitar qualquer efeito de troca de carga. Assim sendo, o seguinte tampão foi usado: 0,1M  $K_3PO_4$  pH 6,3 + 1mM  $MgSO_4$  + 10 $\mu$ M TPP + 0,1mM PMSF + 10<sup>-4</sup>mM pepstatina A + 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol. O tampão foi filtrado em membrana de 0,2 $\mu$ , certificada para HPLC, FP200-47mm (Gelman Sciences nº66477), e degaseificada a vácuo antes do uso. A coluna foi equilibrada com cinco volumes de tampão com um fluxo de 0,5ml/min.

Foram injetados 150 $\mu$ l de soluções contendo 2mg/ml de cada proteína isoladamente. Para a determinação do volume vazio, foram injetados 150 $\mu$ l de solução de azul de dextrana 1mg/ml. Todas as soluções foram devidamente filtradas em



membranas de 0,2 $\mu$ .

As seguintes proteínas foram usadas para a curva de calibração:

| Proteína                                         | Massa molecular (D) |
|--------------------------------------------------|---------------------|
| Citrocromo C (eqüino) - BDH                      | 12300               |
| Mioglobina (eqüino - BDH                         | 17200               |
| Quimotriprinogênio (pâncreas de boi) - Pharmacia | 25000               |
| Ovalbumina (galinha) - BDH                       | 45000               |
| Ovotransferrina (galinha) - BDH                  | 76-78000            |
| Lactato desidrogenase (coração de porco) - BDH   | 145900              |
| Aldolase (músculo de coelho) - Pharmacia         | 158000              |
| Catalase (fígado de boi) - Pharmacia             | 232000              |

## 2. Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico de PDC foi determinado pelo PhastSystem. O método de focalização isoelétrica por esse sistema é rápido, reprodutível e conveniente; as separações levam aproximadamente 30 minutos, sob condições programadas com exatidão, e não requerem nenhuma preparação de tampão. Os meios utilizados cobrem uma faixa de pH de 3 a 9 (PhastGel IEF 3-9, utilizado neste experimento), de 5 a 8 (PhastGel IEF 5-8) e de 4-6,5 (PhastGel IEF 4-6,5); são géis de poliacrilamida homogêneos (5% T, 3% C), contendo anfólitos trans-

portadores Pharmalyte, os quais, durante a corrida, geram gradientes de pH lineares estáveis, com um perfil de condutividade suave ao longo de toda a faixa de pH, o que significa que altas forças de campo de 500V/cm ou mais podem ser usadas. Os géis possuem as seguintes dimensões: 5,0cm de comprimento, 4,2cm de largura e 0,35mm de espessura.

As proteínas migram, sob um campo elétrico, pelo gel poroso, essencialmente sem obstáculos, até um ponto no gradiente de pH que corresponde ao seu pI. O método consiste em três etapas: a. prefocalização, onde o gradiente de pH é formado; b. aplicação da amostra, que pode ser feita na posição do anodo, do catodo ou no meio do gel, dependendo da amostra; e c. focalização, onde as proteínas migram até seus pontos isoelétricos. As seguintes condições foram programadas para cada uma dessas etapas:

- a. prefocalização: 2000V; 2,5mA; 3,5W; 15°C; 75Vh
- b. aplicação da amostra: 200V; 2,5mA; 3,5W; 15°C; 15Vh
- c. focalização: 2000V; 2,5mA; 3,5W; 15°C, 410Vh

As amostras foram diluídas no mesmo tampão em que a enzima foi purificada (10mM  $K_3PO_4$  pH 6,3 + 1mM  $MgSO_4$  + 10 $\mu$ M TPP), de modo a se obter uma concentração de 2 $\mu$ g/ $\mu$ l, tendo sido aplicados 2 $\mu$ g de cada amostra no gel. O kit de calibração, abrangendo a faixa de pI de 3,5 a 9,3 (Pharmacia), foi reconstituído com 100 $\mu$ l de água Milli Q.

O gel foi corado pelo azul de Coomassie em quatro etapas, quais sejam:

- a. fixação: ácido tricloroacético a 20%;
- b. lavagem: 30% metanol e 10% ácido acético em água Milli Q (3:1:6);
- c. coloração: solução de PhastGel Blue R a 0,02% em, aproximadamente, 30% metanol e 10% ácido acético em água destilada, e 0,1% (p/v)  $\text{CuSO}_4$ ;
- solução estoque: solução a 0,2% obtida pela dissolução de 1 tablete de PhastGel Blue R (corante Coomassie R 350 em forma de tablete prontamente solúvel) em 80ml de água Milli Q com agitação por 5-10 minutos, seguida da adição de 120ml de metanol e agitação por 2 minutos.
- solução final: mistura de uma parte de solução estoque filtrada com nove partes de uma solução de metanol: ácido acético: água Milli Q (3:1:6) e 0,1% (p/v)  $\text{CuSO}_4$ . O  $\text{CuSO}_4$  é adicionado para diminuir a interferência do corante. A solução final deve ser preparada no dia de uso e não deve ser reciclada;
- d. descoloração: 30% metanol e 10% ácido acético em água Milli Q (3:1:6), como na etapa 2.

As seguintes condições foram programadas para cada uma dessas etapas:

- a. fixação : 5 minutos; 20°C
- b. lavagem : 2 minutos; 20°C
- c. coloração : 10 minutos; 50°C
- d. descoloração: 10 minutos; 50°C

### 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (PAGE-NATIVO)

PAGE-nativo, isto é, eletroforese na ausência de agentes desnaturantes, é uma das mais poderosas técnicas para o estudo da composição e estrutura de proteínas nativas, pois tanto a conformação como a atividade biológica permanecem intactas. Géis gradientes delimitam nitidamente as bandas protéicas e possibilitam a separação de misturas num único gel.

Foi usado o PhastSystem com o meio gradiente PhastGel, o que torna a técnica rápida, reproduzível e conveniente; as separações levam aproximadamente 60 minutos com corridas sob condições exatas, programadas, e não requerem a preparação de tampão. O meio gradiente consiste em um gel de poliacrilamida (com disponibilidade para duas faixas de gradiente, 8-25 e 10-15) e tiras de tampão nativo. Os géis apresentam uma zona de gel de concentração de 13mm (6%T, 3%C) e uma zona contínua de gel gradiente (8 a 25%T ou 10-15%T, 2%C) de 32mm com espessura de 0,45mm. O sistema tampão nos géis é de 0,112M acetato e 0,112M Tris, pH 6,4; nas tiras, constituídas de 2% agarose IEF, é de 0,88M L-alanina e 0,25M Tris, pH 8,8.

No início da corrida, o tampão das tiras migra para o gel. Os íons líderes e rastreadores (acetato/L-alanina) formam uma frente que migra através do gel deixando para trás uma região de voltagem uniforme e pH constante (pH 8,8). Quando a frente ultrapassa o ponto de aplicação da amostra (após 10Vh) as proteínas são aplicadas ao gel. O pH no gel é 8,8, de modo que proteínas com pI abaixo de aproximadamente 8,3 adquirem

uma carga líquida negativa e migram através da zona homogênea do gel de concentração. Ao atingirem a interface do gel de concentração/gel gradiente, suas mobilidades são reduzidas drasticamente devido a um súbito decréscimo no tamanho do poro. As proteínas se separam na zona de gel gradiente de acordo com seus tamanhos e suas cargas. O gradiente proporciona nitidez às bandas, pois a borda de proteína que avança é mais retardada que a de rastreamento. Após cerca de 280Vh o perfil das bandas permanece relativamente constante, mas as proteínas só param de migrar quando o método é interrompido.

Dois géis foram corridos conforme instruções da Pharmacia contidas no folheto "PhastSystem Separation Technique File nº 120". As seguintes condições foram programadas para cada etapa:

|                            |      |      |      |      |       |
|----------------------------|------|------|------|------|-------|
| a. migração do tampão      | 400V | 10mA | 2,5W | 15°C | 10Vh  |
| b. aplicação da amostra    | 400V | 1mA  | 2,5W | 15°C | 2Vh   |
| c. separação das proteínas | 400V | 10mA | 2,5W | 15°C | 268Vh |

Um dos géis foi corado com nitrato de prata, usando-se o Kit da Pharmacia (cat.nº 17-0617-01) de acordo com instruções do fabricante (Pharmacia, 1987); o outro foi corado para atividade enzimática pelo 1,2-dianilinoetano conforme metodologia descrita por Zehender et al. (1983).

## **4. Espectrometria de Massa**

### **4.1. Preparo das amostras**

Cada uma das três formas de enzima purificadas e estocadas em 50% glicerol a -20°C foi extensivamente dialisada contra 4 l de água Milli-Q, com seis trocas, a 4°C, tendo sido utilizado 1ml de cada amostra com uma concentração protéica de aproximadamente 10mg/ml. Após diálise, as amostras foram liofilizadas e submetidas a clivagens específicas das cadeias polipeptídicas.

### **4.2. Clivagens específicas das cadeias polipeptídicas**

#### **Digestão por tripsina**

A digestão por tripsina (Sigma Chemical Co.) foi executada em tampão bicarbonato de amônio 50mM pH 8,4 numa proporção enzima: substrato de 1:50 (peso/peso), a 37°C, por 3 horas, após o que a reação foi interrompida por congelamento seguido de liofilização.

#### **Digestão por quimotripsina**

A amostra foi incubada com quimotripsina (Sigma Chemical Co.) numa proporção enzima:substrato de 1:50 (peso/peso) em tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,4, a 37°C, por 2 horas, após o que a reação foi paralisada por congelamento seguido de liofilização.

### **Digestão por protease V8**

A digestão por protease V8 de S. aureus (ICN Immunobiologicals) foi executada na mistura de peptídios gerados pela digestão com tripsina. Alíquotas de cada mistura do digesto (1-2 nanomols) foram dissolvidas em tampão bicarbonato de amônio 0,1M pH ~ 8 e incubadas com a protease V8 numa proporção enzima:substrato de 1:20 (peso/peso), a 40°C, por 6 horas. A reação foi paralisada por congelamento seguido de liofilização.

### **Digestão por carboxipeptidase B**

Misturas de digestos trípticos foram incubadas com carboxipeptidase B numa proporção enzima:substrato de 1:50 (peso/peso) em tampão bicarbonato de amônio 50mM pH 8,4, a 37°C, por 1 hora. A reação foi paralisada por congelamento seguido de liofilização.

### **Clivagem por CNBr**

Alíquotas de 1-2 nanomols de cada isolado da enzima foram dissolvidas em ácido fórmico 70% com a adição de brometo de cianogênio numa proporção CNBr:proteína de 3:1 (peso/peso). A reação foi desenvolvida à temperatura ambiente, no escuro, por 5 horas, e paralisada pela adição de água (cinco vezes o volume de ácido fórmico usado para dissolver a amostra) seguida de congelamento e liofilização.

## Degradação seqüencial de Edman

A degradação seqüencial de Edman foi executada em misturas de digestos das formas isoladas da enzima usando, em cada estágio, fenilisotiocianato 5% (PITC, Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Scotland) em piridina seca (Sigma Chemical Co.) por 1 hora, seguido de clivagem com ácido trifluoroacético (Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Scotland), a 45°C, por 15 minutos. A mistura de reação foi secada a vácuo.

### 4.3. Purificação de peptídios dos digestos por HPLC

Peptídios das misturas dos digestos de PDC foram purificados por HPLC num cromatógrafo da Waters Associate equipado com um injetor universal (UK 66), um programador de gradiente (modelo 660), dois sistemas de dispensar solvente (modelo 510), dois detectores de absorbância ultravioleta de comprimento de onda fixos (254 e 280nm) e uma coluna  $C_{18}$  de fase reversa - Ultrasphere<sup>TM</sup> - ODS medindo 4,6mm de diâmetro interno e 25cm de comprimento. Os solventes usados para a eluição dos peptídios foram: solvente A - água Milli Q + ácido trifluoroacético a 0,1% (TFA, Sigma Chemical Co.); solvente B-acetonitrilo (Rathburn Chemicals Ltd.) a 90% em água + TFA 0,1%. As seguintes condições foram empregadas para a purificação da mistura do digesto quimotríptico de PDC A<sub>1</sub>:



| Tempo (min) | A(%) | B(%) | Gradiente |
|-------------|------|------|-----------|
| 0           | 100  | 0    | 1         |
| 15          | 90   | 10   | 6         |
| 35          | 80   | 20   | 6         |
| 80          | 60   | 40   | 6         |
| 90          | 40   | 60   | 6         |
| 100         | 0    | 100  | 6         |

Para a purificação das misturas da clivagem por CNBr de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B, as seguintes condições foram usadas:

| Tempo (min) | A(%) | B(%) | Gradiente |
|-------------|------|------|-----------|
| 0           | 90   | 10   | 1         |
| 15          | 80   | 20   | 6         |
| 75          | 55   | 45   | 6         |
| 85          | 45   | 55   | 6         |
| 95          | 35   | 65   | 6         |
| 115         | 0    | 100  | 6         |

Um fluxo de 1ml/min foi empregado e frações foram coletadas em intervalos de 1 minuto.

#### 4.4. Métodos de Espectrometria de Massa

##### Mapeamento FAB

Os espectros de massa FAB foram obtidos num instrumento VG ZAB-2HF (VG Analytical Ltd., Manchester, UK) equipado com uma pistola de átomos acelerados M-Scan. A pistola foi operada usando gás xenônio com uma corrente de 10µA a 10 KeV. O

espectro de massa foi registrado até uma massa de 3200 D com voltagem de aceleração plena. Tanto os peptídios puros como as misturas dos digestos examinados foram dissolvidos em ácido acético a 5% (volume/volume) e alíquotas de 2µl foram aplicadas no alvo FAB revestido com uma matriz de glicerol/tioglicerol. O instrumento foi varrido num modo controlado por massa com varreduras lineares realizadas numa taxa de velocidade de 200 segundos/década.

### **Varredura Ligada B/E-CAD**

Os espectros de varredura ligada B/E-CAD foram registrados num espectrômetro de massa VG-ZAB-E ou VG-ZAB-2SE (VG Analytical Ltd., Manchester, UK) com uma faixa de resolução de massa até 15000 D com voltagem de aceleração plena. As amostras foram dissolvidas em ácido acético a 5% (volume/volume) e alíquotas de 1-2µl foram aplicadas no alvo FAB revestido com uma matriz de álcool mono-nitrobenzílico (MNBA). Foi demonstrado que esta matriz aumenta o tempo de vida da amostra, resultando numa melhor qualidade do espectro em comparação ao obtido com as amostras aplicadas numa matriz de glicerol/tioglicerol (Chatterjee, 1989). Os espectros foram registrados usando um sistema de dados de 11250 J e a ionização foi obtida com uma pistola de cério de alta energia operando a 30 KeV. O espectros de varredura ligada foram registrados no modo MCA somando de cinco a dez varreduras, dependendo do tempo de vida da amostra, numa velocidade de

varredura de 10-20 segundos/década. A pressão ótima do gás de colisão (hélio) no estudo de varredura ligada BE/CAD foi numa leitura de pressão de  $1,5 \times 10^{-10}$  Torr na válvula do analisador. Essa pressão correspondeu à redução de um sinal sintonizado de B12 (m/z 1329) no coletor para um terço de sua altura original no osciloscópio. A câmara de colisão foi localizada na primeira região livre de campo, entre a fonte de íon e o setor magnético. Os peptídios sintéticos Leu-enkefalinamida, angiotensina e substrato da renina foram adquiridos da Sigma Chemical Co.

#### **Ionização por Eletrospray (ESI-MS)**

O espectrômetro de massa quadrupolo ESI-MS usado foi o VG PMA 3000. As amostras (menos de 1 nanomol) foram dissolvidas em um solvente volátil (metanol) e injetadas numa coluna capilar à pressão atmosférica. A solução que eluiu do capilar, numa taxa de fluxo de 5  $\mu$ l/min., foi introduzida, através de uma fenda do eletrodo, numa atmosfera de nitrogênio aquecida, usada para ajudar a dessolvatação e para eliminar a formação de aglomerados. A amostra carregada de forma múltipla foi, então, direcionada para um quadrupolo funcionando numa pressão de  $10^{-6}$  Torr.

## R E S U L T A D O S   E   D I S C U S S Ã O

### I. EXPERIMENTOS PRELIMINARES

#### EFEITO DA AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE PDC

Dois experimentos de fermentação em batelada foram realizados, em fermentadores de 10 l, visando correlacionar a produção de etanol e, conseqüentemente, de PDC com a aeração. No primeiro experimento, foi fornecida aeração até 10 horas, tendo-se desligado o ar nesse momento e prolongado a coleta de amostras por mais 10 horas. Com isso, pretendeu-se confirmar a resposta da levedura ao efeito Crabtree. Caso positivo, a levedura deveria iniciar a produção de etanol desde as primeiras horas, mesmo na presença de oxigênio; caso negativo, isso só deveria se dar a partir do desligamento do ar. No segundo experimento, a fermentação foi conduzida totalmente sem introdução de ar.

Os resultados estão apresentados nas Figuras 1 a 4. Pelo experimento 1, confirmou-se que a levedura responde ao efeito Crabtree, conforme pode-se observar pelas curvas de produção de etanol (Figuras 1f e 2c) e de atividade da PDC (Figuras 1h e 2e), ou seja, a via de formação de etanol se mostrou ativa desde o início do crescimento, mesmo na presença de oxigênio. Se a levedura fosse insensível ao efeito da glicose, o crescimento deveria ter-se dado através da via respiratória

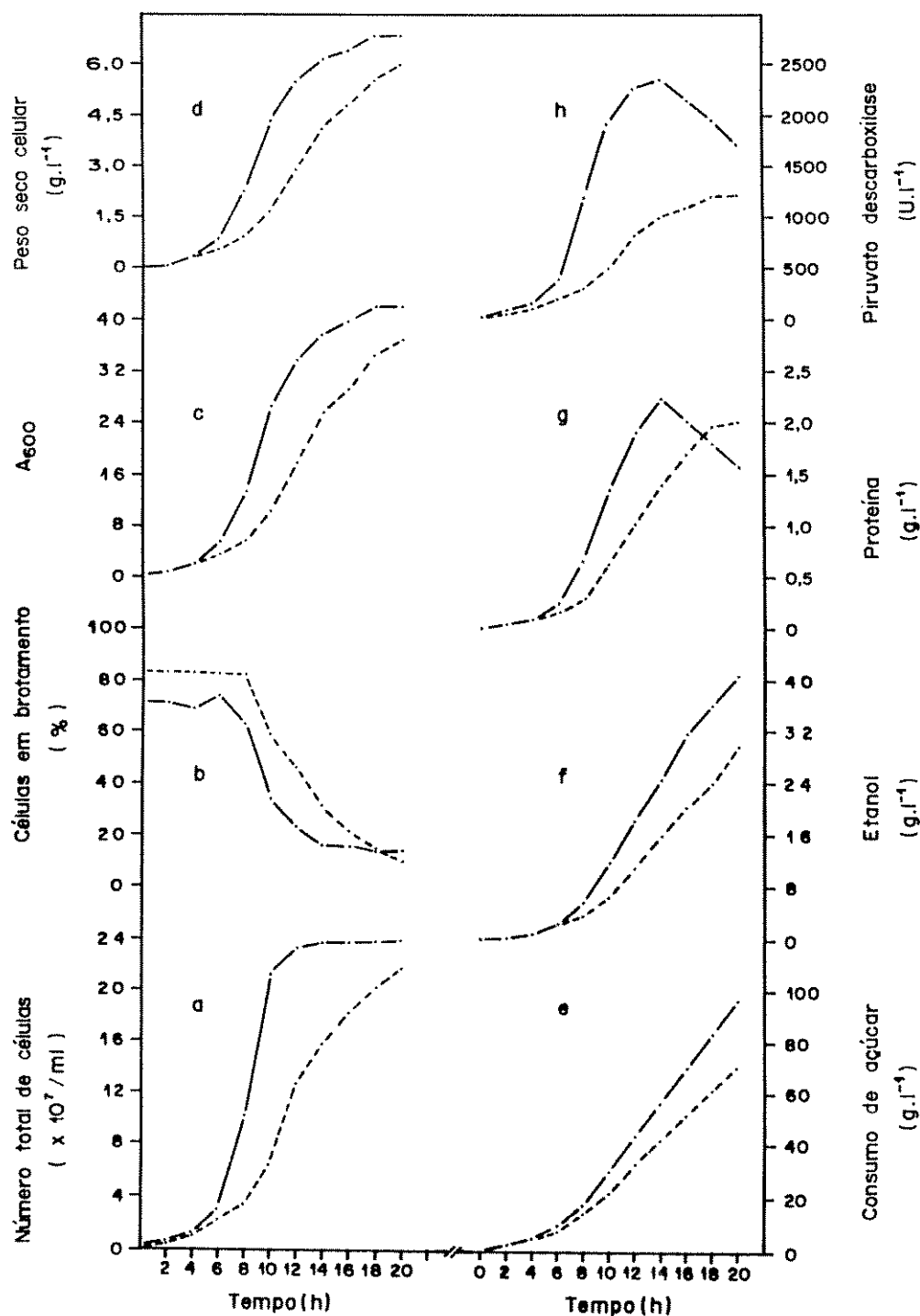


FIG. 1. Crescimento de *S. cerevisiae* MC 16 em aerobiose/anaerobiose e em anaerobiose em fermentador de 10 litros.

———— 2 vvm ar de 0-10 h e 0 vvm ar de 10-20 h  
 ----- 0 vvm ar de 0-20 h

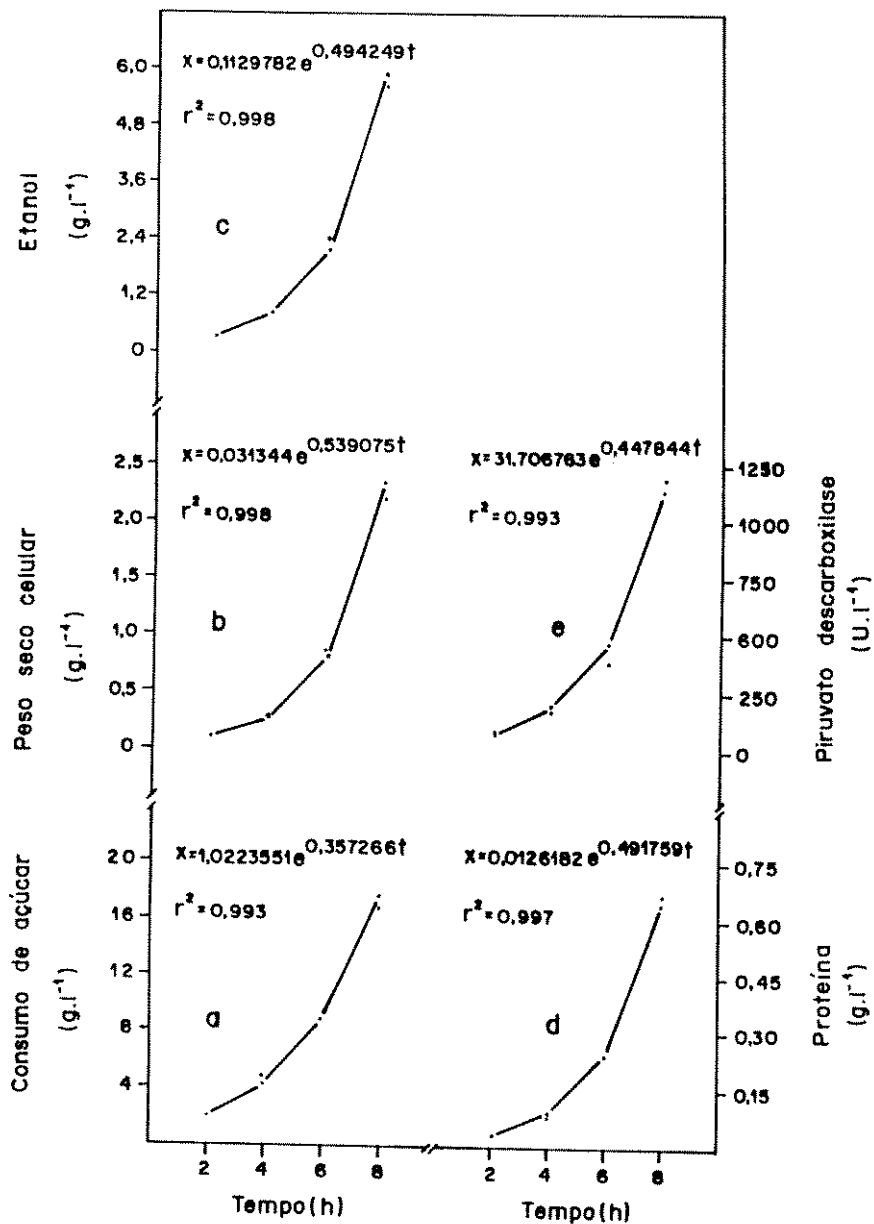


FIG. 2. Fase exponencial do crescimento de *S. cerevisiae* MC 16 em aerobiose/anaerobiose em fermentador de 10 litros.

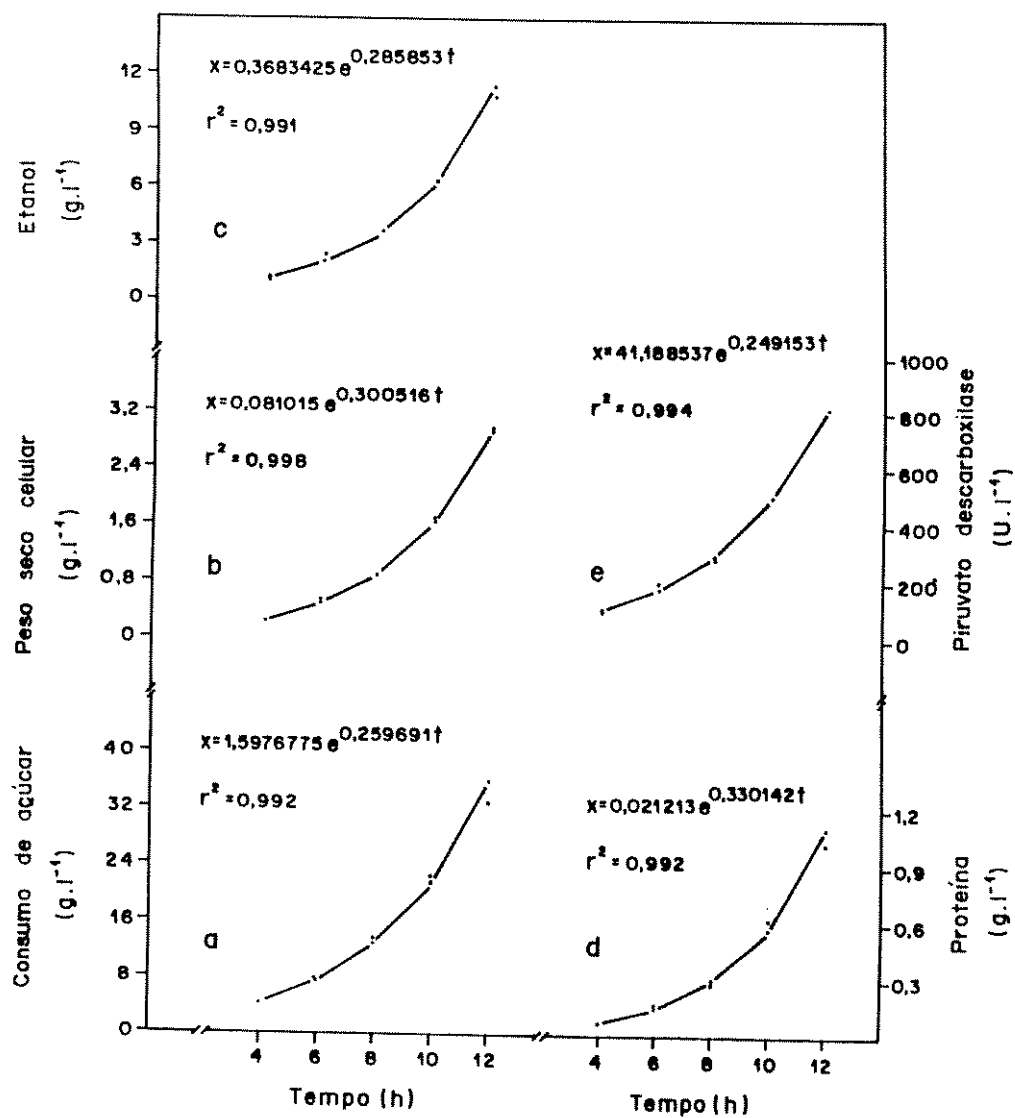


FIG. 3. Fase exponencial do crescimento de *S. cerevisiae* MC 16 em anaerobiose em fermentador de 10 litros.

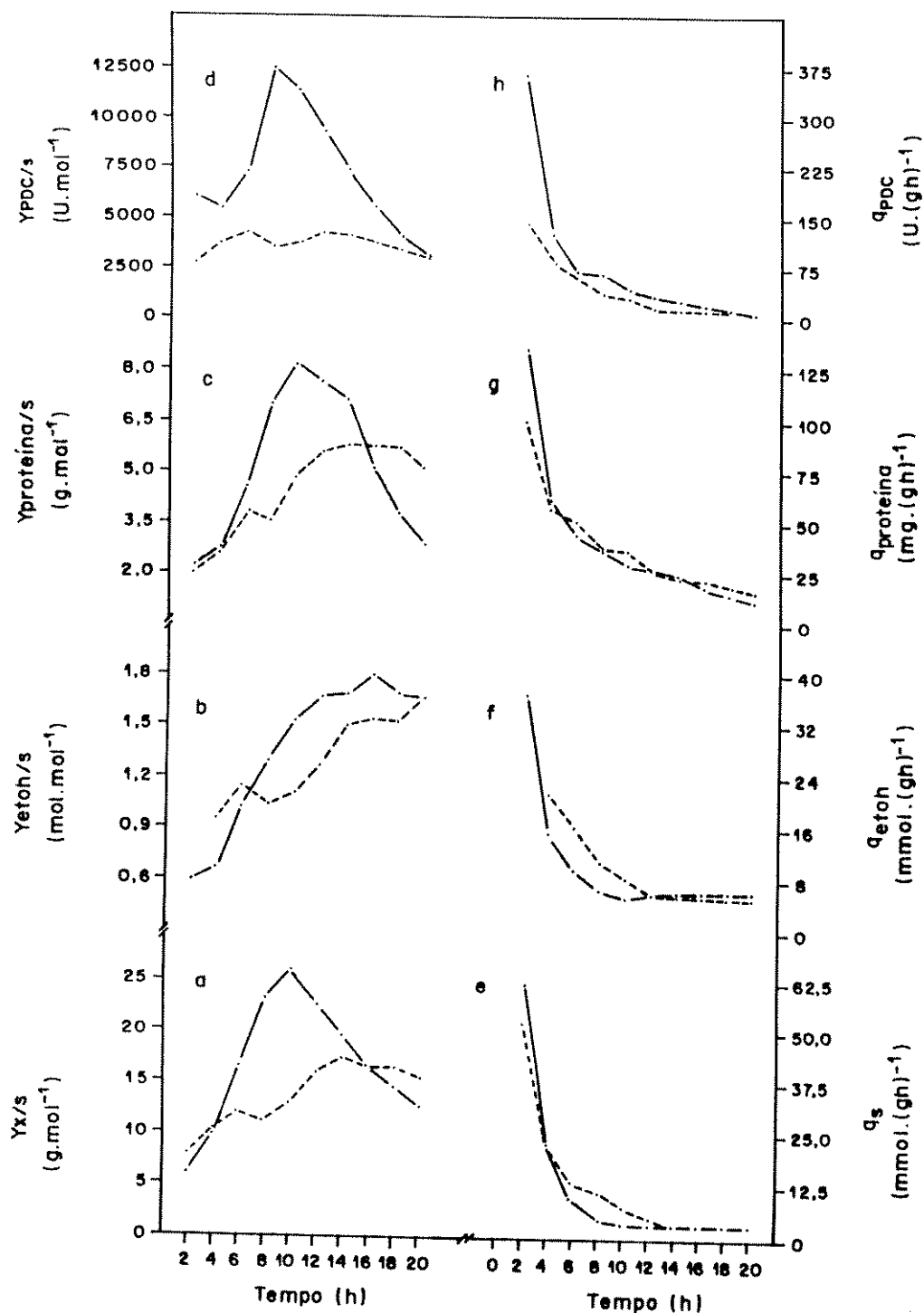


FIG. 4. Fatores de conversão (a,b,c,d), coeficientes metabólicos (e) e taxas específicas de formação de produtos (f,g,h) obtidos durante o crescimento de *S.cerevisiae* MC 16 em aerobiose/anaerobiose e em anaerobiose em fermentador de 10 litros.

— 2 vvm ar de 0-10 h e 0 vvm ar de 10-20 h  
 ----- 0 vvm ar de 0-20 h



durante a fase aeróbica e apenas após a supressão do fornecimento de ar é que a fermentação deveria ter sido induzida. A importância do fornecimento de ar foi comprovada com o segundo experimento, o qual foi realizado em anaerobiose, mesmo considerando-se que, pelo menos nos primeiros momentos, a fermentação não se realizou em anaerobiose restrita. O comportamento geral das fermentações foi similar nos dois experimentos, como era de se esperar de uma linhagem sensível ao efeito Crabtree; porém, em anaerobiose, as curvas foram deslocadas para a direita, tendo a fase exponencial se situado no período de 4 a 12 horas (Figura 3), em comparação com 2 a 8 horas (Figura 2), no primeiro experimento. Além disso, os níveis atingidos quer pelos parâmetros de crescimento celular (Figuras 1a, 1c e 1d), quer de consumo de açúcar (Figura 1e) ou de formação de produtos (Figuras 1f, 1g e 1h) foram inferiores no experimento em anaerobiose. A maior percentagem de células em brotamento (Figura 1b) corresponde à fase exponencial de crescimento no primeiro caso, o que parece refletir um processo contínuo de divisão celular, ou seja, a quantidade de brotos liberados é aproximadamente igual a de brotos formados. No segundo experimento, uma redução significativa de tais células ocorreu já na segunda metade da fase exponencial, parecendo indicar um crescimento celular às custas tanto da liberação dos brotos formados inicialmente — o que explicaria o aumento no número total de células (Figura 1a) — como do aumento do tamanho celular devido ao acúmulo

de materiais de reserva, o que justificaria o acréscimo na densidade celular (Figura 1c). É importante ressaltar que, nas condições dos dois experimentos, a levedura não apresentou problema de agregação, para o que Pringle & Mor (1975) chamam atenção como possível causa de erro em contagens de células em hematócímetros. Também não foi observado multibrotamento.

A proteólise verificada na fase estacionária do primeiro experimento (Figura 1g) foi acompanhada de uma perda da atividade da enzima PDC (Figura 1h). É de conhecimento geral, que, nessa fase, enzimas proteolíticas são produzidas, o que é de fundamental importância em fermentações que se destinam à purificação de proteínas. Salvo no caso específico de as enzimas de interesse pertencerem ao grupo das proteases, tal situação deve ser cautelosamente evitada, para se obter uma preparação de proteína livre de proteases.

A análise dos dados quanto aos fatores de conversão e aos coeficientes metabólicos está apresentada na Figura 4. No primeiro experimento, as curvas obtidas para os fatores de conversão em termos de produção de biomassa ( $Y_{x/s}$ ), de proteína ( $Y_{\text{proteína}/s}$ ) e de PDC ( $Y_{\text{PDC}/s}$ ) foram similares (Figuras 4a, 4c e 4d, respectivamente). Houve um aumento acentuado, ao longo do tempo, durante a fase aeróbica, seguido de uma queda brusca após o desligamento do ar, mostrando que esses processos são mais eficientes na presença de ar, o que está de acordo com a teoria. Quanto à produção de etanol ( $Y_{\text{etoh}/s}$ ), houve também um aumento gradativo e acentuado durante a fase

aeróbica e diferentemente do que se poderia esperar, ou seja, uma maior produção do metabólito por substrato em anaerobiose, foi observada uma estabilização do fator de conversão no seu nível máximo (Figura 4b). O fato de não ocorrer uma queda indica que, para a linhagem de levedura testada, uma vez garantida uma massa celular adequada, a produção de etanol independe da presença de oxigênio. À medida que a biomassa celular cresce (Figura 1d), os coeficientes metabólicos (Figura 4e) e as taxas específicas de formação de produtos (Figuras 4f, 4g e 4h) diminuem até um ponto em que tendem para a estabilidade coincidindo com a fase de desaceleração do crescimento e com a supressão do fornecimento de ar. Isso indica que uma maior quantidade de célula compensa a queda no seu rendimento causada, entre outros fatores, pelo acúmulo de produtos tóxicos. A queda acentuada coincide com a fase lag/início do crescimento exponencial, onde o metabolismo da levedura direcionado para a síntese de material celular é bastante intenso.

Quando a levedura foi cultivada em condições anaeróbicas desde o início, os fatores de conversão foram inferiores aos obtidos no experimento anterior, reforçando a hipótese da importância da aeração para um maior rendimento. As curvas foram similares, especialmente em relação à produção de biomassa (Figura 4a) e de proteína (Figura 4c). Curiosamente, o aumento da produção de PDC em condições aeróbicas não resultou num aumento proporcional em etanol, como se poderia esperar. Resultados semelhantes foram obtidos por Schaaff et

al. (1989), que verificaram que a superexpressão de PDC e ADH simultaneamente por linhagens mutantes em culturas em crescimento logarítmico não leva a uma taxa aumentada na produção de etanol e, portanto, não tem um efeito marcante sobre o fluxo da glicólise. Isso está também de acordo com resultados prévios de Schmitt & Zimmermann (1982) que mostraram que PDC em células de levedura do tipo selvagem está presente em níveis saturantes; uma redução de 50% dessa atividade em linhagens mutantes não teve nenhum efeito na produção fermentativa de  $\text{CO}_2$ .

O quociente de Pasteur (Tabela I), calculado até 10 horas, ficou entre 1,11 e 1,32, mostrando que não houve nenhum efeito regulatório do oxigênio.

TABELA I. Quociente de Pasteur para o crescimento de S. cerevisiae MC 16 em aerobiose e anaerobiose.

| Tempo de<br>amostragem<br>(h) | $Q_s \text{ g(l.h)}^{-1} \text{ }^a$ |             | $P_Q \text{ }^b$ |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|------------------|
|                               | Aerobiose                            | Anaerobiose |                  |
| 2                             | 0,97                                 | 0,865       | 1,12             |
| 4                             | 1,1775                               | 1,0575      | 1,11             |
| 6                             | 1,49                                 | 1,2883      | 1,16             |
| 8                             | 2,12                                 | 1,7163      | 1,24             |
| 10                            | 2,994                                | 2,273       | 1,32             |

$^a Q_s = ds/dt$ , onde  $Q_s$  = taxa volumétrica de consumo de substrato.

$^b P_Q = Q_{s,a}/Q_{s,an}$ , onde  $P_Q$  = Quociente de Pasteur;  $Q_{s,a}$  e  $Q_{s,an}$  = taxas volumétricas de consumo de substrato sob condições aeróbicas e anaeróbicas.

$P_Q = 1$  indica ausência de efeito regulatório do oxigênio.

## ESTABILIDADE DE PDC EM DIFERENTES MÉTODOS DE ESTOCAGEM

A estabilidade da enzima durante a estocagem foi investigada utilizando-se amostras dos experimentos de fermentação (Figuras 5 e 6) e amostras em fase final de purificação (Figuras 7 a 9).

A enzima PDC sofreu uma grande perda de atividade (Figura 5b), tendo conservado, no máximo, 47% de seu valor inicial (Figura 6a), quando a levedura foi multiplicada em aerobiose/anaerobiose, e o extrato bruto estocado por 31 dias a 4°C. Nessa temperatura, a redução foi menor no experimento em que a levedura foi multiplicada em anaerobiose e o extrato bruto analisado após 26 dias; porém deve-se considerar que a avaliação foi feita cinco dias antes. Isso fica mais evidente com a análise das amostras obtidas de uma purificação a partir de levedura multiplicada em aerobiose, após passagem em coluna DEAE-Sephacel. Uma redução na atividade enzimática de 97,4% ocorreu após a estocagem de PDC A<sub>1</sub> a 4°C, por 20 dias (Figura 7), porém, até 16 dias, nenhuma queda na atividade de PDC A<sub>2</sub> foi observada nas mesmas condições (Figura 8). A eletroforese de tais amostras, em gel de poliacrilamida desnaturante, revelou a proteólise ocorrida no primeiro caso (Figura 10, coluna 2), em contraste com o último, onde a proteína se mostrou intacta (Figura 10, coluna 8). Outrossim, a proteólise se deu de uma forma bem específica, levando a uma cadeia polipeptídica de massa molecular muito próxima à da proteína nativa. Conforme calculado pela curva

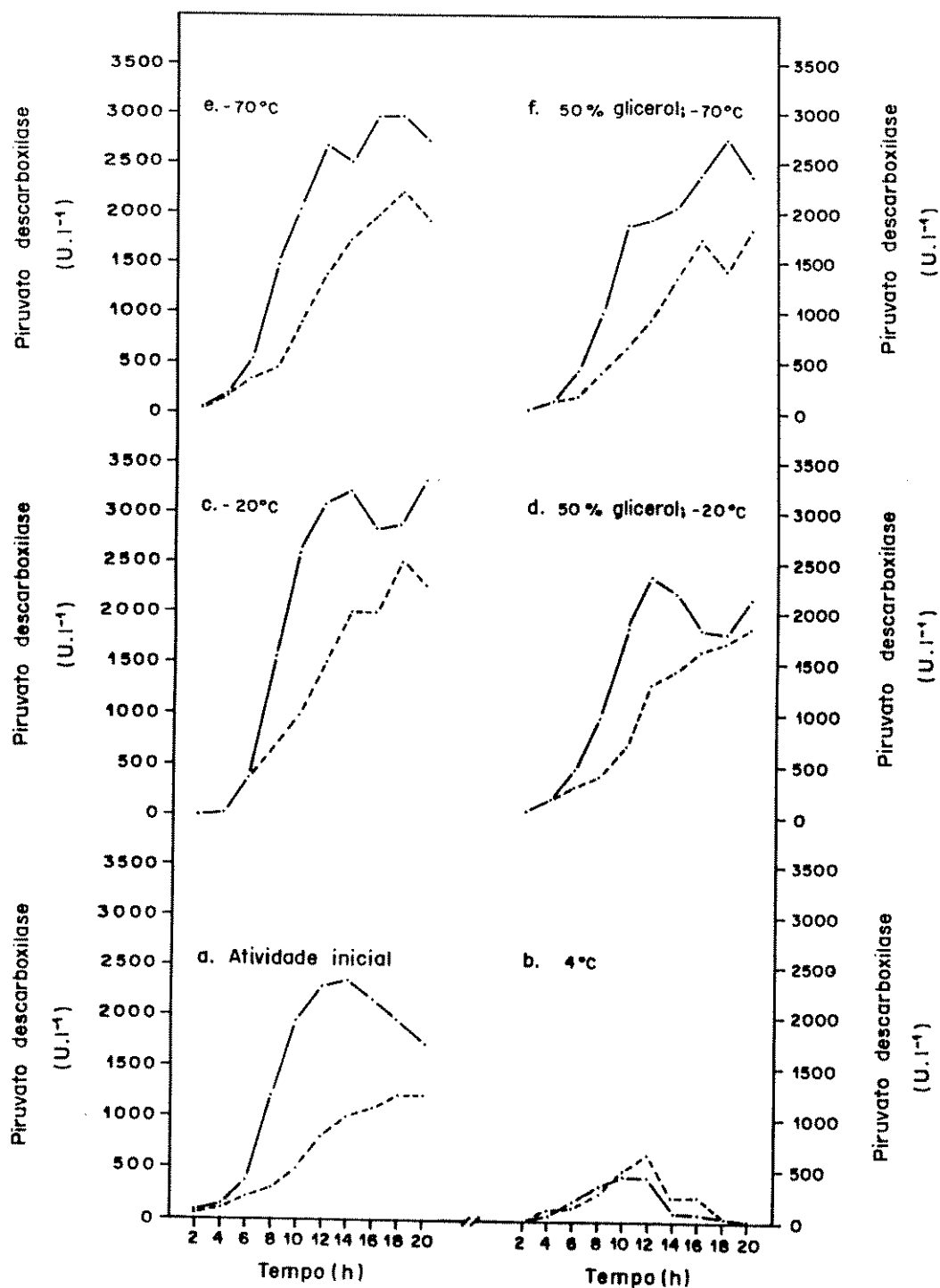


FIG. 5. Atividade de PDC em extratos brutos de levedura, após estocagem em diferentes condições, em comparação com a atividade inicial.

— 2 vvm ar de 0-10 h e 0 vvm ar de 10-20 h; estocagem por 31 dias  
 ----- 0 vvm ar de 0-20 h; estocagem por 26 dias

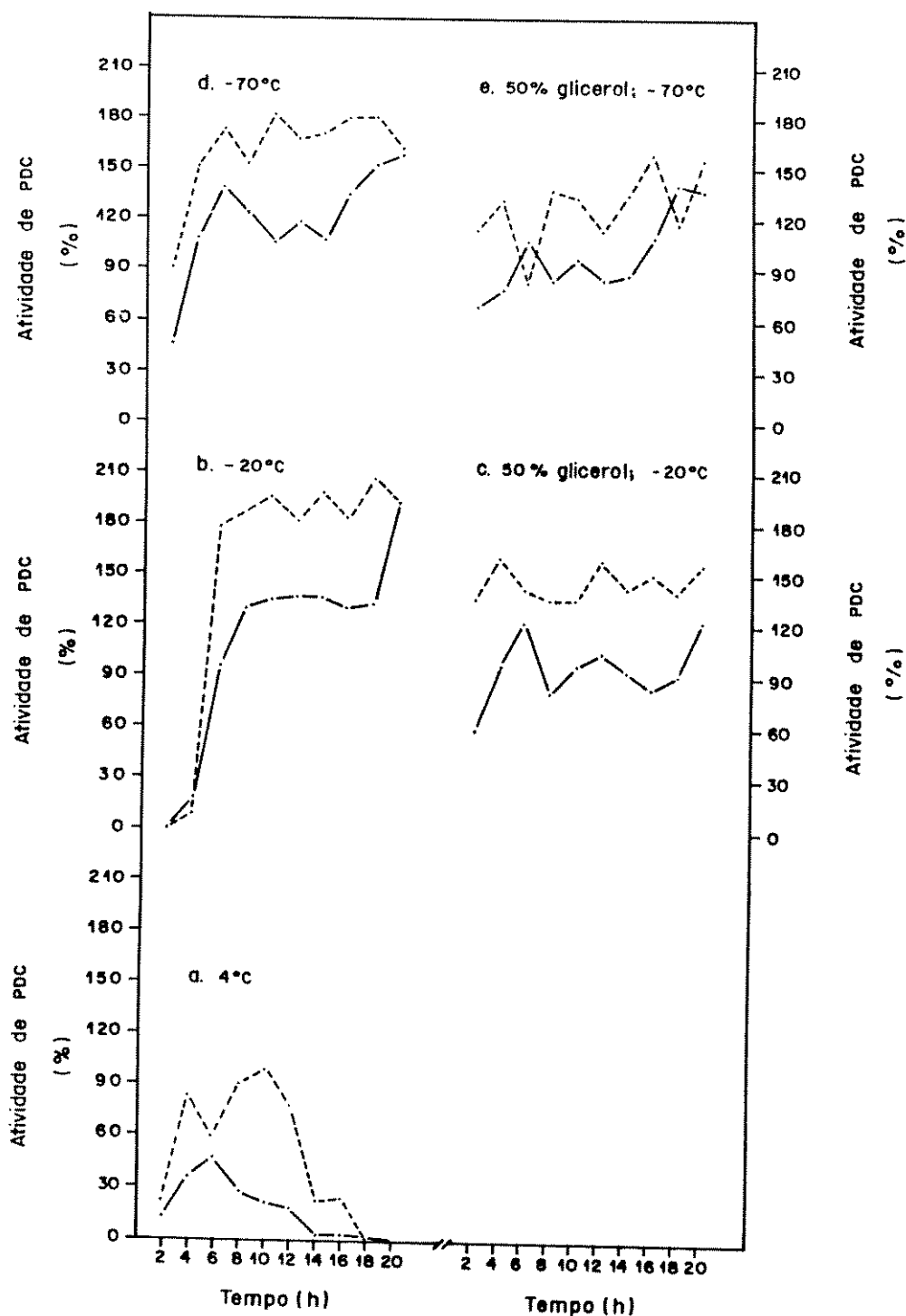


FIG. 6. Percentagem de atividade de PDC em extratos brutos de levedura após estocagem em diferentes condições.  
 — 2 vvm ar de 0-10 h e 0 vvm ar de 10-20 h; estocagem por 31 dias  
 - - - 0 vvm ar de 0-20 h; estocagem por 26 dias

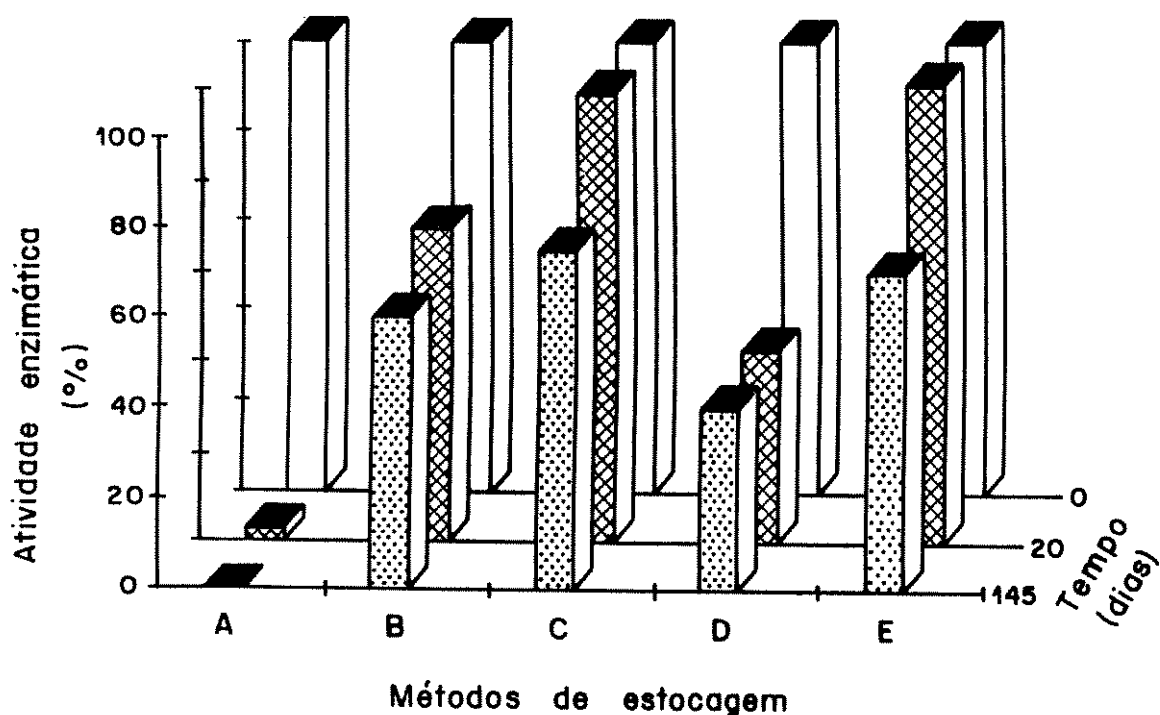


FIG. 7. Estabilidade de PDC durante a estocagem em diferentes condições, avaliada pela determinação da atividade enzimática de amostras obtidas após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. PDC A<sub>1</sub>. A: 4°C; B: -20°C; C: -70°C; D: 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, -20°C; E: 50% glicerol, -20°C. Os resultados são médias de três repetições analíticas de cada amostra.



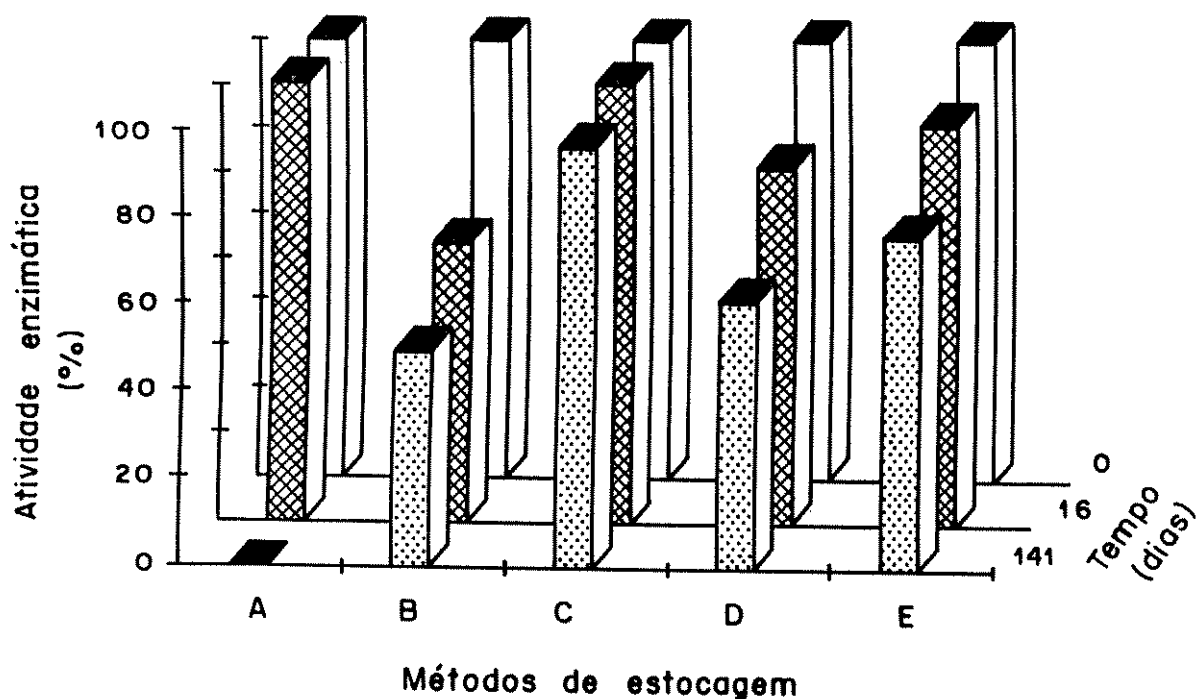


FIG. 8. Estabilidade de PDC durante a estocagem em diferentes condições, avaliada pela determinação da atividade enzimática de amostras obtidas após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. PDC A<sub>2</sub>. A: 4°C; B: -20°C; C: -70°C; D: 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, -20°C; E: 50% glicerol, -20°C. Os resultados são médias de três repetições analíticas de cada amostra.

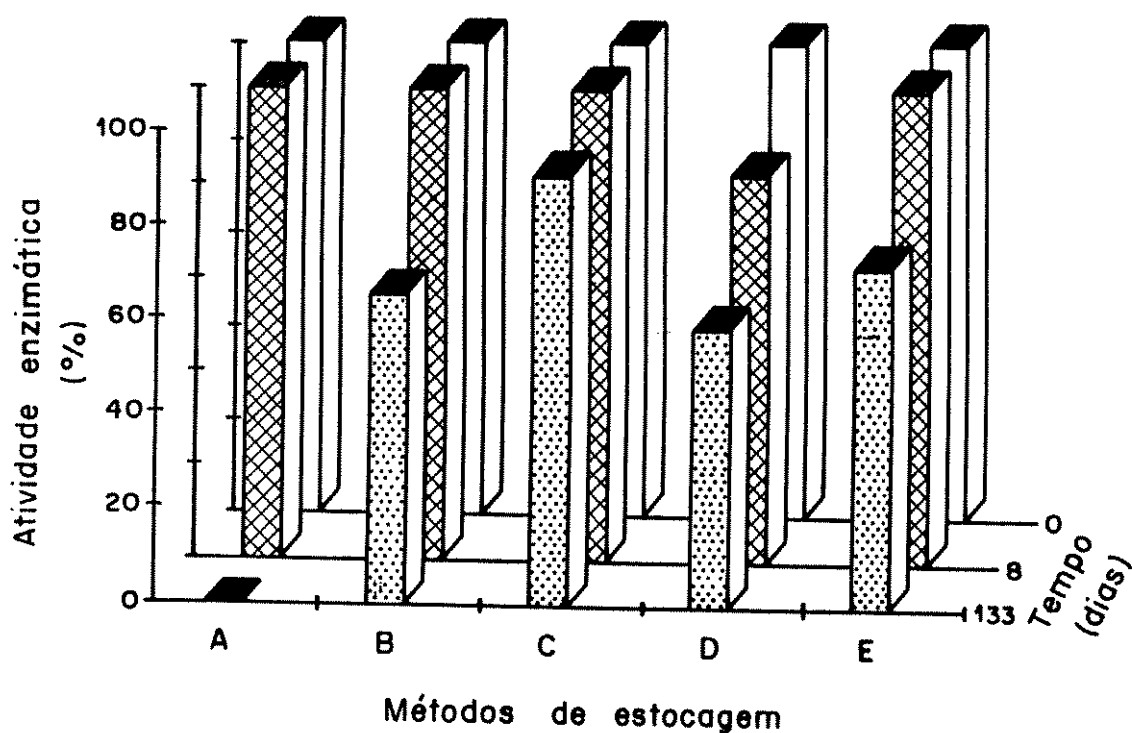


FIG. 9. Estabilidade de PDC durante a estocagem em diferentes condições, avaliada pela determinação da atividade enzimática de amostras obtidas após cromatografia de troca iônica em DEAE-Sephacel. PDC B. A: 4°C; B: -20°C; C: -70°C; D: 75%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , -20°C; E: 50% glicerol, -20°C. Os resultados são médias de três repetições analíticas de cada amostra.

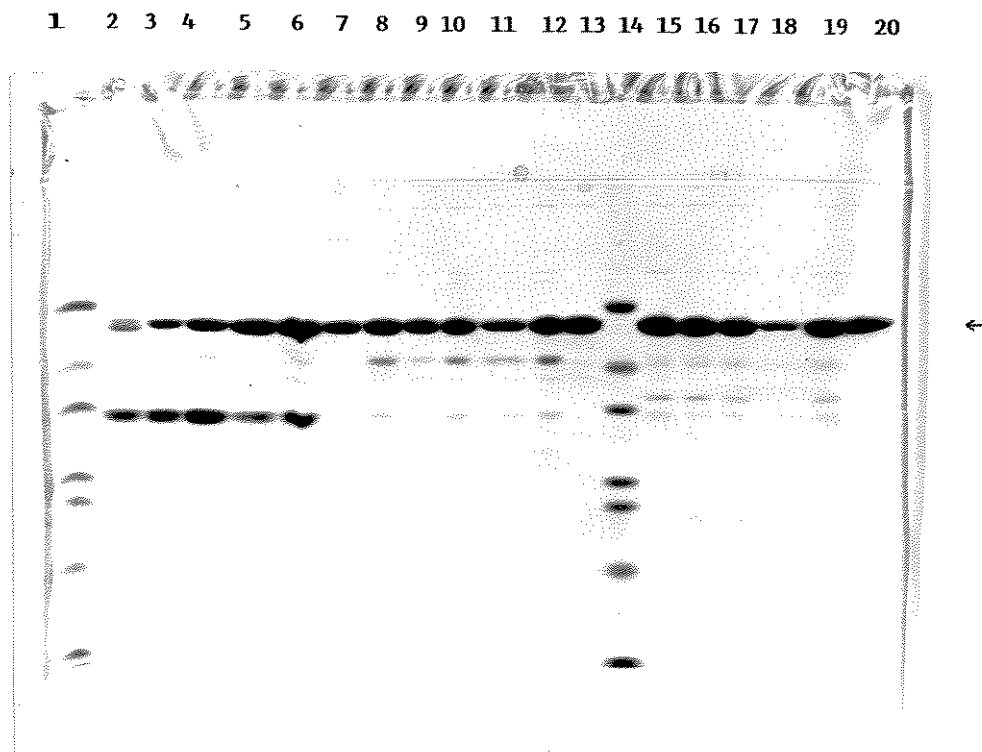


FIG. 10. PAGE-SDS 12,5%, mostrando o grau de pureza de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B após cromatografia em DEAE-Sephacel e estocagem em diferentes condições por 20, 16 e 8 dias para PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B, respectivamente. Coloração pelo azul de Coomassie. A seta indica a enzima em questão.

1 e 14 - Padrões: albumina de soro bovino (66000 D), ovalbumina (45000 D), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36000 D), anidrase carbônica (29000 D), tripsinogênio (24000 D), inibidor da tripsina (20100 D),  $\beta$ -lactalbumina (14200 D). Sigma SDS-7 (Dalton mark VII-L).

7, 13 e 20 - Amostras da última etapa de purificação (filtração em gel Aca 22), correspondendo a PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B, respectivamente.

2 a 6, 8 a 12 e 15 a 19 - Amostras da penúltima etapa de purificação (coluna DEAE-Sephacel), correspondendo a PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B, respectivamente, estocadas: 2, 8 e 15. a 4°C; 3, 9 e 16. a -20°C; 4, 10 e 17. a -70°C; 5, 11 e 18. em 75% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a -20°C; 6, 12 e 19. em 50% glicerol a -20°C.

de calibração (Figura 11) obtida a partir do gel da Figura 10, a proteína intacta apresentou uma massa molecular de 55614 D, em sua forma monomérica, enquanto a lisada, 53945 D, de onde se deduz que cerca de 15 resíduos de aminoácidos foram removidos. Ainda analisando o gel, observa-se que as duas bandas (proteína intacta e lisada) apresentam intensidades semelhantes. Assumindo que a proteína intacta é ativa e a lisada, inativa, seria de se esperar uma redução na atividade de aproximadamente 50%. A queda observada, no entanto, foi muito maior (97,4%), o que pode indicar que a suposta proteína "intacta" sofreu, na realidade, de alguma forma, uma alteração, talvez conformacional, que levou à perda de atividade.

Deve-se considerar, também, que, no extrato bruto, a enzima em questão está, de certa forma, mais protegida do ataque proteolítico, uma vez que, proporcionalmente, sua quantidade é muito pequena em relação ao teor de proteína total, razão pela qual a perda de atividade foi mais drástica nas amostras cromatografadas.

A -20°C, houve, para o experimento em aerobiose/anaerobiose, uma queda de atividade enzimática de 100%, no extrato bruto obtido após 2 horas de fermentação, de 80% após 4 horas, nenhuma perda de atividade após 6 horas, e uma aparente ativação nas amostras colhidas de 8 a 20 horas; para o experimento em anaerobiose, uma redução de 100% foi observada após 2 horas, de 90% após 4 horas e uma ativação de 6 a 20 horas (Figuras 5c e 6b). Esses resultados são

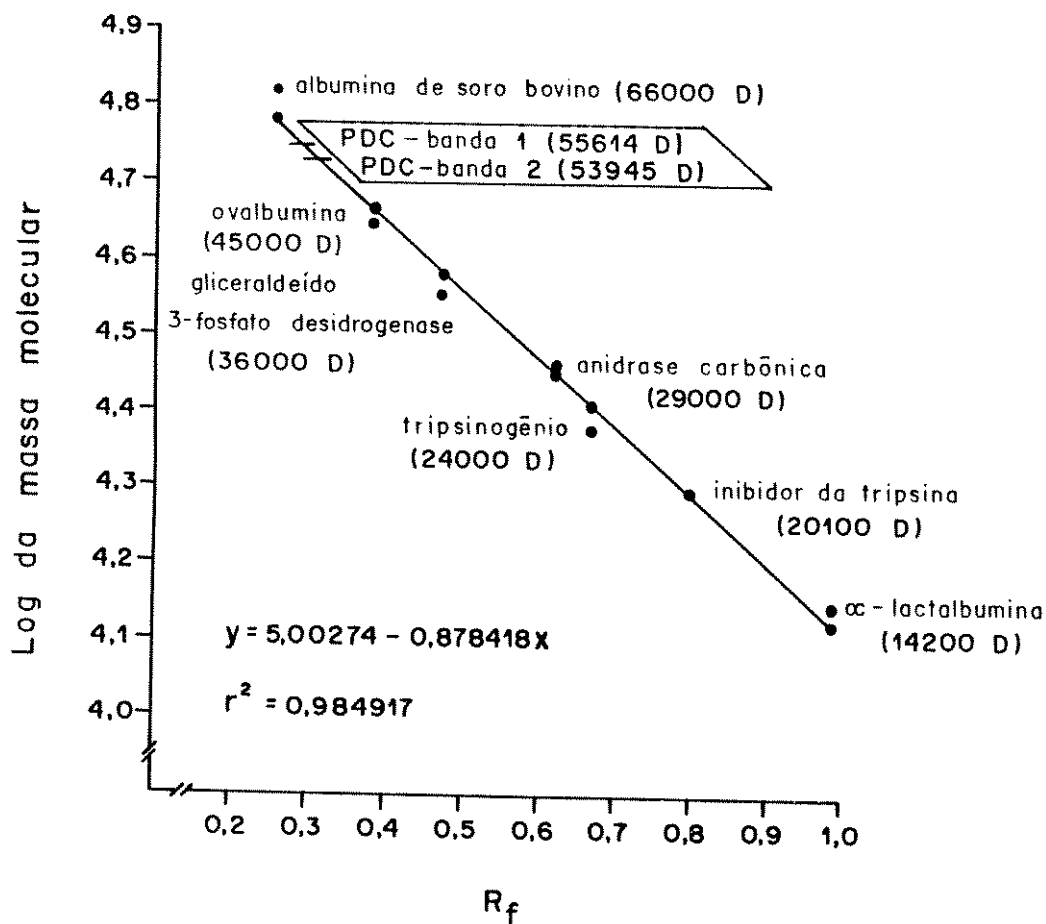


FIG. 11. Curva de calibração para determinação da massa molecular de PDC por PAGE-SDS derivada do gel da figura 10.

paradoxais, pelo menos aparentemente, pois, enquanto a queda de atividade indica que a enzima não resiste a tal temperatura, a ativação, observada nas fases exponencial e estacionária de crescimento, indica justamente o contrário. Devido à complexidade da composição do extrato bruto e à falta de estudos mais aprofundados, é difícil discernir o que realmente acontece. A aparente ativação pode indicar a presença de algum inibidor, que foi inativado pelo congelamento, ou a simples remoção de componentes que precipitam a essa temperatura, uma vez que as amostras foram centrifugadas antes da realização do ensaio enzimático. Sabe-se que muitas proteínas não resistem ao congelamento, sofrendo alterações que vão desde pequenas modificações conformacionais, que levam à perda de suas funções biológicas, até completa desnaturação. Isso, por si só, já levaria a um aumento na concentração da enzima em estudo, o que justificaria o aumento de atividade observado.

A  $-70^{\circ}\text{C}$ , só houve perda de atividade após 2 horas de crescimento, tendo sido de 50% no caso do experimento em aerobiose/anaerobiose e de 10% em anaerobiose; no intervalo de 4 a 20 horas, houve uma ativação da enzima, à semelhança do que ocorreu a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 6d). A adição de 50% glicerol levou a resultados menos discrepantes, quer quando o extrato bruto foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 6c), quer a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Figura 6e).

Quando amostras da coluna DEAE-Sephacel foram submetidas a um teste similar, resultados condizentes com o esperado foram obtidos. Assim, uma queda na atividade enzimática, avaliada

após cerca de quatro meses e meio, foi observada em todas as condições de estocagem, tendo as menores perdas sido observadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Figuras 7C, 8C e 9C) e em 50% glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figuras 7E, 8E e 9E) e as maiores, a  $4^{\circ}\text{C}$  (Figuras 7A, 8A e 9A). Foi observada uma intensa precipitação em todas as amostras estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  desde a primeira medida de atividade, isto é, após 20, 16 e 8 dias, para os picos  $A_1$ ,  $A_2$  e B, respectivamente. As amostras estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e em 50% glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  conservaram-se límpidas, sem nenhuma precipitação, durante todo o teste, enquanto que, na segunda avaliação, isto é, após cerca de quatro meses e meio, as amostras conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$  apresentaram-se leitosas, com perda total de atividade.

#### **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PDC**

As seguintes medidas anti-proteolíticas foram adotadas:

- a) substituição da peptona, como fonte de nitrogênio, por sulfato de amônio, evitando o estímulo à síntese de proteases necessárias à hidrólise da peptona para torná-la assimilável pela levedura;
- b) colheita das células na fase exponencial para evitar a atividade proteolítica que ocorre na fase estacionária;
- c) uso de agentes anti-proteolíticos durante todo o processo de purificação da enzima: pepstatina A, inibidor da protease A (EC 3.4.23.6; uma endopeptidase da classe das aspártico proteinases) e PMSF, inibidor das proteases B

(EC 3.4.21.48; uma endopeptidase da classe das serina proteinases) e C (EC 3.4.16.1; uma exopeptidase da classe das serina proteinases, também chamada de carboxipeptidase Y). As metaloproteinases (no caso de levedura, a glicina carboxipeptidase, EC 3.4.17.4), que requerem metais divalentes para suas atividades, podem ser inibidas por complexação dos íons metálicos com agentes quelantes como o EDTA (Scopes, 1982), porém como PDC também requer um metal divalente ( $Mg^{2+}$ ) para sua atividade, este tipo de inibidor foi omitido. Maitra & Lobo (1971) verificaram que álcool desidrogenase de levedura é instável na presença de EDTA. Inibidores das cisteína proteinases não foram utilizados porque nenhuma referência a proteases de leveduras dessa classe foi encontrada na literatura. Pepstatina A e PMSF foram também utilizados para a purificação de enzimas de leveduras por outros autores (Scopes et al., 1981; Welch & Scopes, 1981 e 1985);

- d) execução de todo o processo de purificação a 4°C;
- e) estocagem da enzima em 50% glicerol a -20°C, conforme resultados deste trabalho. A proteção de PDC pelo glicerol foi também constatada por Juni & Heym (1968).

Apesar dessas medidas, a hipótese de uma proteólise deve ser sempre considerada. O tratamento repetido com PMSF ou DFP durante a purificação, por exemplo, não impediu o subsequente aparecimento de contaminantes proteolíticos sensíveis aos produtos pelo menos em dois casos, o da malato desidrogenase e o da hexoquinase; presumivelmente, este efeito se deve à



co-purificação de um complexo inativo protease-polipeptídeo inibidor (e, portanto, resistente ao PMSF ou DFP) com a proteína de interesse, o qual é subsequentemente clivado liberando a enzima ativa (Pringle, 1975).

A curva de crescimento da levedura S. cerevisiae MC16 em dois fermentadores de 60 l, com base no número total de células e na percentagem de células em brotamento, está apresentada na Figura 12. As fermentações foram interrompidas na fase final do crescimento exponencial, de acordo com resultados obtidos num experimento anterior.

A enzima apresentou um comportamento característico sempre que foi submetida à purificação em colunas cromatográficas de troca iônica, subdividindo-se em dois picos ativos, eluindo em tampão fosfato de potássio a 22 e 37mM, após passagem na primeira coluna, denominados PDC A e PDC B, respectivamente (Figura 13). Quando recromatografados, dois outros picos eluíram em 39 e 45mM, PDC A<sub>1</sub> e PDC A<sub>2</sub>, respectivamente, no caso de PDC A (Figura 14) e um único, em 38 mM, no caso de PDC B (Figura 15). As concentrações molares do tampão de eluição foram calculadas a partir das medidas de condutividade (Figura 16). A cromatografia das três formas da enzima por filtração em gel AcA 22 (Figuras 17, 18 e 19) revelou um único pico ativo para PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B.

Os dados de purificação estão apresentados na Tabela II. A curva padrão para proteína utilizada nas etapas anteriores às cromatográficas é mostrada na Figura 20 e o grau de pureza das três formas da enzima isoladas pode ser constatado nos

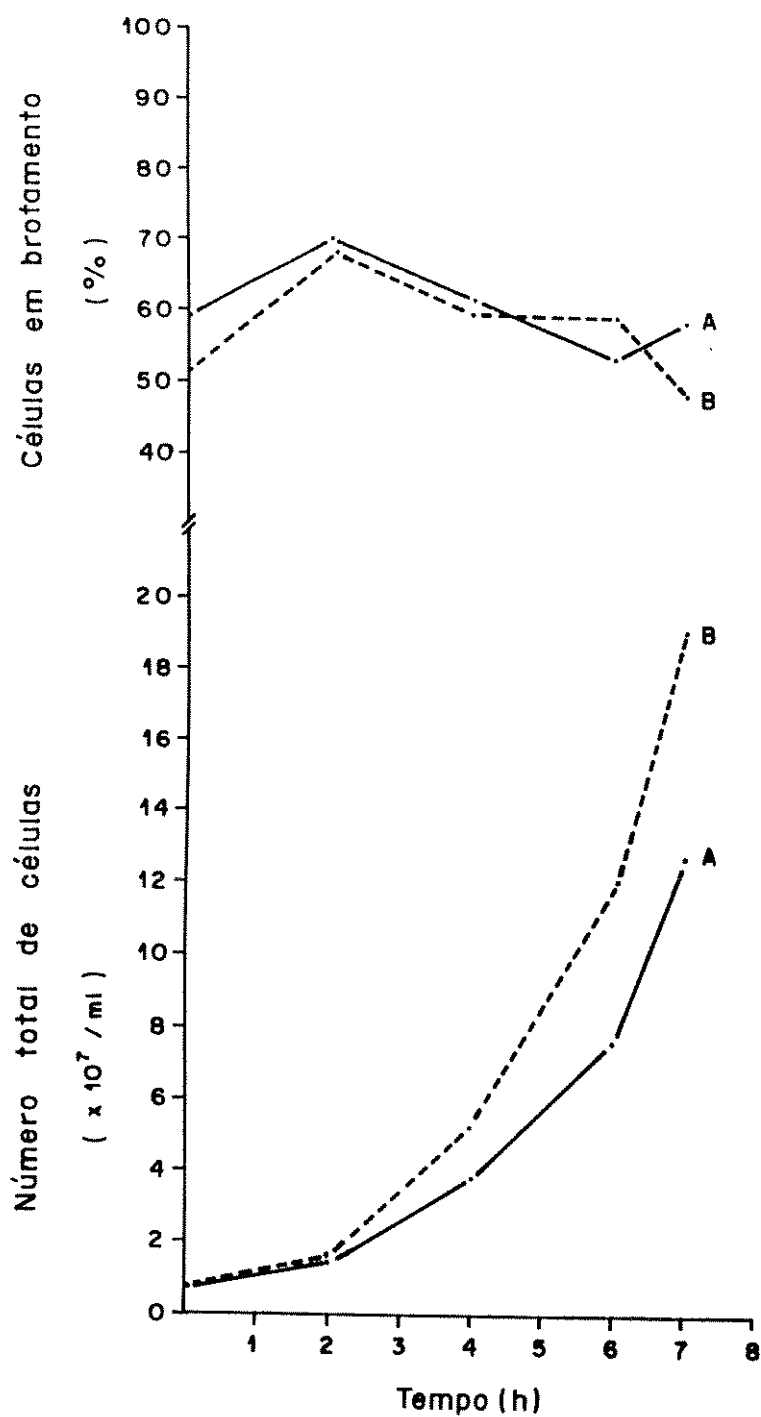


FIG. 12. Crescimento de *S. cerevisiae* MC 16 em fermentadores de 60 litros (A e B) com vistas à produção e à purificação de PDC.

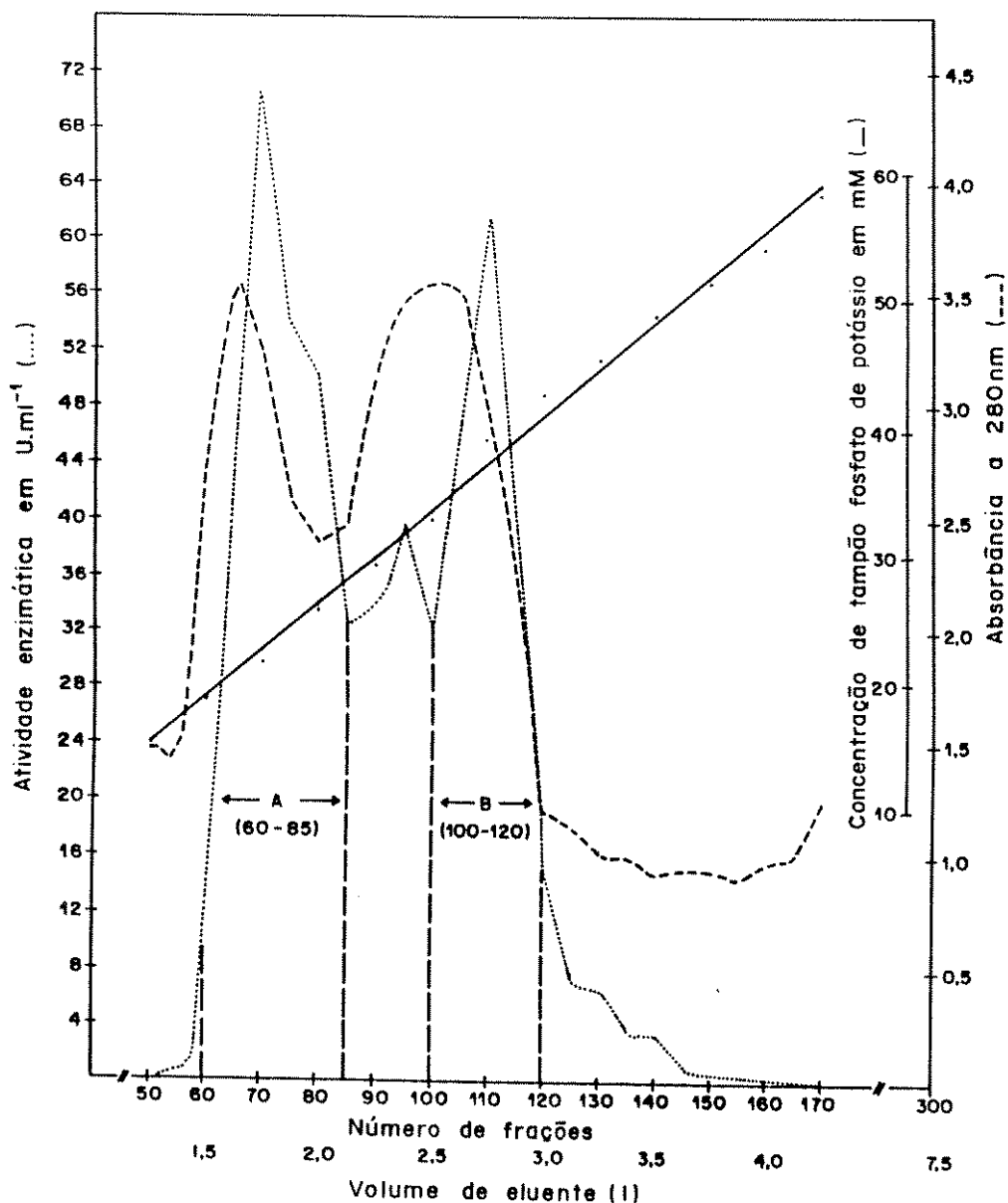


FIG. 13. Cromatografia de troca iônica em resina DE 52 (dietilaminoetil celulose; Whatman), equilibrada com tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, contendo 1mM  $MgSO_4$ , 10 $\mu$ M TPP, 0,1mM PMSF, 10<sup>-4</sup>mM pepstatina A e 5mM  $\beta$ -mercaptoetanol; a eluição foi realizada com um gradiente linear de 10-100mM do mesmo tampão; coluna Pharmacia K 50/60 (50mm de diâmetro interno x 60cm de comprimento) com um leito de 880ml; fluxo, mantido por bomba peristáltica, de 190ml/h. Piruvato descarboxilase eluiu como dois picos ativos, designados A e B, em concentrações de tampão fosfato de potássio de 22 e 37mM, respectivamente.

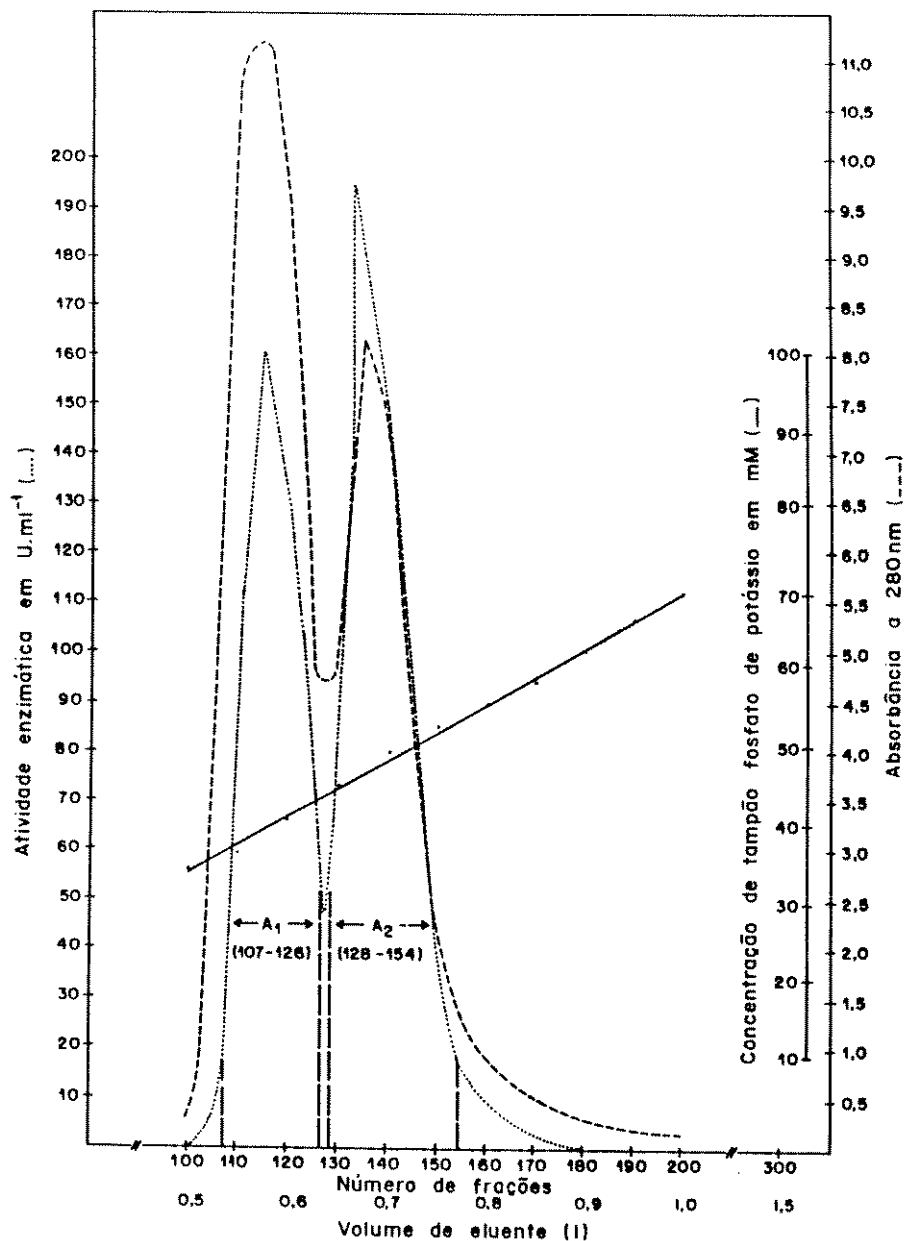


FIG. 14. Cromatografia de troca iônica de PDC A em resina DEAE-Sephacel (dietilaminoetil celulose; Pharmacia), equilibrada e eluída como descrito na figura 13; coluna Pharmacia K 26/40 (26mm de diâmetro interno x 40cm de comprimento) com um leito de 190ml; fluxo, mantido por bomba peristáltica, de 40ml/h. PDC A se subdividiu em dois outros picos ativos, designados A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>, os quais eluíram em concentrações de tampão fosfato de potássio de 39 e 45mM, respectivamente.

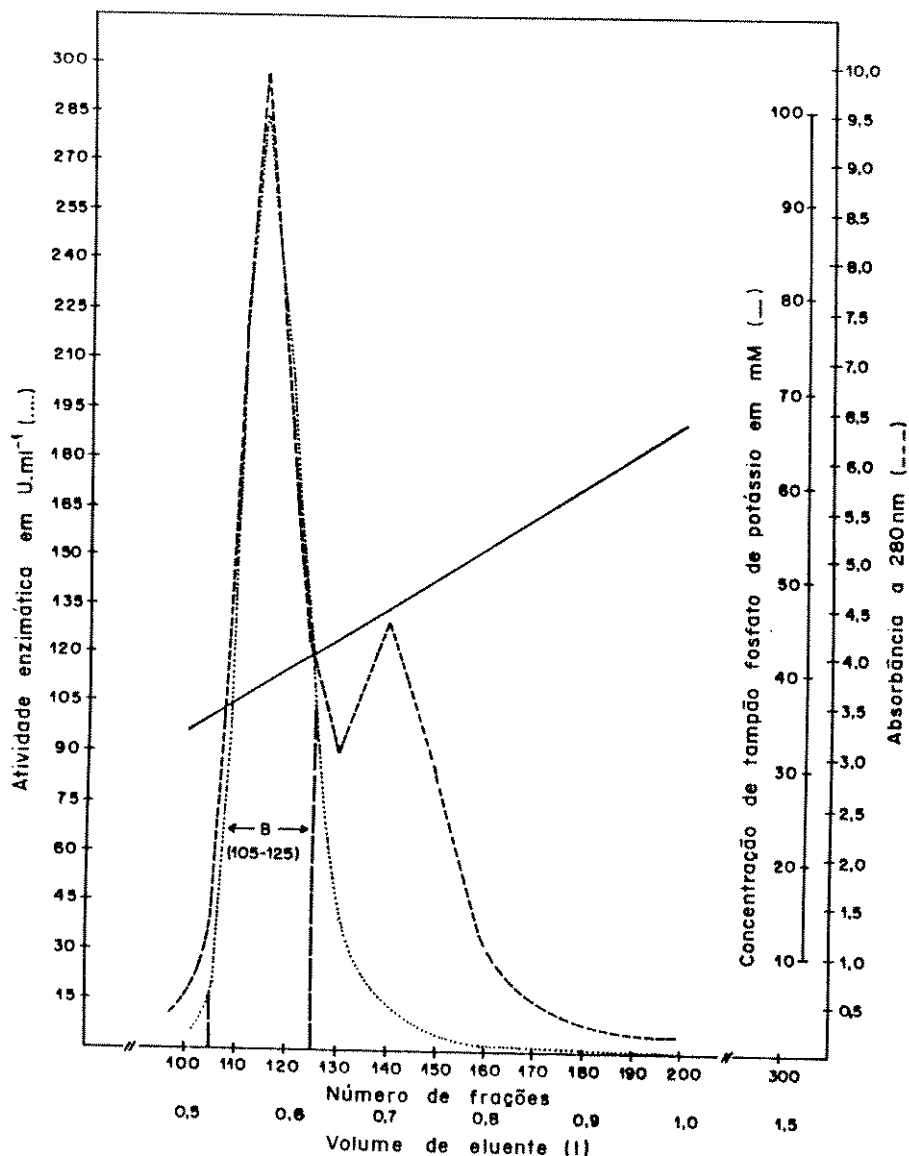


FIG. 15. Cromatografia de troca iônica de PDC B em resina DEAE-Sephacel (dietilaminoetil celulose; Pharmacia), equilibrada e eluída como descrito na figura 13; coluna Pharmacia K 26/40 (26mm de diâmetro interno x 40cm de comprimento) com um leito de 190ml; fluxo, mantido por bomba peristáltica, de 40ml/h. PDC B eluiu como um pico ativo e um inativo nas concentrações de tampão fosfato de potássio de 38 e 45mM, respectivamente.

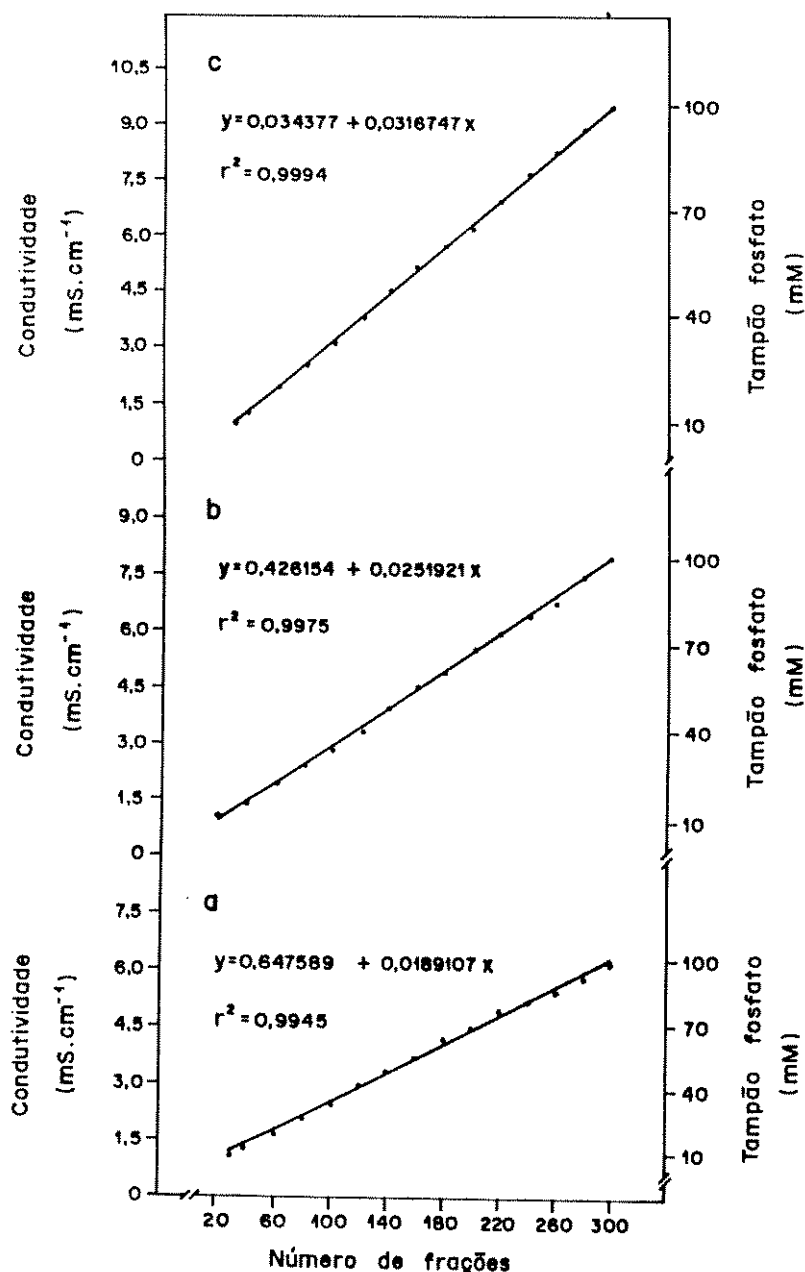


FIG. 16. Relação entre condutividade e concentração molar do tampão fosfato de potássio utilizado na eluição das colunas de troca iônica: a. DE-52 (figura 13); b. DEAE-Sephacel-PDC A (figura 14); e c. DEAE-Sephacel-PDC B (figura 15). As equações apresentadas foram obtidas a partir dos valores de condutividade determinados experimentalmente.

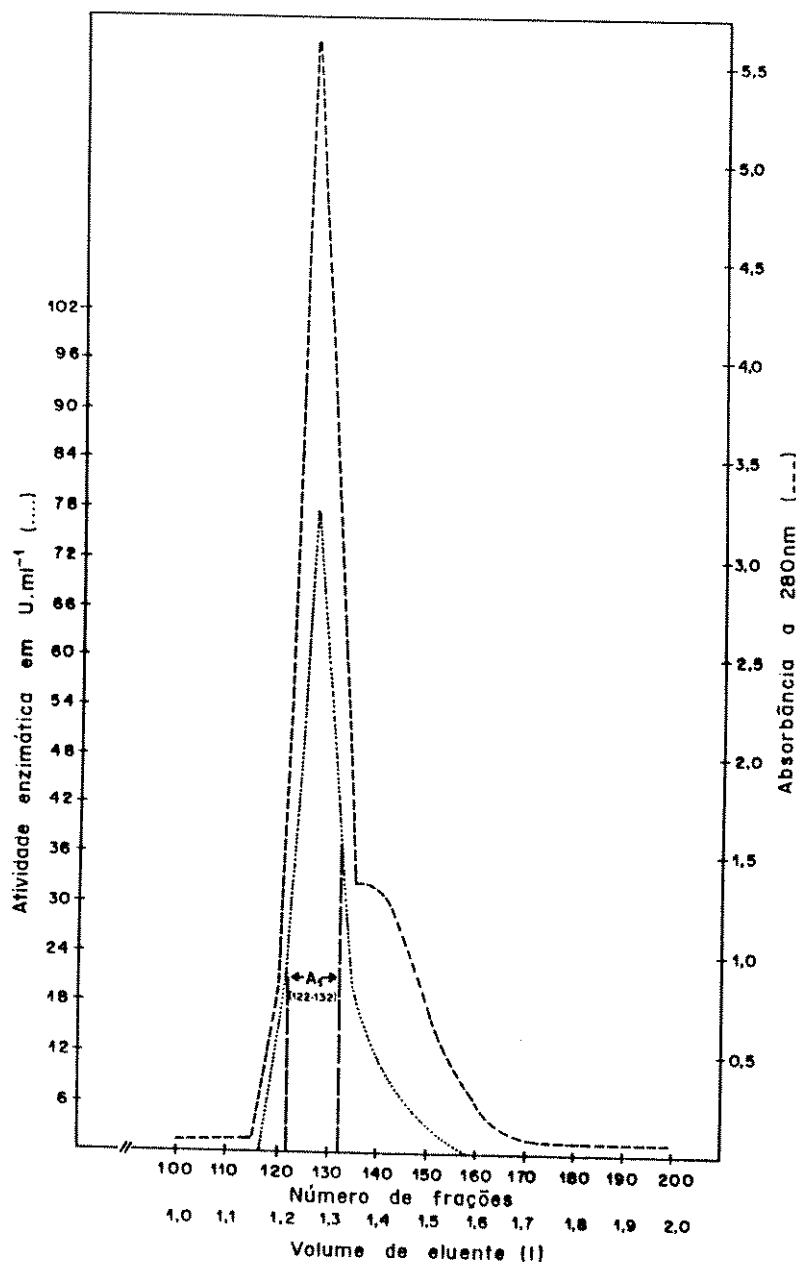


FIG. 17. Cromatografia de filtração em Ultrogel Aca 22 (2% acrilamida + 2% agarose; LKB/Pharmacia) equilibrado e eluído com tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, contendo aditivos descritos na figura 13; coluna Pharmacia K 50/100 (50mm de diâmetro interno x 100cm de comprimento) com um leito de 1,8 litros; fluxo, mantido por bomba peristáltica, de 49ml/h ou 2,5cm/h. PDC A<sub>1</sub>

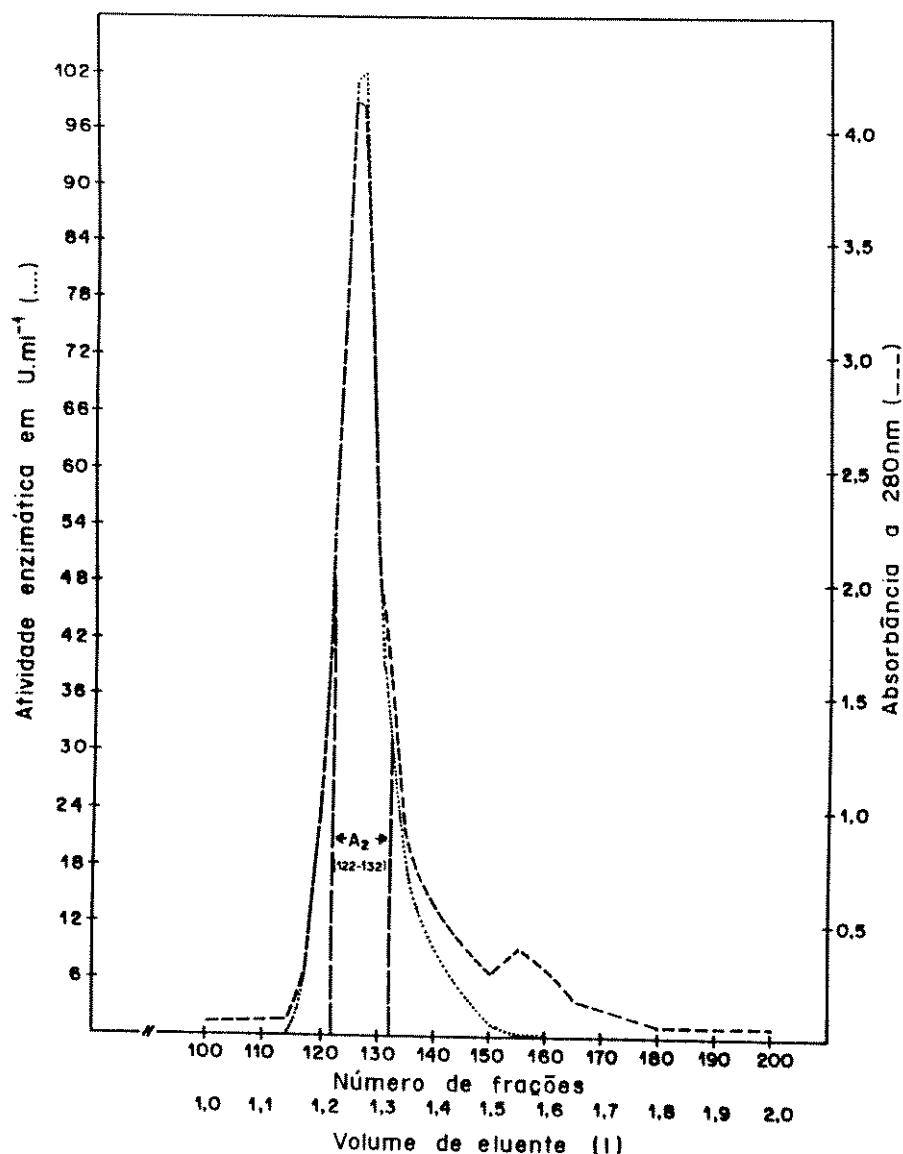


FIG. 18. Cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 22 (2% acrilamida + 2% agarose; LKB/Pharmacia) equilibrado e eluído com tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, contendo aditivos descritos na figura 13; coluna Pharmacia K 50/100 (50mm de diâmetro interno x 100cm de comprimento) com um leito de 1,8 litros; fluxo, mantido por bomba peristáltica, de 49ml/h ou 2,5cm/h. PDC A<sub>2</sub>



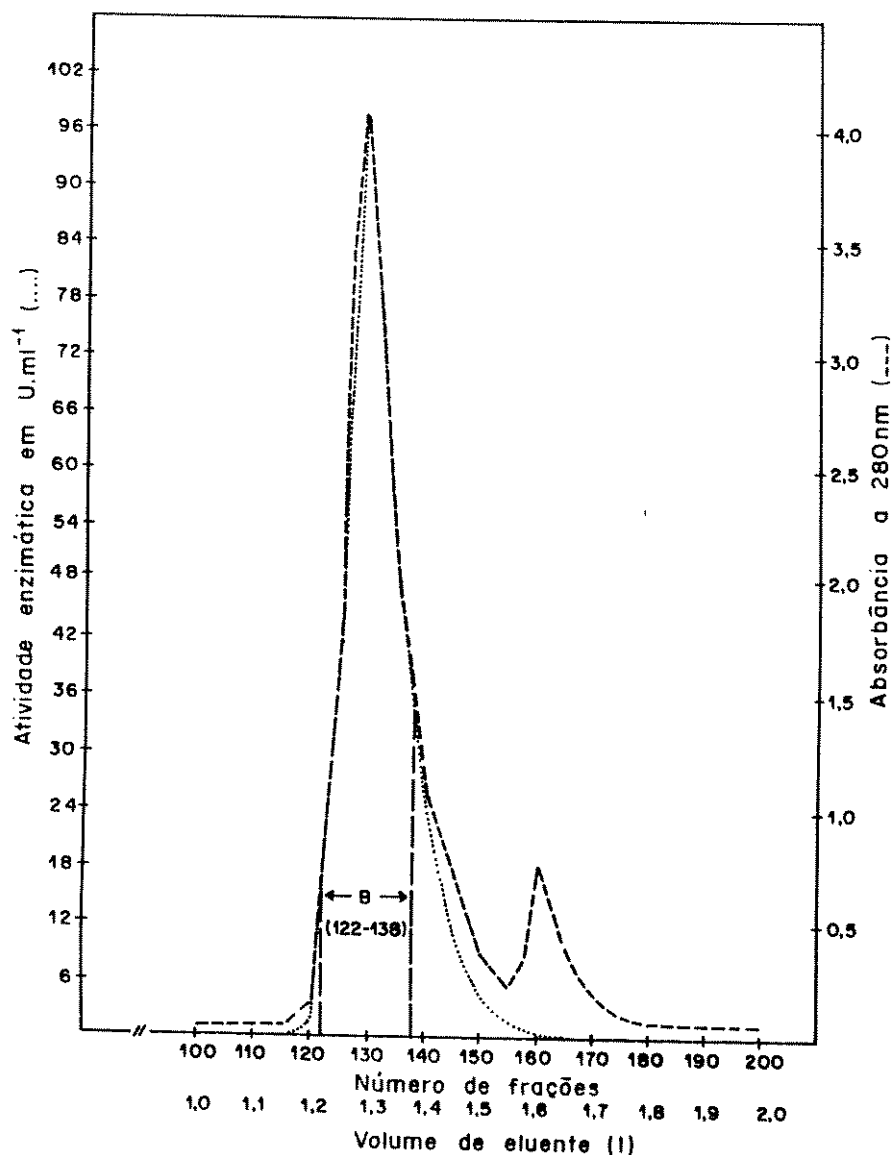


FIG. 19. Cromatografia de filtração em Ultrogel AcA 22 (2% acrilamida + 2% agarose; LKB/Pharmacia) equilibrado e eluído com tampão fosfato de potássio 10mM, pH 6,3, contendo aditivos descritos na figura 13; coluna Pharmacia K 50/100 (50mm de diâmetro interno x 100cm de comprimento) com um leito de 1,8 litros; fluxo, mantido por bomba peristáltica, de 49ml/h ou 2,5cm/h. PDC B

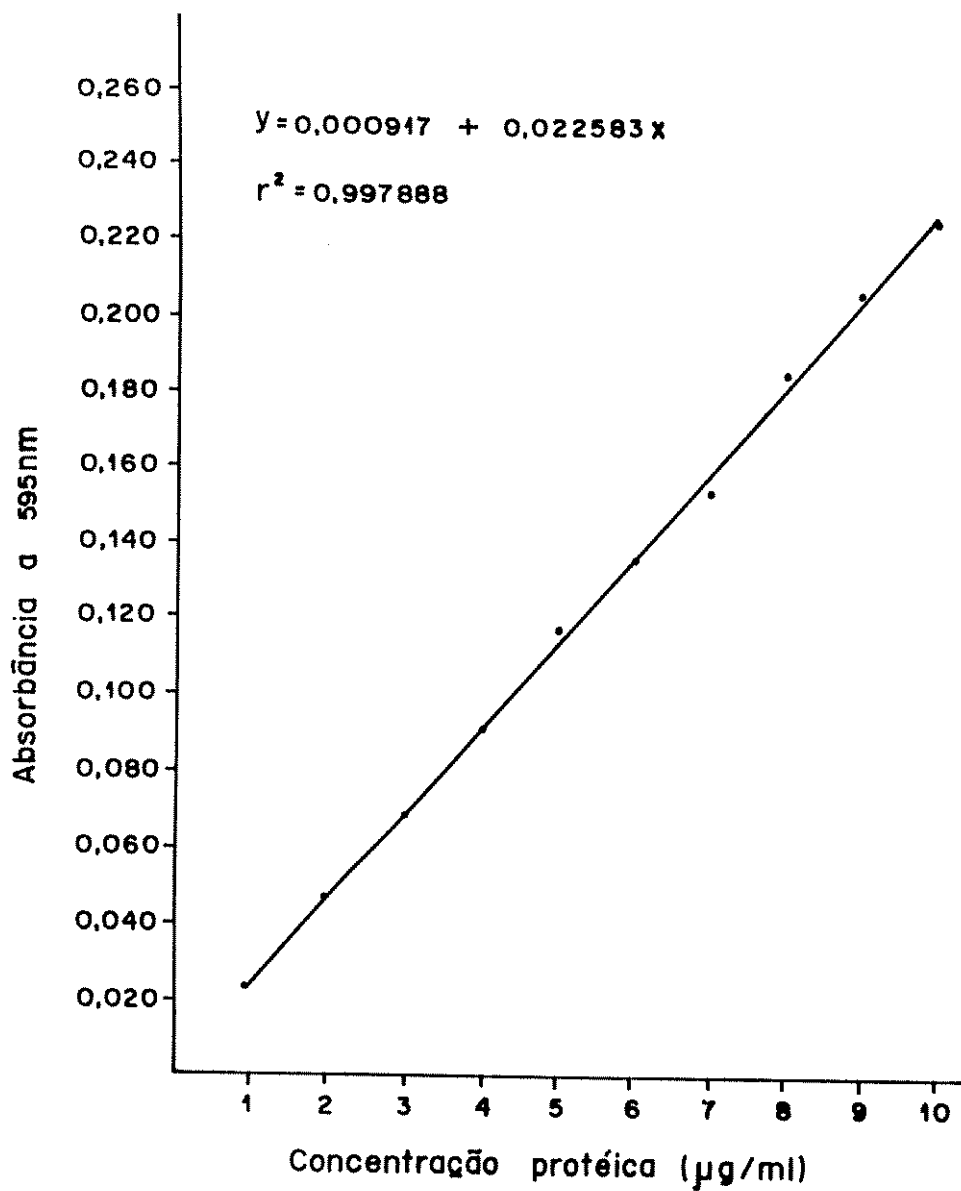


FIG. 20. Curva padrão para proteína (soroalbumina bovina em tampão 10mM  $K_3PO_4$  pH 6,3 + 1mM  $MgSO_4$  + 10µM TPP) pelo método Bio-Rad.

géis das Figuras 21 e 22.

TABELA II. Purificação de PDC de *S. cerevisiae* MC 16 a partir de 120 litros de cultura ou 1600 g de células (peso úmido).

| Etapas de purificação                                               | Volume<br>(ml) | Proteína <sup>a</sup> |               | Atividade |              |                      | Fator de<br>Purifi-<br>cação<br>(x) | Rendi-<br>mento<br>(%) |
|---------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------------|---------------|-----------|--------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|
|                                                                     |                | (mg/ml)               | total<br>(mg) | (U/ml)    | total<br>(U) | específica<br>(U/mg) |                                     |                        |
| 1. Extrato bruto                                                    | 3914           | 28,801                | 11 2727       | 32,470    | 127 088      | 1,13                 | 1,0                                 | 100                    |
| 2. Precipitação<br>estreptomicona                                   | 3740           | 13,515                | 50 546        | 32,340    | 120 952      | 2,39                 | 2,12                                | 95,2                   |
| 3. Fracionamento<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |                |                       |               |           |              |                      |                                     |                        |
| 0-45%                                                               | 4090           | 10,747                | 43 957        | 27,810    | 113 743      | 2,59                 | 2,29                                | 89,5                   |
| 45-75%                                                              | 1000           | 31,015                | 31 015        | 114,290   | 114 290      | 3,68                 | 3,26                                | 89,9                   |
| 4. Cromatografia<br>de troca iônica<br>em DE 52                     |                |                       |               |           |              |                      |                                     |                        |
| Pool A                                                              | 575            | 2,850                 | 1 639         | 47,330    | 27 215       | 16,60                | 14,69                               | 21,4                   |
| Pool B                                                              | 485            | 2,740                 | 1 329         | 41,431    | 20 094       | 15,12                | 13,38                               | 15,8                   |
| A + B                                                               | 1060           | 2,800                 | 2 968         | 44,631    | 47 309       | 15,86                | 14,11                               | 37,2                   |
| 5. Cromatografia<br>de troca iônica<br>em DEAE-Sephacel             |                |                       |               |           |              |                      |                                     |                        |
| Pool A <sub>1</sub>                                                 | 91             | 8,857                 | 806           | 108,703   | 9 892        | 12,27                | 10,86                               | 7,8                    |
| Pool A <sub>2</sub>                                                 | 127            | 4,992                 | 634           | 102,079   | 12 964       | 20,43                | 18,08                               | 10,2                   |
| Pool B                                                              | 105            | 6,086                 | 639           | 178,495   | 18 742       | 29,31                | 25,94                               | 14,7                   |
| A <sub>1</sub> +A <sub>2</sub> +B                                   | 323            | 6,436                 | 2 079         | 128,786   | 41 598       | 20,67                | 17,01                               | 32,7                   |
| 6. Filtração em<br>gel AcA <sub>22</sub>                            |                |                       |               |           |              |                      |                                     |                        |
| Pool A <sub>1</sub>                                                 | 110            | 4,164                 | 458           | 51,800    | 5 698        | 12,45                | 11,02                               | 4,5                    |
| Pool A <sub>2</sub>                                                 | 110            | 3,045                 | 335           | 70,136    | 7 715        | 23,00                | 20,35                               | 6,1                    |
| Pool B                                                              | 170            | 2,429                 | 413           | 55,412    | 9 420        | 22,83                | 20,20                               | 7,4                    |
| A <sub>1</sub> +A <sub>2</sub> +B                                   | 390            | 3,092                 | 1 206         | 58,546    | 22 833       | 19,43                | 17,19                               | 18,0                   |

<sup>a</sup> A concentração de proteína nas três primeiras etapas de purificação foi determinada pelo método dos Laboratórios Bio-Rad (1981), que consiste em uma adaptação do método de Bradford (1976). Nas etapas cromatográficas, foi estimada a partir da absorbância a 280 nm, assumindo que 1 Unidade de A<sub>280</sub> = 1mg de proteína.

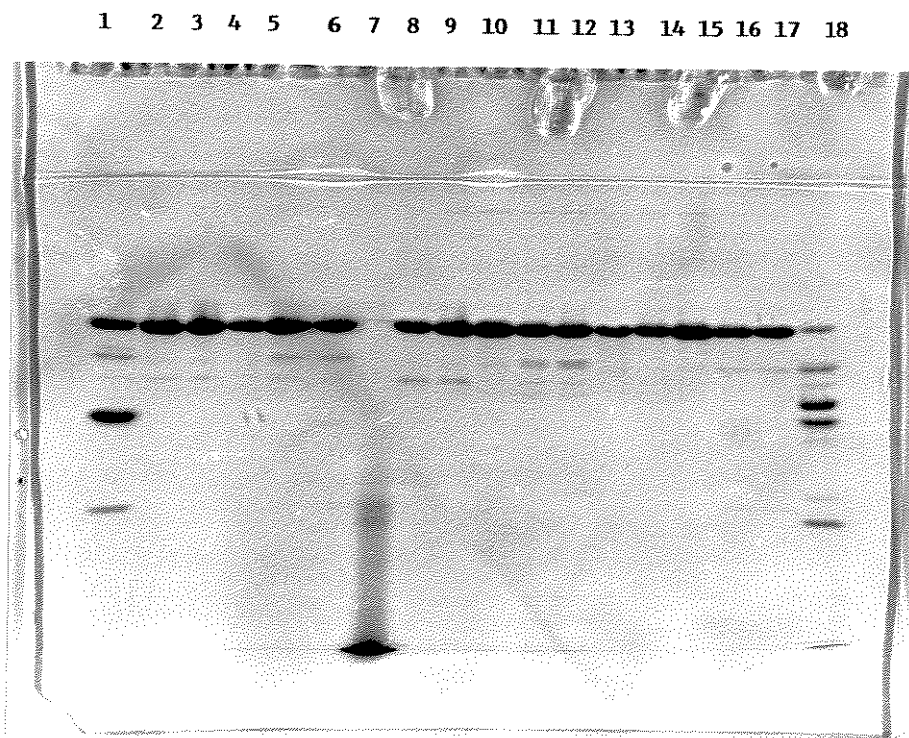


FIG. 21. PAGE-SDS 12,5% de frações da coluna de filtração em Ultrogel Aca 22. Coloração pelo azul de Coomassie.

1 a 6 - PDC A<sub>1</sub>, frações números 140, 120, 121, 127, 134 e 135, respectivamente.  
 7 - Padrão Sigma SDS-7 (Dalton mark VII-L).  
 8 a 12 - PDC A<sub>2</sub>, frações números 118, 119, 126, 134 e 135, respectivamente.  
 13 a 18 - PDC B, frações números 122, 123, 129, 139, 140 e 160, respectivamente.

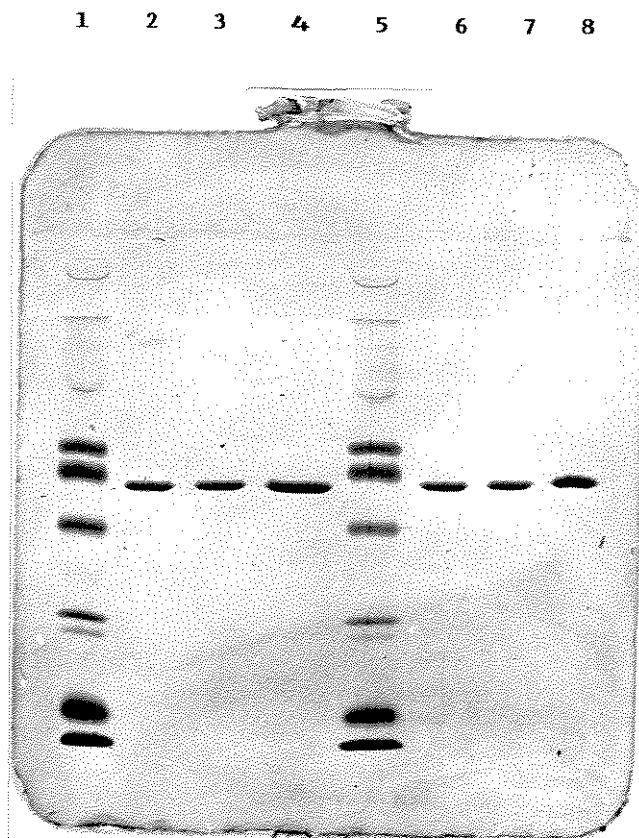


FIG. 22. PhastSystem (Pharmacia) PAGE-SDS 12,5% de PDC pura. Coloração pelo nitrato de prata. Quantidade de proteína: 200ng para PDC e 1µg para as seis proteínas marcadoras.

1 e 5 - Proteínas marcadoras (BDH): ovotransferrina (77000 D); albumina de soro bovino (66250 D); ovalbumina (45000 D), anidrase carbônica (30000 D); mioglobina (17200 D); e citocromo C (12300 D).

2 e 6 - PDC A<sub>1</sub>

3 e 7 - PDC A<sub>2</sub>

4 e 8 - PDC B

## II. ANÁLISE DA ESTRUTURA DAS FORMAS DE PDC ISOLADAS

### DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR - PAGE-SDS E FILTRAÇÃO EM GEL

O gel do qual foi derivada a massa molecular da enzima PDC está apresentado na Figura 22 e a respectiva curva de calibração na Figura 23. Uma massa molecular de 61211 D foi encontrada para o monômero das três formas de PDC isoladas, o que leva a um tetrâmero de 244844 D.

A curva de calibração obtida por filtração em gel - FPLC está apresentada na Figura 24 e os cromatogramas dos três picos de PDC são mostrados nas Figuras 25 a 27. As proteínas, quimotripsinogênio, ovalbumina e lactato desidrogenase apresentaram comportamento anômalo nas condições de tampão utilizadas, tendo, por isso, sido eliminadas da curva de calibração. A massa molecular da enzima PDC, assim estimada, foi de 203268 D, 213165 D e 223385 D para PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B, respectivamente. Esses valores estão abaixo do esperado pela seqüência deduzida a partir do gene PDC 1 (240295 D).

### DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO

A Figura 28 apresenta o gel da focalização isoelétrica, onde se pode observar que PDC A<sub>1</sub> se subdividiu em duas bandas, enquanto que PDC A<sub>2</sub> e PDC B focalizaram como uma

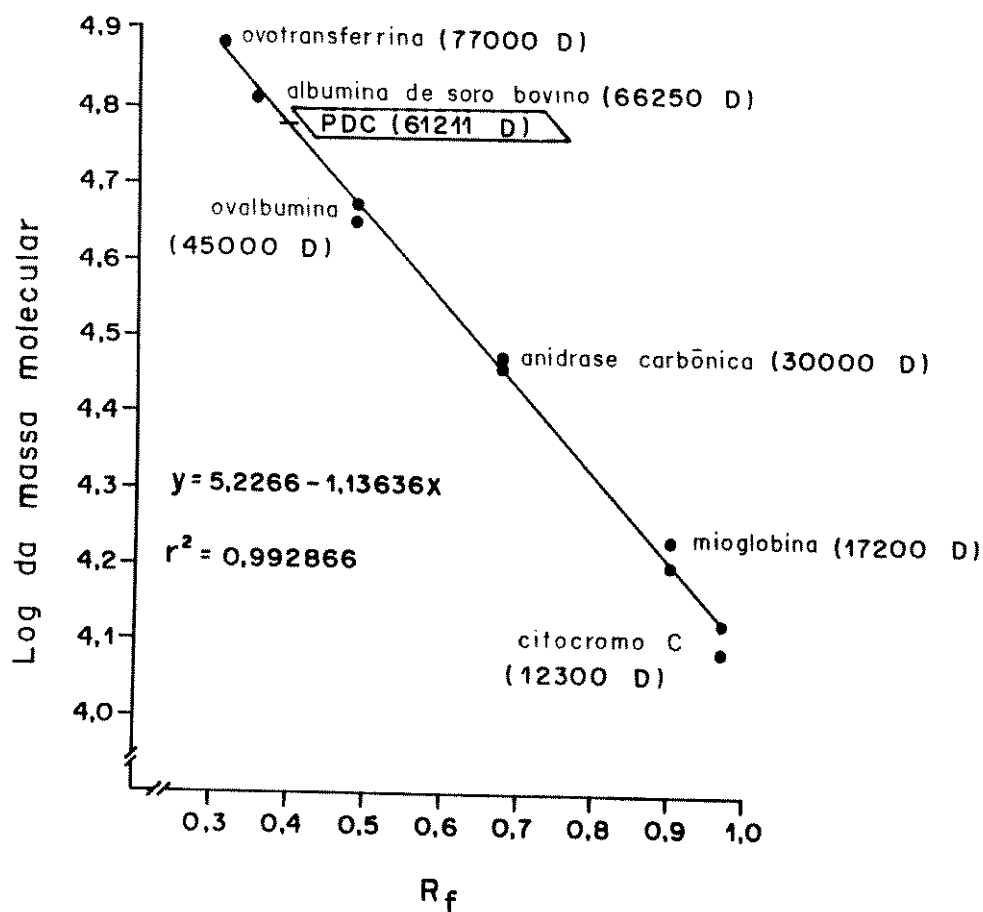


FIG. 23. Curva de calibração para determinação da massa molecular de PDC por PhastSystem (Pharmacia) PAGE-SDS derivada do gel da figura 22.

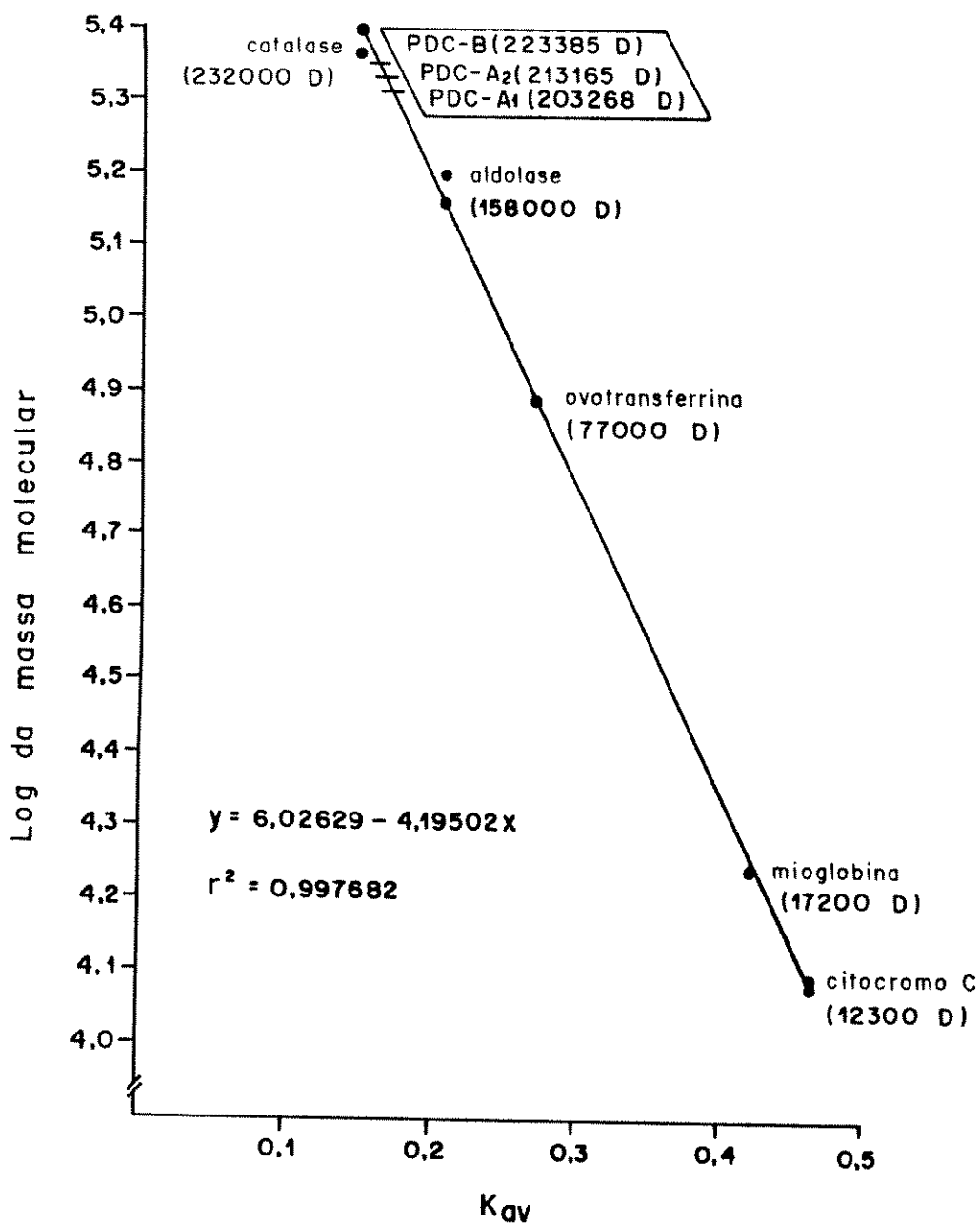


FIG. 24. Curva de calibração para determinação da massa molecular de PDC por filtração em gel - FPLC.



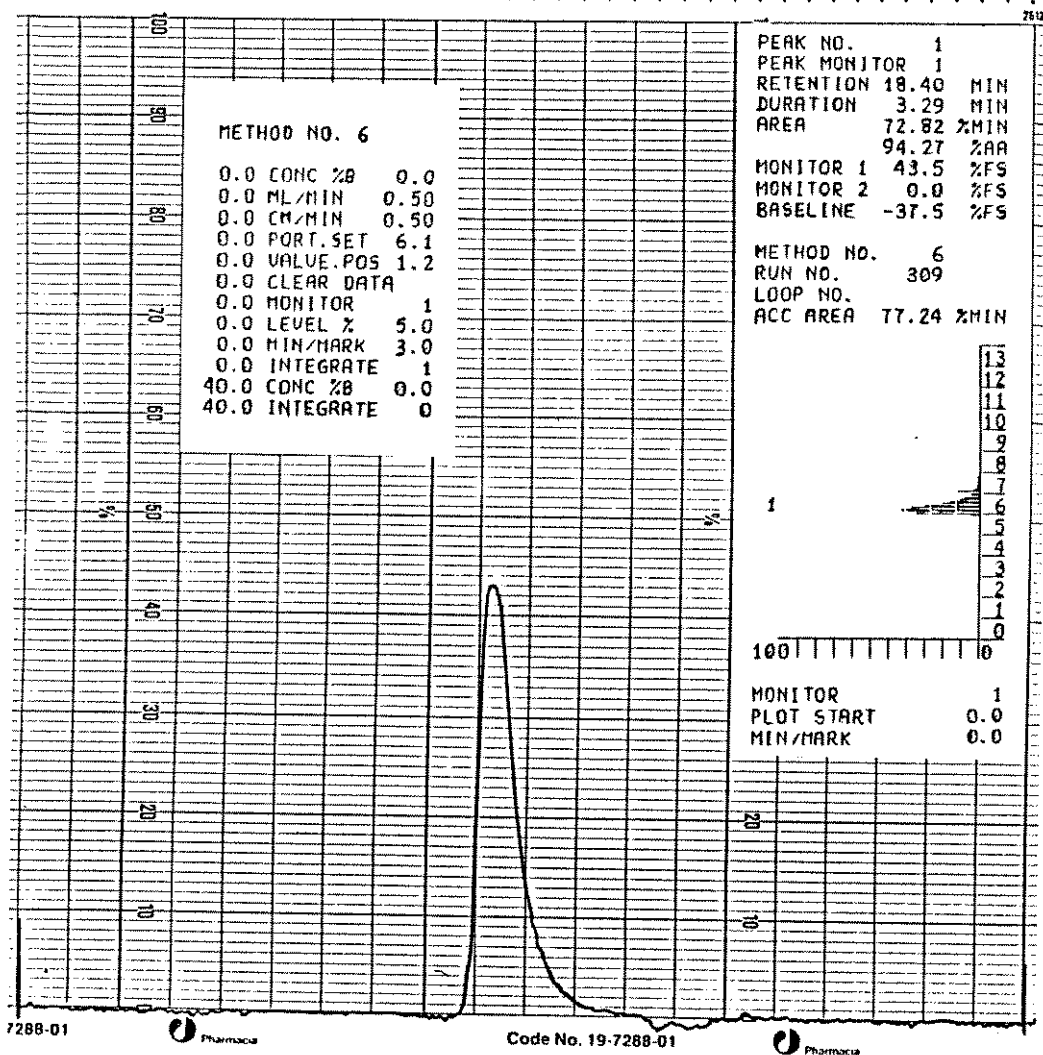


FIG. 25. Cromatograma de PDC A<sub>1</sub> (150µl de uma solução 2mg/ml) obtido num sistema de FPLC da Pharmacia. O cromatograma em primeiro plano corresponde ao obtido no registrador REC-482. No alto, à direita, é mostrado o cromatograma do controlador de cromatografia líquida LCC-500, onde se deve destacar o tempo de retenção; à esquerda, o respectivo método utilizado, incluindo o fluxo (0,5ml/min.), a velocidade do registrador (0,5cm/min.) e o tempo a que corresponde cada marca na abscissa (3,0min.).

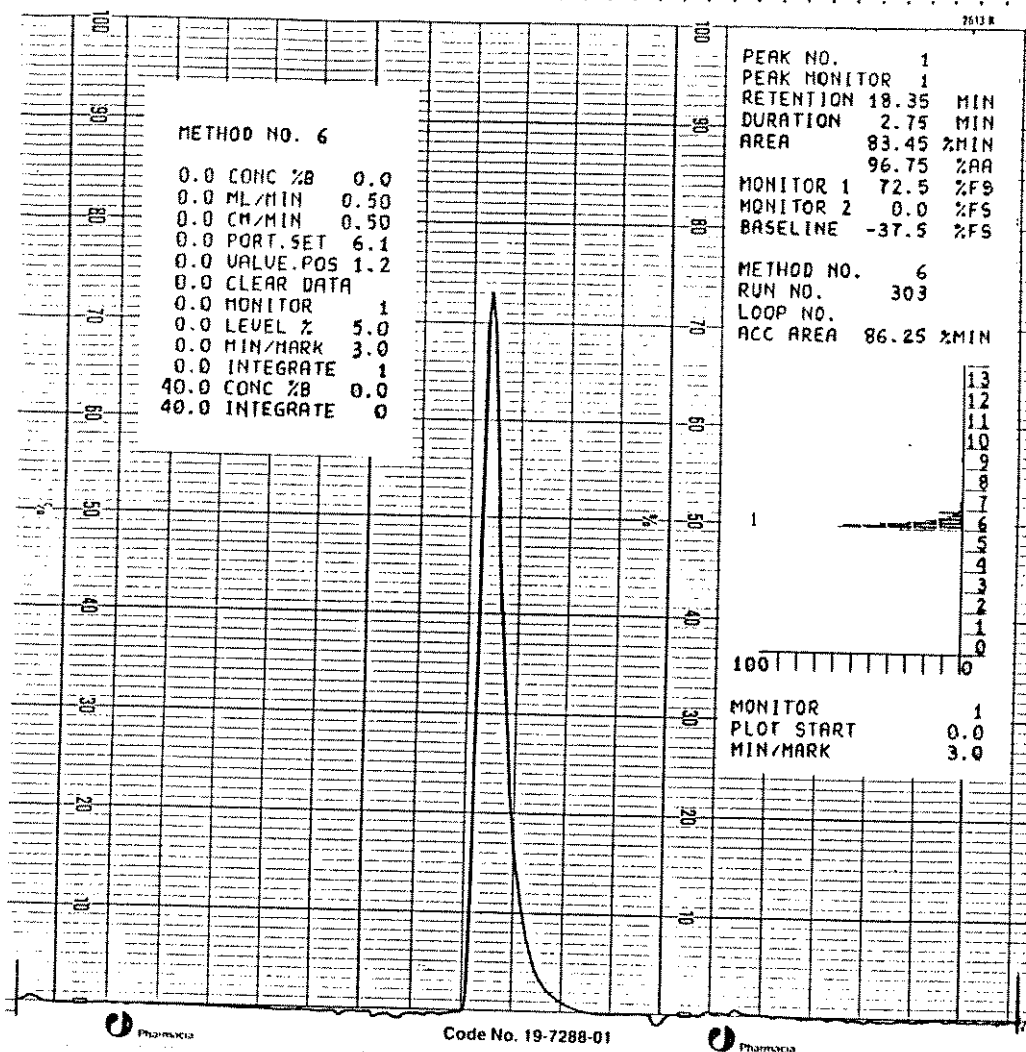


FIG. 26. Cromatograma de PDC A<sub>2</sub> (150µl de uma solução 2mg/ml) obtido num sistema de FPLC da Pharmacia. O cromatograma em primeiro plano corresponde ao obtido no registrador REC-482. No alto, à direita, é mostrado o cromatograma do controlador de cromatografia líquida LCC-500, onde se deve destacar o tempo de retenção; à esquerda, o respectivo método utilizado, incluindo o fluxo (0,5ml/min.), a velocidade do registrador (0,5cm/min.) e o tempo a que corresponde cada marca na abscissa (3,0min.).

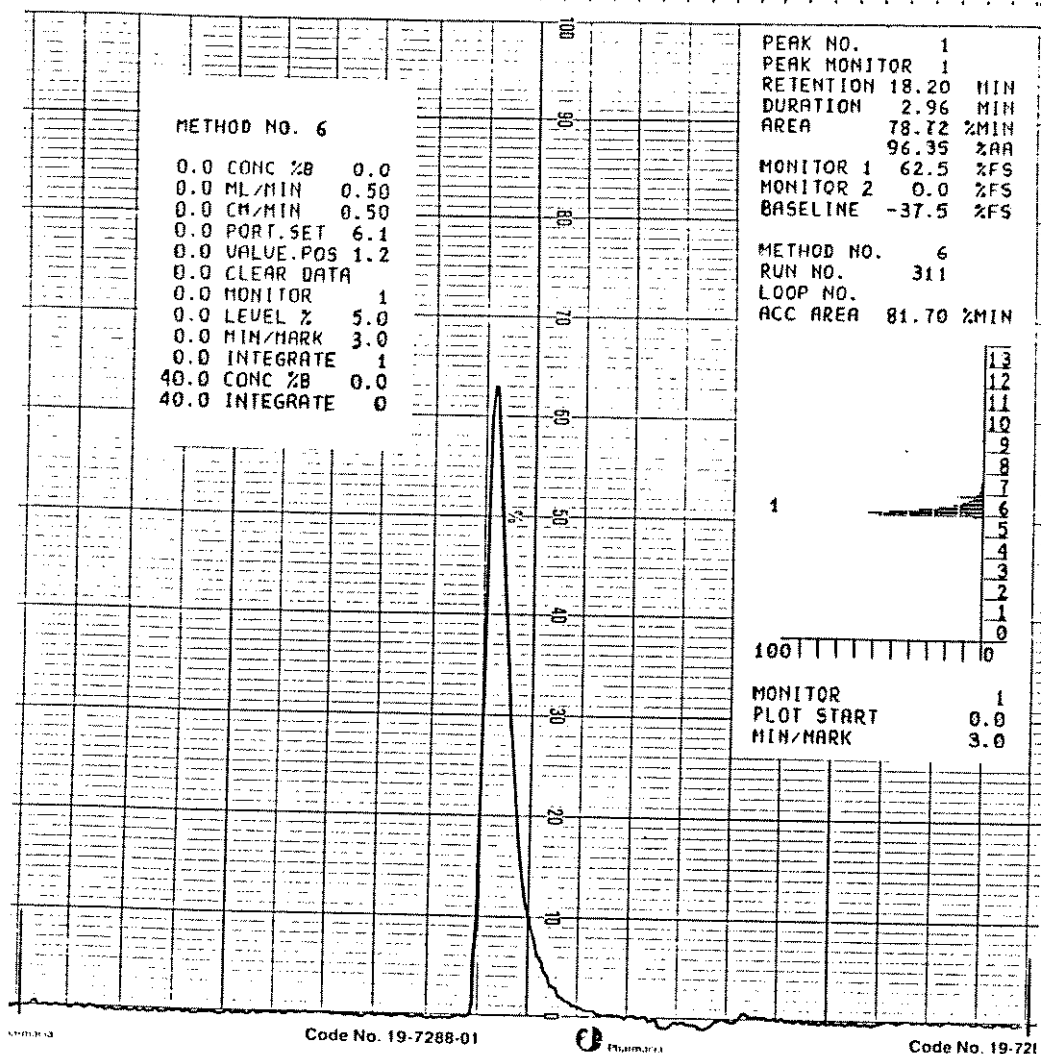


FIG. 27. Cromatograma de PDC B (150µl de uma solução 2mg/ml) obtido num sistema de FPLC da Pharmacia. O cromatograma em primeiro plano corresponde ao obtido no registrador REC-482. No alto, à direita, é mostrado o cromatograma do controlador de cromatografia líquida LCC-500, onde se deve destacar o tempo de retenção; à esquerda, o respectivo método utilizado, incluindo o fluxo (0,5ml/min.), a velocidade do registrador (0,5cm/min.) e o tempo a que corresponde cada marca na abscissa (3,0min.).

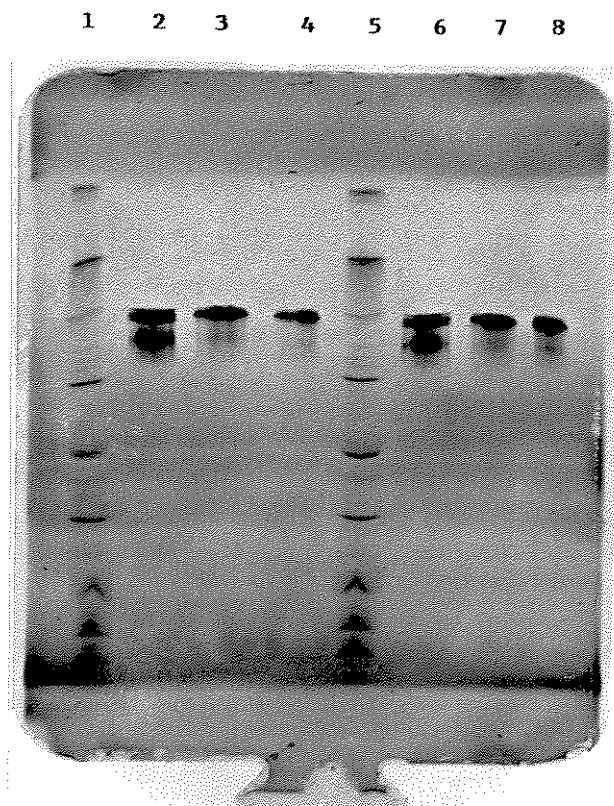


FIG. 28. PhastSystem (Pharmacia) IEF de PDC em gel de poliacrilamida homogêneo (5% T, 3% C) contendo anfólitos transportadores Pharmalyte. PhastGel IEF 3-9; quantidade de proteína: 2 $\mu$ g; coloração pelo azul de Coomassie.

1 e 5 - Proteínas marcadoras: amiloglucosidase (pI = 3,5), inibidor da tripsina da soja (pI = 4,55),  $\beta$ -lactoglobulina A (pI = 5,85), anidrase carbônica B humana (pI = 6,55), mioglobina de cavalo-banda ácida (pI = 6,85), mioglobina de cavalo-banda básica (pI = 7,35), lectina de lentilha-banda ácida (pI = 8,15), lectina de lentilha-banda intermediária (pI = 8,45), lectina de lentilha-banda básica (pI = 8,65), tripsinogênio (pI = 9,30).

2 e 6 - PDC A<sub>1</sub> (banda superior: pI = 5,14; banda inferior: pI = 5,43)

3 e 7 - PDC A<sub>2</sub> (pI = 5,14)

4 e 8 - PDC B (pI = 5,14)

única banda. Pela curva de calibração derivada do gel (Figura 29), determinou-se que o ponto isoelétrico da banda superior PDC A<sub>1</sub>, assim como de PDC A<sub>2</sub> e PDC B, é de 5,14, enquanto que o da banda inferior de PDC A<sub>1</sub> é de 5,43. Esses resultados não estão de acordo com o esperado. Pelo padrão de eluição na cromatografia de troca iônica, PDC A<sub>1</sub> e PDC B deveriam apresentar valores de pI similares, enquanto que PDC A<sub>2</sub>, sendo aparentemente mais ácida, um pI mais baixo. A dissociação de PDC A<sub>1</sub> em dímeros, nesse caso, é improvável, pois o pH (em torno de 6,5) em que as amostras foram aplicadas é perfeitamente compatível com a proteína nativa. Assim sendo, nenhuma correlação do pI com as formas de PDC isoladas pode ser estabelecida com base nesses resultados. Os valores obtidos diferem também do pI 5,8 encontrado por Katsumata et al. (1969) e Ludewig & Schellenberger (1974) para a holoenzima. Os últimos autores relataram, ainda, um pI 6,0 para a apoenzima.

#### **ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NATIVO (PAGE-NATIVO)**

Em condições nativas, isto é, sem adição de agentes desnaturantes, o gel corado pelo nitrato de prata revelou claramente pelo menos duas bandas para PDC A<sub>1</sub>/PDC A<sub>2</sub> e uma para PDC B (Figura 30), as quais se mostraram ativas num segundo gel corrido ao mesmo tempo e submetido a uma mistura de reação seguida de coloração pelo 1,2-dianilinoetano (Figura 31). É importante considerar que o pH do gel

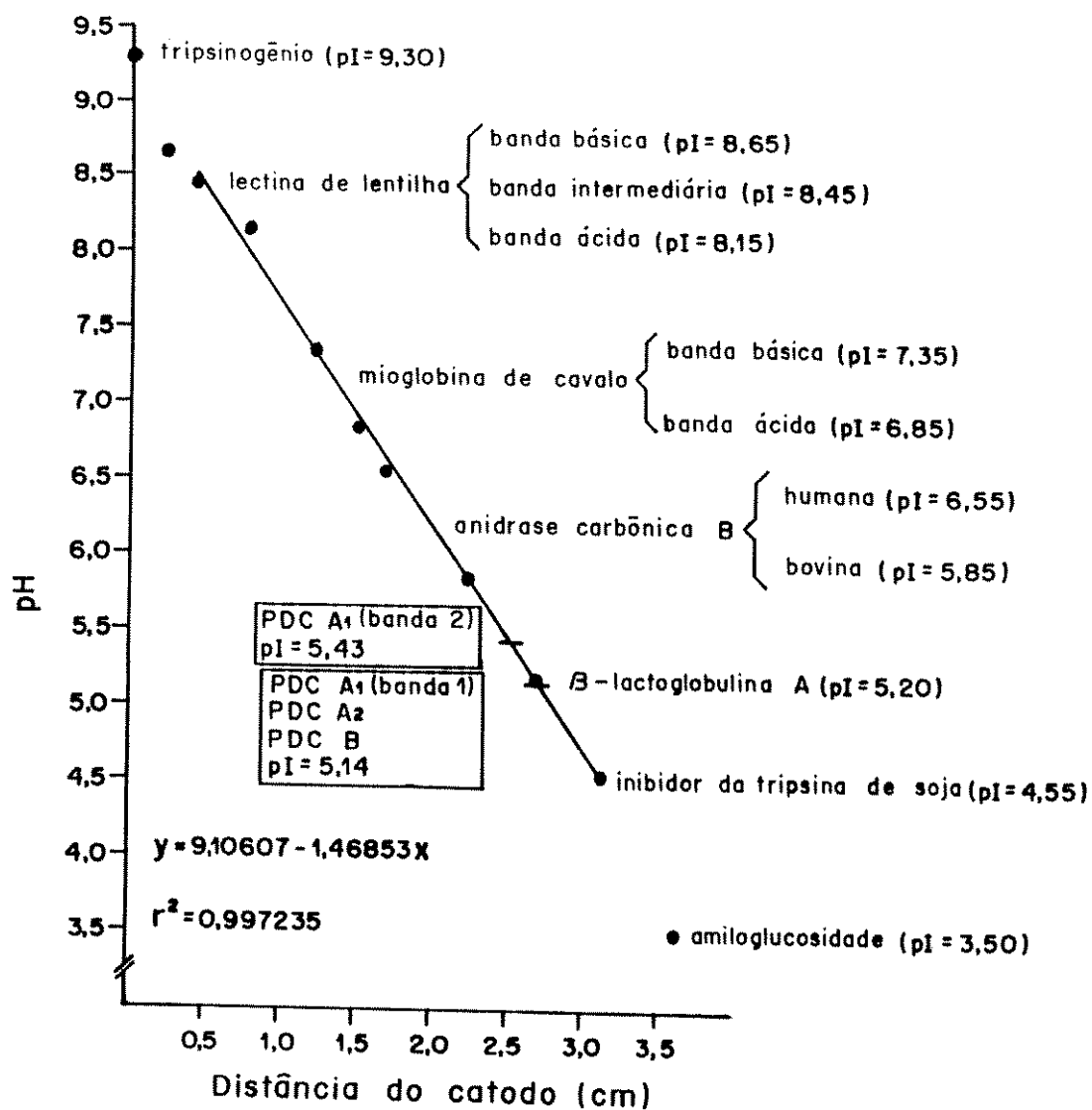


FIG. 29. Curva de calibração para determinação do ponto isoeletrico de PDC derivada do gel da figura 28.

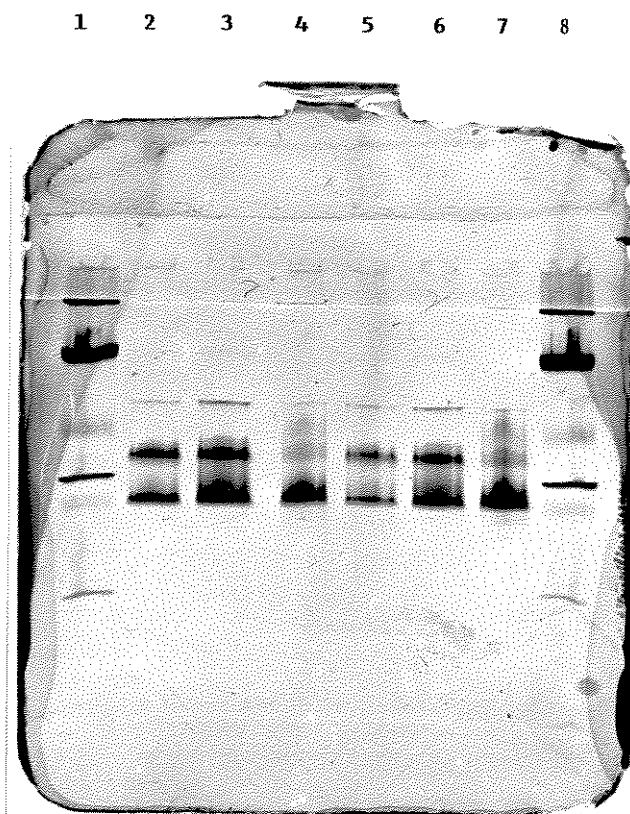


FIG. 30. PhastSystem (Pharmacia) PAGE-Nativo de PDC. Coloração pelo nitrato de prata. PhastGel PAGE-Nativo gradiente 8-25%; pH 8,8; tampão da amostra: 10mM  $K_3PO_4$  pH 6,3 + 1mM  $MgSO_4$  + 10 $\mu$ M TPP; quantidade de proteína: 100ng.  
 1 e 8 - kit de calibração para alta massa molecular da Pharmacia: tiroglobulina (669000 D), ferritina (440000 D), catalase (232000 D), lactato desidrogenase (140000 D) e albumina (67000 D).  
 2 e 5 - PDC A<sub>1</sub>  
 3 e 6 - PDC A<sub>2</sub>  
 4 e 7 - PDC B

1 2 3 4 5 6 7 8

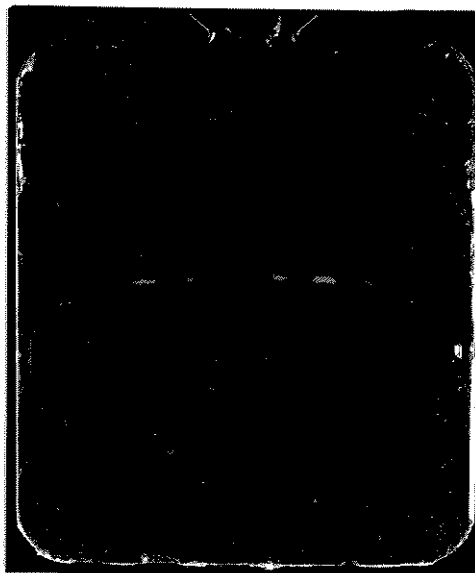


FIG. 31. PhastSystem (Pharmacia) PAGE-Nativo de PDC. Coloração para atividade pelo método do 1,2 - dianilinoetano (DAE). PhastGel PAGE-Nativo gradiente 8-25%; quantidade de proteína: 1µg; tampão da amostra: tampão citrato 150mM pH 6,0.  
1 e 8 - kit de calibração para alta massa molecular da Pharmacia: tiroglobulina (669000 D), ferritina (440000 D), catalase (232000 D), lactato desidrogenase (140000 D) e albumina (67000 D).  
2 e 5 - PDC A<sub>1</sub>  
3 e 6 - PDC A<sub>2</sub>  
4 e 7 - PDC B



utilizado (pH 8,8) promove dissociação de PDC em dímeros com liberação dos cofatores. É possível que as bandas observadas estejam relacionadas com diferentes graus de associação dos dímeros e/ou holoenzima-apoenzima. O fato de todas as bandas mostrarem atividade pode ser explicado por uma reassociação da proteína na forma tetramérica ativa quando a mistura de reação (pH 6,3 e cofatores em excesso) foi adicionada.

## **ESPECTROMETRIA DE MASSA**

### **1. Mapeamento-FAB**

#### **1.1.Digestão por tripsina**

Os espectros gerados pela análise dos digestos trípticos de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B por FAB-MS, mapas-FAB, estão apresentados nas Figuras 32, 33 e 34, respectivamente, sendo caracterizados por um grande número de sinais de boa intensidade que correspondem às massas de íons quase-moleculares dos fragmentos peptídicos trípticos. Através de um programa de busca por computador (M-Scan Ltd., Ascot, UK, e R. McDowell, Imperial College of Science, Technology and Medicine, Londres, UK), cada íon quase-molecular observado foi testado para um ajuste de massa na seqüência derivada do gene PDC 1, publicada por Kellermann et al., (1986), apresentada na Figura 35.

Os sinais de massa observados e seus resíduos

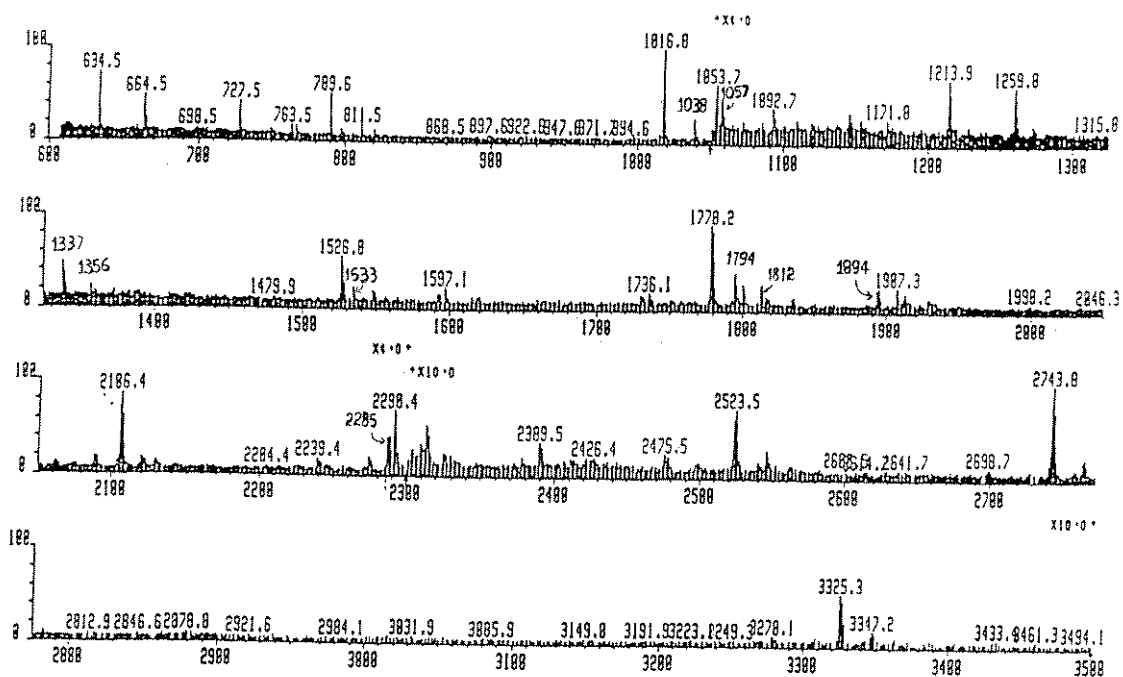


FIG. 32. Mapa-FAB tríptico de PDC A<sub>1</sub> obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2SE).

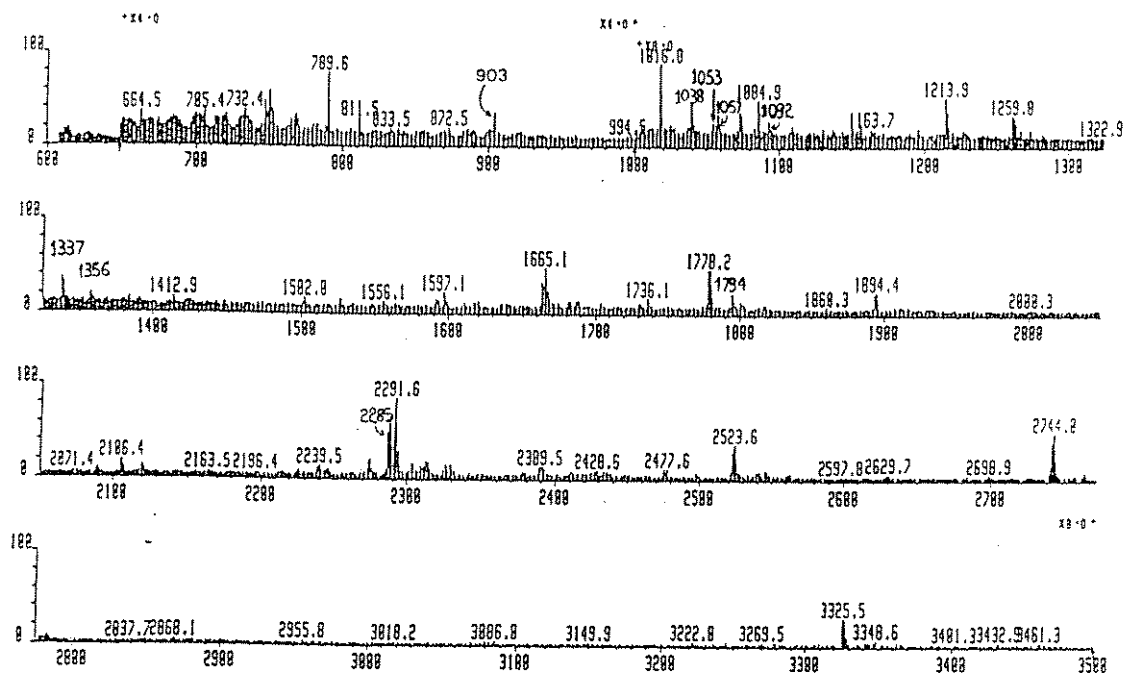


FIG. 33. Mapa-FAB tríptico de PDC A<sub>2</sub> obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2SE).

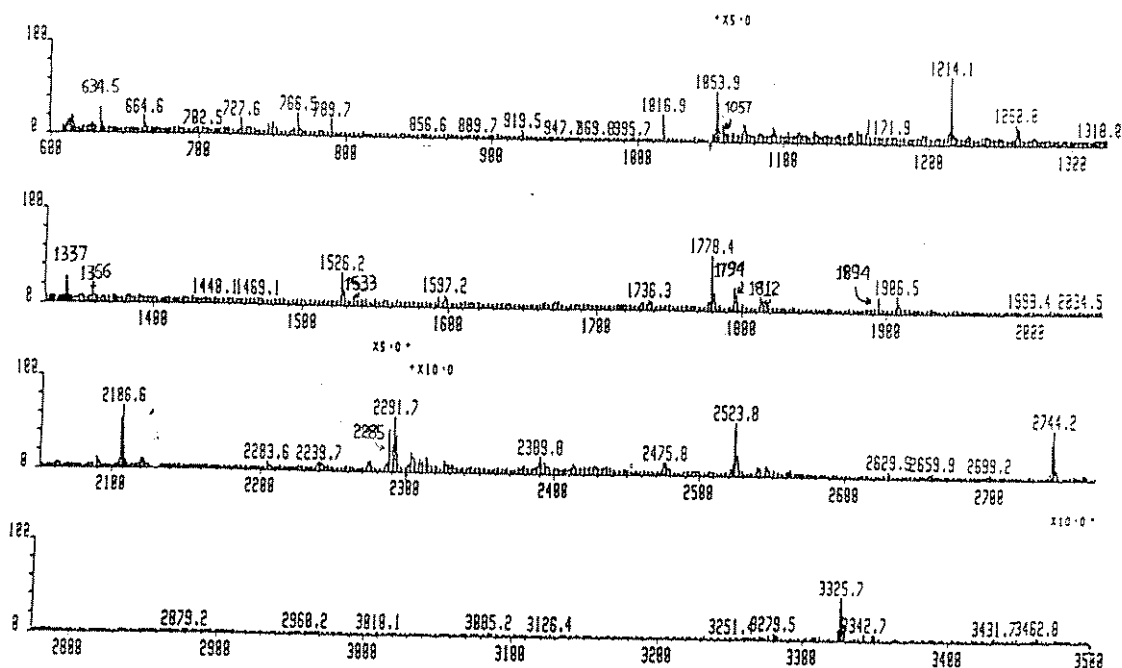


FIG. 34. Mapa-FAB tríptico de PDC B obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2SE).

-467 GGCTGCTGG AAAAATGAA TAATTTATGA ATTGAGAAC ATTITITGTI TGTACGGTA TTTTACTATG GAATAATCAA TCAATTGAGG ATTITATCCA  
 -568 AATATCGTIT TGAATATTTT CCGACCGTTT GAGTACTTTT CTTCATATTT GCATATATTT GTCCGCTGGC GGTITTTTCTG TTAGACGGTG TCTTGATCTA  
 -268 CTTCGTATCG TTCAACACCA CTTTATTTTC TAACATTTTT TTTTITAGCT CATTGATC ACCTTATGGT GATGGCCAT TTTTGCAATA ACCTAGCTGT  
 -168 CCTCGTGGAA CATAGGAAA AAAATATAT AACAGAGCT CTTCCTACTCT CTTTGAATC AGATTGGGT TGTTCCTTT TATTTCATA TTTTGTGCA  
 -68 TATTCTTTTC TCAATTATTA TCTTCTACTC ATACCTCAG CCAAAATAAC ACAGTCANAT CAATCAAA ATG TCT GAA ATT ACT TTG GGT AAA TAT  
 Met Ser Glu Ile Thr Leu Gly Lys Tyr  
 28 TTG TTG GAA AGA TTA AAG CAA GTC AAC GTT AAC ACC GTT TTT GGT TTG CCA GGT GAC TTG AAC TTG TCC TTG TTG GAC AAG ATC  
 Leu Phe Glu Arg Leu Lys Gln Val Asn Val Asn Thr Val Phe Gly Leu Pro Gly Asp Phe Asn Leu Ser Leu Leu Asp Lys Ile  
 112 TAC GAA GTT GAA GGT ATG AGA TGG GCT GGT AAC GGC AAC GAA TTG AAC GCT GCT TAC GGC GGT GAT GGT TAC GCT GGT ATC AAG  
 Tyr Glu Val Glu Gly Met Arg Trp Ala Gly Asn Ala Asn Glu Leu Asn Ala Ala Tyr Ala Ala Asp Gly Tyr Ala Arg Ile Lys  
 196 GGT ATG TCT TGT ATC ACC ACC TTG GGT GTC GGT GAA TTG TCT GCT TTG AAC GGT ATT GGC GGT TCT TAC GCT GAA CAC GTC  
 Gly Met Ser Cys Ile Ile Thr Trp Phe Gly Val Gly Glu Leu Ser Ala Leu Asn Gly Ile Ala Gly His Val  
 280 GGT GTT TTG CAC GTT GTT GGT GTC CCA TCC ATC TCT TCT CAA GCT AAG CAA TTG TTG TTG CAC ACC TTG GGT AAC GGT GAC TTG  
 Gly Val Leu His Val Val Gly Val Pro Ser Ile Ser Ser Gln Ala Lys Gln Leu Leu Leu His Thr Leu Gly Asn Gly Asp Phe  
 364 GGT GTT TTG CAC AGA ATG TCT GGC AAC ATT TCT GAA ACC ACT GCT ATG ATC ACT GAC ATC TGT AGC CCG CAG GCT GAA ATT GAC  
 Thr Val Phe His Arg Met Ser Ala Asn Ile Ser Glu Thr Ala Met Ile Thr Asp Ile Gly Ser Pro Arg Tyr Ala Glu His Val  
 448 AGA TGT ATC AGA ACC ACT TAC GTC ACC CAA AGA CCA GTC TAC TTA GGT TTG CCA GCT AAC TTG GTC GAC TTG AAC GTC CCA GCT  
 Arg Cys Ile Arg Thr Thr Tyr Val Thr Gln Arg Pro Val Tyr Leu Gly Leu Pro Ala Asn Leu Val Asp Leu Asn Val Pro Ala  
 532 AAG TTG TTG CCA ACT CCA ATT GAC TTG TCT TTG AAG CCA AAC GAT GCT GAA TTG GAA AAG GAA GTC ATT GAC ACC ATC TTG GTC  
 Lys Leu Leu Gln Thr Pro Ile Asp Met Ser Leu Lys Pro Asn Asp Ala Glu Ser Glu Lys Glu His Ser Thr Thr Ile Glu His Val  
 616 TTG GTC AAG GAT GCT AAG AAC CCA GTT ATT CTG GCT GAT GCT TGT TGT TCC AGA CAC GAC GTC AAG GCT GAA ACT AAG AAG TTG  
 Leu Val Lys Asp Ala Lys Asn Pro Val Ile Leu Ala Asp Ala Cys Ser Arg His Asp Val Lys Ala Glu Thr Lys Lys Leu  
 700 ATT GAC TTG ACT CAA TTT CCA GCT TTT GTC ACC ATG GGT AAG GGT TCC ATT ACC GAA CAA CAC CCA AGA TAC GGT GGT GTT  
 Ile Asp Leu Thr Gln Phe Pro Ala Phe Val Thr Pro Met Gly Lys Gly Ser Ile Ser Glu Gln His Pro Arg Tyr Gly Gly Val  
 784 TAC GTC GGT ACC TTG TCC AAG CCA GAA GTT AAG GAA GGC GTT GAA TCT GCT GAC TTG ATT TTG TCT GTC GGT GCT TTG TGT TCT  
 Tyr Val Gly Thr Leu Ser Lys Pro Glu Val Lys Glu Ala Val Glu Ser Ala Asp Leu Ile Leu Ser Val Gly Ala Leu Leu Ser  
 868 GAT TTT AAC ACC GGT TCT TCT TCT TCT TAC TAC AAG ACC AAG AAC ATT GTC GAA TTG CAC TCC GAC CAC ATG AAG ATC AGA AAC  
 Asp Phe Asn Thr Gly Ser Phe Ser Tyr Ser Tyr Lys Thr Lys Asn Ile Val Glu Phe His Ser Asp His Met Lys Ile Arg Asn  
 952 GGC ACT TTT CCA GGT GTC CAA ATG AAA TTT GTT TTG CAA AAG TTG TTG ACC AAT ATT GCT GAC GGC GCT AAG GGT TAC AAG CCA  
 Ala Thr Phe Pro Gly Val Gln Met Lys Phe Val Leu Gln Lys Leu Leu Thr Asn Ile Ala Asp Ala Ala Lys Gly Tyr Lys Pro  
 1036 GGT GCT GTC CCA GCT AGA ACT CCA GCT AAC GCT GCT GTC CCA GCT TCT ACC CCA TTG AAG CAA GAA TGG ATG TGG AAC CAA TTG  
 Val Ala Val Pro Ala Arg Thr Pro Ala Asn Ala Ala Val Pro Ala Ser Thr Pro Leu Lys Gln Glu Trp Met Trp Asn Gln Leu  
 1120 GGT AAC TTG TTG CAA GAA GGT GAT GTT GTC ATT GCT GAA ACC GGT ACC TCC GCT TTT GGT ATC AAC CAA ACC ACT TTT CCA AAC  
 Gly Asn Phe Leu Gln Glu Gly Asp Val Val Ile Ala Glu Thr Gly Thr Ser Ala Phe Gly Ile Asn Gln Thr Thr Phe Pro Asn  
 1204 AAC ACC TAC GGT ATC TCT CAA GTC TTA TGG GGT TCC ATT GGT TTT ACC ACT GGT GCT ACC TTG GGT GCT GCT TTT GCT GCT GAA  
 Asn Thr Tyr Gly Ile Ser Gln Val Leu Trp Gly Ser Ile Gly Phe Thr Thr Gly Ala Thr Leu Gly Ala Phe Ala Ala Glu  
 1288 GAA ATT GAT CCA AAG AAG AGA GTT ATC TTA TTT ATT GGT GAC GGT TCT TTG CAA TTG ACT GTT CAA GAA ATC TCT ACC ATG ATC  
 Glu Ile Asp Pro Lys Lys Arg Val Ile Leu Phe Ile Gly Asp Gly Ser Leu Gln Leu Thr Val Gln Glu Ile Ser Thr Met Ile  
 1372 AGA TGG GGC TTG AAG CCA TAC TTG TTT GTC TTG AAC AAC GAT GGT TAC ACC ATT GAA AAG TTG ATT CAC GGT CCA AAG GCT CAA  
 Arg Trp Gly Leu Lys Pro Tyr Leu Phe Val Leu Asn Asn Asp Gly Tyr Phe ATT GAA AAG TTG ATT CAC GGT CCA AAG GCT CAA  
 1456 TAC AAC GAA ATT CAA GGT TGG GAC CAC CTA TCC TTG TTG CCA ACT TTT GGT GCT AAG GAC TAC GAA ACC CAC AGA GTC GCT ACC  
 Tyr Asn Glu Ile Gln Gly Trp Asp His Leu Ser Leu Leu Pro Thr Phe Gly Ala Lys Asp Tyr Glu Thr His Arg Val Ala Thr  
 1540 ACC GGT GAA TGG GAC AAG TTG ACC CAA GAC AAG TCT TTT AAC GAC AAC TCT AAG ATC AGA ATG ATT GAG GTT ATG TTG CCA GTC  
 Thr Gly Glu Trp Asp Lys Leu Thr Gln Asp Lys Ser Phe Asn Asp Asn Ser Lys Ile Arg Met Ile Glu Val Met Leu Pro Val  
 1624 TTT GAT TCC TCC ACA AAA CTT GGT TGA ACAGCTAAG TTGACTGTG CTACCAACGC TAACCAATA GCGATTATTA CTTAATTAT AGTTAAGTT  
 Phe Asp Cys Ser Thr Lys Leu Gly -p-  
 1721 TTAATAGCAT TTTTATGTA CCAAAATATA ATTGGTTCAT ATTATTACTG CACTGTACTT TACCATGGAA AGACAGACAA AGAAGTTGCC GACACGACAG  
 1821 TCTGTGAAI TGGCTTAAGT CTGGGTCCGC TTTCTTACAA ATTGAGAA TTTCTCTTAA ACATATGTA TATTCTTTGS TTGGAAAGA TGCTTCCAA  
 1921 AAAAAAATC CCAAGATTA GTGGAAACAA CCAAAAAA AGAGATATCC TTGATTAGG AACATGTTT AACAGTGTG GTTCCAAA CCGTAGACT  
 2021 GCATTAGCAT GATAGAGAC TAGACACTC GATACAAATA ATGGTACTC AA

FIG. 35. Sequência de PDC derivada do gene PDC 1 (Kellermann et al., 1986). Na proteína acabada, a Met do N-terminal é removida e a Ser é acetilada por um mecanismo de processamento e modificação pós-tradução detectado neste trabalho por espectrometria de massa de varredura ligada B/E-CAD (figura 48). Essa técnica detectou também um erro na sequência: A Asn<sub>335</sub> é, na realidade, Thr (figura 49).

correspondentes estão listados na Tabela III. Para alguns dos sinais, comuns as três formas de PDC ( $m/z$  789, 1016, 1053, 1214, 1526, 1794, 1894, 2106, 2285, 2523 e 3325), e outros apresentados apenas por uma ou duas das formas ( $m/z$  903, 1038, 1092, 1533, 1665 e 1812), nenhuma correspondência na sequência derivada do gene foi, a princípio, encontrada. Os sinais de  $m/z$  789 e 1016 foram mapeados após análise por varredura ligada, tendo sido identificado um mecanismo de processamento e modificação pós-tradução do N-terminal, no primeiro caso, e um erro na sequência derivada do cDNA, no último. Esses dois casos serão discutidos em detalhe na apresentação dos resultados dos experimentos de varredura ligada. Os sinais de  $m/z$  1526 e 1533 foram mapeados após degradação de Edman e serão discutidos no próximo item. É interessante registrar que, inicialmente, para o peptídeo de  $m/z$  1260, não foi encontrada correspondência na sequência derivada do gene; entretanto, posteriormente, determinou-se que ele corresponde aos resíduos 212 a 223. Essa dificuldade foi causada pela presença inesperada — pois deveria ter sido rompida — de uma ponte de dissulfeto intramolecular entre dois resíduos de cisteína adjacentes, 220 e 221. Estericamente, isso era tido como impossível, sendo energeticamente desfavorável.

Os sinais de  $m/z$  de 664, 1260, 1337, 1356, 1597, 1778 e 2744, correspondendo aos resíduos 478-483, 212-223, 352-365, 304-314, 258-172, 233-248 e 154-178, respectivamente, não foram identificados nas sequências derivadas dos genes

TABELA III. Íons quase-moleculares,  $[M + H]^+$ , observados nos mapas-FAB dos digestos trípticos de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B e seus resíduos correspondentes da sequência derivada do gene PDC 1.<sup>a</sup>

| $[M + H]^+$       | Resíduos | PDC A <sub>1</sub> | PDC A <sub>2</sub> | PDC B | Dados de Cheung (1985) |
|-------------------|----------|--------------------|--------------------|-------|------------------------|
| 634               | 327-331  | +                  | -                  | +     | +                      |
| 664               | 478-483  | +                  | +                  | +     | -                      |
| 727               | 9-13     | +                  | -                  | +     | +                      |
| 789               |          | +                  | +                  | +     | +                      |
| 811               | 525-531  | +                  | +                  | -     | -                      |
| 903               |          | -                  | +                  | -     | -                      |
| 1016              |          | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1038              |          | +                  | +                  | -     | -                      |
| 1053              |          | +                  | +                  | +     | -                      |
| 1057              | 342-351  | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1092              |          | +                  | +                  | -     | -                      |
| 1214              |          | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1260 <sup>b</sup> | 212-223  | +                  | +                  | +     | -                      |
| 1337              | 352-365  | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1356              | 304-314  | +                  | +                  | +     | -                      |
| 1526 <sup>c</sup> | 465-477  | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1533 <sup>c</sup> | 164-178  | +                  | -                  | +     | -                      |
| 1597              | 258-272  | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1665              |          | -                  | +                  | -     | -                      |
| 1778              | 233-248  | +                  | +                  | +     | -                      |
| 1794              |          | +                  | +                  | +     | -                      |
| 1812              |          | +                  | -                  | +     | -                      |
| 1894              |          | +                  | +                  | +     | +                      |
| 1907              | 232-248  | +                  | -                  | +     | +                      |
| 2106              |          | +                  | +                  | +     | -                      |
| 2285              |          | +                  | +                  | +     | -                      |
| 2291              | 16-36    | +                  | +                  | +     | +                      |
| 2389              | 484-504  | +                  | +                  | +     | +                      |
| 2523              |          | +                  | +                  | +     | -                      |
| 2744              | 154-178  | +                  | +                  | +     | -                      |
| 3325              |          | +                  | +                  | +     | -                      |

<sup>a</sup> (+) Sinais observados; (-) sinais não observados.

<sup>b</sup> Presença de ponte de dissulfeto intramolecular entre os resíduos de cisteína 220 e 221.

<sup>c</sup> Sinais mapeados após degradação de Edman revelando sítios de clivagem quimotríptica.

PDC 5 e PDC 6 (Figura 36). Para cada um desses fragmentos peptídicos, foi encontrado pelo menos um aminoácido diferente, chegando a oito no de 352-365 da sequência de PDC 5, e seis, no de 154-178 da sequência de PDC 6. Todos esses sinais estão presentes nos mapas-FAB trípticos de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B. Conclui-se, daí, que nenhuma das três formas da proteína isoladas corresponde aos produtos dos genes PDC 5 e PDC 6.

Observe-se, ainda, que a sequência derivada de PDC 1 originalmente publicada por Kellermann et al.(1986), Figura 35, difere da apresentada por Hohmann (1991), Figura 36, nos seguintes aspectos:

- a. nº total de aminoácidos - Kellermann et al.: 549; Hohmann: 563
- b. His<sub>115</sub> - Kellermann et al.: ausente; Hohmann: presente
- c. C-terminal - Kellermann et al.: a partir do resíduo 544-CSTKLG; Hohmann: a partir do resíduo 545-APQNLVKQAKLTAATNAKQ

Considerando a sequência apresentada por Hohmann, os seguintes sinais nos mapas FAB-trípticos seriam esperados para o C-terminal: 1943 (resíduos 535-551), 346 (resíduos 552-554), 789 (resíduos 555-562) e 917 (resíduos 553-563). Apenas o sinal 789 foi observado, porém, uma análise posterior por varredura ligada revelou que ele corresponde ao N-terminal da proteína e não aos resíduos 555-562. Para o fragmento peptídico onde uma histidina extra foi inserida entre os resíduos 114 e 115 da sequência original, um sinal



|      |            |            |           |           |           |            |          |
|------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|----------|
|      | 1          | 10         | 20        | 30        | 40        | 50         | 60       |
| PDC1 | MSEITLGKYL | FERLKQVNV  | NTVFGLPGD | FNLSLLDKI | YEVGMRWAG | NANELNARYA | AADG     |
| PDC5 | MSEITLGKYL | FERLSQVNC  | NTVFGLPGD | FNLSLLDKI | YEVGMRWAG | NANELNARYA | AADG     |
| PDC6 | MSEITLGKYL | FERLKQVNV  | NTVFGLPGD | FNLSLLDKI | YEVGMRWAG | NANELNARYA | AADG     |
|      | 70         | 80         | 90        | 100       | 110       | 120        |          |
| PDC1 | YARIKGMSCI | ITTFGVGEL  | SALNGIAGS | YAEHVGV   | LHVGVGPS  | ISSQAKQLL  | LHHTLGNG |
| PDC5 | YARIKGMSCI | ITTFGVGEL  | SALNGIAGS | YAEHVGV   | LHVGVGPS  | ISSQAKQLL  | LHHTLGNG |
| PDC6 | YARIKGLSVL | VTTFGVGEL  | SALNGIAGS | YAEHVGV   | LHVGVGPS  | ISSQAKQLL  | LHHTLGNG |
|      | 130        | 140        | 150       | 160       | 170       | 180        |          |
| PDC1 | DFTVFHRMSA | NISETTAMIT | DIATAPAEI | DRCIRTTY  | VTPRPVYL  | GLPANLVD   | LNVPKAL  |
| PDC5 | DFTVFHRMSA | NISETTAMIT | DIRNAPAEI | DRCIRTTY  | VTPRPVYL  | GLPANLVD   | LNVPKAL  |
| PDC6 | DFTVFHRMSA | NISETTAMIT | DIATAPAEI | DRLIIRTT  | FTITQRP   | SVYLGLP    | ANLVDLKV |
|      | 190        | 200        | 210       | 220       | 230       | 240        |          |
| PDC1 | LQTPIDMSL  | KPNDAESE   | KEVIDITL  | ALVKA     | DAKNPVIL  | ADACSRHD   | VKAETKKL |
| PDC5 | LETPIDLSL  | KPNDAEAE   | AEVVRTV   | VELIKDA   | KNPVILAD  | ACASRHD    | VKAETKKL |
| PDC6 | LEKPIDLSL  | KPNDEAE    | KEVIDITL  | LELIQNS   | KNPVILS   | DACASRHN   | VKKETQKL |
|      | 250        | 260        | 270       | 280       | 290       | 300        |          |
| PDC1 | PAFVTPMGK  | GSISEQHP   | RYGGVYV   | GTLSPKE   | VEKAVES   | ADLILSV    | GALLSDF  |
| PDC5 | PVVVTPMGK  | GAIDEQHP   | RYGGVYV   | GTLSPKE   | VEKAVES   | ADLILSV    | GALLSDF  |
| PDC6 | PAFVTPMGK  | GSISEQHP   | RYGGVYV   | GTLSPKE   | VEKAVES   | ADLILSV    | GALLSDF  |
|      | 310        | 320        | 330       | 340       | 350       | 360        |          |
| PDC1 | YTKKNIVEF  | HSDHMKIR   | NATFPGV   | QMKFVLQ   | KLLTNIAD  | AAKGYK     | PVAVPART |
| PDC5 | YTKKNIVEF  | HSDHMKIR   | NATFPGV   | QMKFALQ   | KLLDAIP   | DVVKDY     | KPVAVPAR |
| PDC6 | YTKKNIVEF  | HSDYVVK    | NATFPGV   | QMKFALQ   | NLLKVI    | PDVVKY     | KSVVPVPT |
|      | 370        | 380        | 390       | 400       | 410       | 420        |          |
| PDC1 | ASTPLKQEW  | HMWNLGN    | FLQEGDV   | VIAETGT   | SAGFINQT  | TFPNN      | TYGISQV  |
| PDC5 | ANTPMKQEW  | HMWNLGN    | FLREGD    | VIAETGT   | SAGFINQT  | TFPTDV     | YIAIVQV  |
| PDC6 | ASTPLKQEW  | LWNLGN     | FLQEGDV   | IISETGT   | SAGFINQT  | IFPKDAY    | GISQV    |
|      | 430        | 440        | 450       | 460       | 470       | 480        |          |
| PDC1 | ATLGAFAA   | EEIDPKR    | VILFIGD   | GSLOLT    | VQEISTM   | IRWGLK     | PYLFVLN  |
| PDC5 | ALLGATMA   | AEELDPK    | RVLFIGD   | GSLOLT    | VQEISTM   | IRWGLK     | PYLFVLN  |
| PDC6 | ATLGAFAA   | EEIDPNK    | RVLFIGD   | GSLOLT    | VQEISTM   | IRWGLK     | PYLFVLN  |
|      | 490        | 500        | 510       | 520       | 530       | 540        |          |
| PDC1 | HGPKAQYNE  | IQGNHLS    | LLPTFGA   | KDYETHR   | VATTGEW   | DKLTQDK    | SFNDNSK  |
| PDC5 | HGPHAEYNE  | IQGNHLS    | LLPTFGA   | RNYETHR   | VATTGEW   | EKLTDQD    | KDFQD    |
| PDC6 | HGPHAEYNE  | IQTWDHL    | LALLPFG   | AKKYENH   | KIATTGE   | WDALTTD    | SEFQKNS  |
|      | 550        | 560        | 570       |           |           |            |          |
| PDC1 | PVFDAPQNL  | VQAKLTA    | ATNAKQ    |           |           |            |          |
| PDC5 | PVFDAPQNL  | VQAKLTA    | ATNAKQ    |           |           |            |          |
| PDC6 | PVFDAPESL  | IKQAKLTA   | ATNAKQ    |           |           |            |          |

FIG. 36. Sequência de PDC derivada dos genes PDC 1, PDC 5 e PDC 6, segundo Hohmann (1991). Embora o autor cite Kellermann et al. (1986) sem qualquer referência a modificações na sequência original, observe-se que uma histidina extra foi inserida entre os resíduos 114-115, e o C-terminal, além de expandido (13 aminoácidos a mais), apresenta uma diferente sequência nos 6 aminoácidos que precedem a expansão. A = Ala; R = Arg; N = Asn; D = Asp; C = Cys; E = Glu; Q = Gln; G = Gly; H = His; I = Ile; L = Leu; K = Lys; M = Met; F = Phe; P = Pro; S = Ser; T = Thr; W = Trp; Y = Tyr; V = Val. As diferenças entre as três sequências apresentadas por Hohmann estão sublinhadas.

de m/z 2106 era esperado. Esse sinal foi observado nos mapas-FAB das três formas de PDC, possibilitando o mapeamento de dezoito resíduos de aminoácidos (110-127), numa região para a qual nenhum dado de sequência havia sido fornecido, e confirmando a fidelidade da inclusão da referida histidina.

## **1.2. Análise do N-terminal dos digestos trípticos - Degradação de Edman**

A etapa seguinte do mapeamento-FAB foi confirmar as correspondências peptídicas dos vários valores de massa listados na Tabela III e tentar obter informação a respeito daqueles que não encontraram correspondência na sequência derivada do cDNA. Uma alíquota de cada mistura de digesto foi submetida a dois ciclos de degradação manual de Edman seguidos de análise FAB-MS após cada ciclo. A diferença entre um valor de massa de um sinal antes e após a degradação de Edman, determinada por comparação dos dois mapas-FAB, corresponde ao resíduo de aminoácido do N-terminal. Dois ciclos de degradação de Edman seguidos de FAB-MS da mistura do digesto intacta permitiram a identificação dos dois primeiros resíduos de aminoácidos do N-terminal da maioria dos peptídios trípticos observados nos mapas-FAB iniciais, confirmando as correspondências previamente estabelecidas. Além disso, dois peptídios inicialmente incompatíveis com a sequência derivada do gene PDC 1 como originados de clivagens trípticas, de m/z 1526 e 1533, foram mapeados. No primeiro

caso, leucina e fenilalanina foram identificadas como o primeiro e o segundo resíduos do N-terminal, respectivamente, o que, associado ao valor da massa do peptídeo, permitiu o mapeamento entre os resíduos 465 e 477. Verificou-se, ainda, que o resíduo que precede o N-terminal corresponde a uma tirosina, indicando uma digestão quimotríptica nesse lado do peptídeo; no C-terminal, um resíduo de lisina confirmou a digestão tríptica. A detecção de sítios de clivagem quimotríptica pode ser explicada pela presença de quimotripsina como impureza da tripsina. Da mesma forma, o sinal fraco de  $m/z$  1533 mapeou nas posições de 164 a 178, após um passo de degradação de Edman/FAB-MS que revelou uma clivagem quimotríptica entre os resíduos 163 (tirosina) e 164 (leucina).

### **1.3. Análise do C-terminal dos digestos trípticos-Subdigestão por carboxipeptidase B**

A ocorrência de clivagens quimotrípticas em digestos trípticos substantia a necessidade da análise não apenas do N-, mas também do C-terminal.

Assim, alíquotas dos digestos trípticos de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B foram subdigeridas com CpB e as misturas do duplo digesto, analisadas por FAB-MS. Exceto para o peptídeo do C-terminal da proteína, a menos que seu resíduo C-terminal fosse lisina ou arginina, todos os peptídios deveriam apresentar deslocamentos de massa compatíveis com a digestão pela CpB.

A comparação dos mapas-FAB tríptico e tríptico/CpB mostrou que os sinais se deslocaram por incrementos de massa previsíveis de 128 ou 156 D, correspondendo a clivagens do C-terminal, pela CpB, de resíduos de lisina ou arginina, respectivamente. A análise de cada um dos deslocamentos de massa confirmou os mapeamentos prévios na sequência derivada do gene. Os sinais de  $m/z$  664, 1526 e 2291, entretanto, não tiveram seus valores de massa alterados, embora todos os três mapeassem em sequências peptídicas com resíduos de lisina nos respectivos C-terminais. Essa observação foi racionalizada em cada caso, considerando o resíduo de aminoácido que precede a lisina. O penúltimo resíduo de aminoácido no peptídeo de  $m/z$  664 é prolina; é de conhecimento geral que ligações peptídicas de prolina são hidrolisadas muito vagarosamente. Os resíduos que precedem a lisina nos peptídios de  $m/z$  1526 e 2291 são os ácidos glutâmico e aspártico, respectivamente; ligações peptídicas entre um resíduo ácido e um básico são hidrolisadas numa taxa mais lenta devido à repulsão do sítio ativo da CpB pelo resíduo ácido. A análise do mapa-FAB do digesto tríptico/CpB permitiu, ainda, elucidação do resíduo C-terminal dos peptídios de  $m/z$  2285 e 3325 como sendo lisina. Esses sinais não encontraram correspondência na sequência derivada do gene, embora os dados da digestão pela CpB tenham provado que os peptídios foram derivados tripticamente. Isso substantia a suposição da existência de possíveis erros na sequência derivada do gene. A partir desses dados preliminares, mostrou-se que muitos dos sinais

não mapeados são comuns as três formas de PDC. O grau de diferenciação nas respectivas seqüências foi investigado e será discutido posteriormente.

#### 1.4.Digestão por tripsina/protease V8

Uma alíquota de cada digesto tríptico foi subdigerida com protease V8, ajustando-se às condições experimentais para clivagem no lado C-terminal de ligações peptídicas apenas de resíduos de ácido glutâmico. Um grande número de resíduos desse aminoácido se encontra na seqüência derivada do gene PDC 1 e, portanto, foi previsto que a maior parte dos peptídios trípticos iria ser digerida em dois ou mais peptídios e aqueles que não contivessem ácido glutâmico não iriam alterar suas massas. A informação seqüencial adicional interpretada a partir dos mapas-FAB do duplo digesto tríptico/V8 está apresentada na Tabela IV. Embora condições favoráveis à clivagem apenas de ligações do ácido glutâmico tenham sido empregadas, duas clivagens de ligações do ácido aspártico (sinais de  $m/z$  488 e 1584) foram observadas. Pouca informação adicional foi obtida, o que pode ser explicado pelo fenômeno de supressão (Morris et al., 1981) na análise FAB-MS de uma mistura de digesto complexa. Tem-se verificado, desde a introdução da técnica FAB-MS, que certos componentes numa mistura de digesto são suprimidos por outros, não sendo, portanto, detectados no espectro de massa FAB. A subdigestão do digesto tríptico deve ter gerado muitos fragmentos

peptídicos, alguns dos quais possuindo propriedades físico-químicas que suprimem outros componentes. Assim, não foi possível tirar qualquer conclusão a respeito da ausência de um determinado peptídio previamente observado nos mapas-FAB trípticos, pois ela pode ser atribuída à digestão pela protease V8 ou, simplesmente, à supressão na análise FAB-MS devido a um maior número de peptídios.

TABELA IV. Sinais adicionais interpretáveis observados nos mapas-FAB dos digestos trípticos/protease V8 de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B.

| [M + H] <sup>+</sup> | Resíduos             | PDC A <sub>1</sub> | PDC A <sub>2</sub> | PDC B |
|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-------|
| 403                  | 148-150              | +                  | -                  | -     |
| 474                  | 304-307 <sup>a</sup> | +                  | +                  | +     |
| 488                  | 232-235 <sup>a</sup> | +                  | +                  | -     |
| 531                  | 4-8                  | +                  | +                  | -     |
| 545                  | 190-194              | +                  | -                  | -     |
| 720                  | 453-458              | +                  | -                  | +     |
| 1369                 | 258-270 <sup>a</sup> | -                  | +                  | -     |
| 1584                 | 179-192              | -                  | +                  | -     |

<sup>a</sup> Resíduos parcial ou totalmente mapeados a partir dos dados dos mapas-FAB trípticos anteriores.

### 1.5.Digestão por tripsina/CNBr

Para evitar a falta de informação de seqüência, como observado com a digestão por tripsina/protease V8, uma nova digestão foi cuidadosamente selecionada para alta especificidade e para clivar preferencialmente um tipo de resíduo de aminoácido pouco freqüente na seqüência da proteína. Apenas doze resíduos de metionina estão presentes na seqüência

derivada do cDNA e, assim, a clivagem dos peptídios derivados da digestão tríptica com brometo de cianogênio, CNBr, específica para clivagem no lado C-terminal de resíduos de metionina, pareceu bastante adequada. A interpretação dos espectros de massa-FAB dos digestos trípticos/CNBr resultantes permitiu a confirmação de numerosas seqüências peptídicas previamente mapeadas a partir dos dados do digesto tríptico por si só. Entretanto, em adição, o peptídio  $[M + H]^+$  882 foi mapeado nas posições de 179 a 186, uma região não identificada previamente. Os dados da análise desse duplo digesto identificaram cinco dos doze resíduos de metionina da seqüência derivada do cDNA. A presença dos sinais de  $m/z$  1214, 1794 e 1812 indicou que as seqüências peptídicas que correspondem a essas massas não contêm resíduos de metionina, pois os sinais já haviam sido observados no espectro do mapa-FAB tríptico original. Porém, como discutido anteriormente, devido à supressão de alguns componentes de uma mistura por outros na análise FAB-MS, a ausência de sinais previamente observados no mapa-FAB tríptico não pode ser interpretada unicamente como peptídios que contêm metionina e foram digeridos.

As massas de peptídios que não mapearam na seqüência foram mais numerosas que os sinais observados apenas em uma ou duas formas de PDC. Assim, foi dada prioridade à determinação do grau de diferenciação entre a seqüência derivada do gene PDC 1 publicada e a elucidada experimentalmente nesse estudo de mapeamento-FAB.

## 1.6.Digestão por quimotripsina

Uma amostra da proteína PDC A<sub>1</sub> foi digerida com quimotripsina e o mapa-FAB resultante está apresentado na Figura 37. Através do programa de computador, como descrito anteriormente, os sinais mais intensos foram identificados com peptídios da sequência da proteína. Sete desses sinais foram mapeados com segurança na sequência derivada do gene PDC 1, os quais estão listados, juntamente com seus resíduos correspondentes, na Tabela V. Um oitavo sinal, de m/z 1010, que, inicialmente, não encontrou correspondência, foi posteriormente mapeado nas posições de 334 a 343, após ter sido identificado um erro na sequência prevista a partir do gene PDC 1 num experimento de espectrometria de massa por varredura ligada B/E-CAD que será discutido posteriormente.

Para isolar e identificar quaisquer fragmentos quimotrípticos gerados, mas não observados pela análise FAB-MS devido à supressão, o digesto foi purificado por HPLC de fase reversa. A análise das frações por FAB-MS possibilitou a identificação de vinte e um fragmentos peptídicos não detectados no mapa-FAB da mistura do digesto não fracionado, os quais estão listados na Tabela VI.

Vários dos sinais mapeados na sequência derivada do gene PDC 1 não encontraram correspondência nas deduzidas a partir dos dois outros genes estruturais descritos. Para PDC 5, vinte e seis diferenças foram encontradas nas sequências correspondentes aos sinais: 365(2), 417(1), 446(1), 538(1),



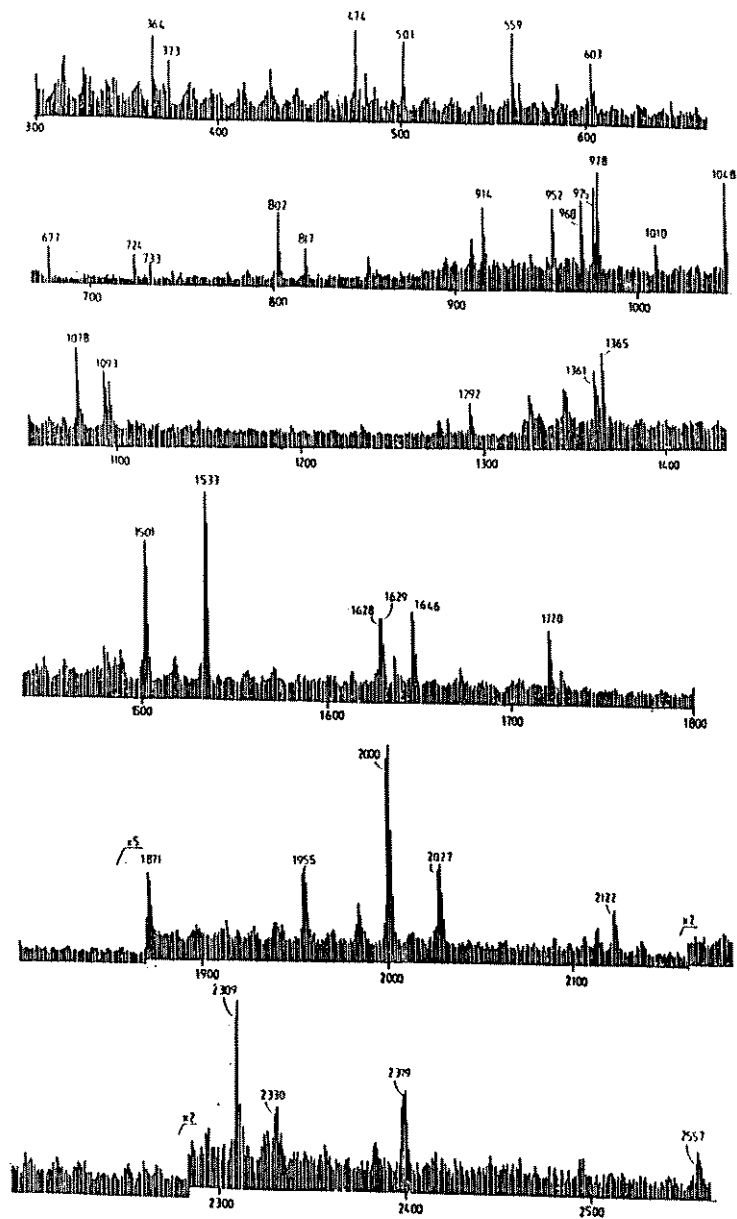


FIG. 37. Mapa-FAB quimotríptico de PDC A<sub>1</sub> obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2SE).

TABELA V. Sinais adicionais interpretáveis observados no mapa-FAB quimotríptico de PDC A<sub>1</sub>.

| [M + H] <sup>+</sup> | Resíduos |
|----------------------|----------|
| 474                  | 75-79    |
| 978 <sup>a</sup>     | 301-308  |
| 1010 <sup>ab</sup>   | 334-343  |
| 1096 <sup>a</sup>    | 207-216  |
| 1233 <sup>a</sup>    | 243-254  |
| 1361 <sup>a</sup>    | 313-324  |
| 1501 <sup>a</sup>    | 267-280  |
| 2027 <sup>a</sup>    | 344-364  |

<sup>a</sup> Sinais parcialmente mapeados a partir do mapa-FAB tríptico anterior.

<sup>b</sup> Sinal mapeado após ter sido identificado um erro na sequência derivada do gene PDC<sub>1</sub> por espectrometria de massa por varredura ligada B/E-CAD: o resíduo 335 é, na realidade, uma treonina e não uma asparagina.

TABELA VI. Sinais adicionais interpretáveis observados nos mapas-FAB após HPLC do dígito quimotríptico de PDC A<sub>1</sub>.

| [M + H] <sup>+</sup> | Resíduos             |
|----------------------|----------------------|
| 336                  | 369-370              |
| 337                  | 374-376              |
| 365                  | 423-426              |
| 389                  | 263-266              |
| 417 <sup>a</sup>     | 12-14 <sup>a</sup>   |
| 446                  | 283-287              |
| 477 <sup>a</sup>     | 498-501 <sup>a</sup> |
| 480                  | 412-416              |
| 503 <sup>a</sup>     | 487-490 <sup>a</sup> |
| 538                  | 35-38                |
| 553                  | 502-506              |
| 561                  | 441-446              |
| 605 <sup>a</sup>     | 24-29 <sup>a</sup>   |
| 641 <sup>a</sup>     | 174-179 <sup>a</sup> |
| 681                  | 83-89                |
| 688                  | 46-52                |
| 862 <sup>a</sup>     | 217-224 <sup>a</sup> |
| 906                  | 39-45                |
| 919                  | 510-517              |
| 1031                 | 225-233              |
| 1481                 | 427-439              |

<sup>a</sup> Sinais parcial ou totalmente mapeados a partir do mapa-FAB tríptico anterior.

553(2), 862(1), 906(1), 1010(5), 1096(1), 1233(2), 1361(1), 1481(1), 1501(2) e 2027(8). Para PDC 6, foram observadas quarenta e duas diferenças assim distribuídas: 336(1), 337(2), 477(1), 553(1), 641(3), 862(2), 906(2), 919(2), 978(1), 1010(4), 1031(3), 1096(4), 1233(2), 1361(4), 1481(1), 1501(3) e 2027(6).

### 1.7.Clivagem por CNBr

Na reação do brometo de cianogênio (Gross & Witkop, 1962) resíduos de metionina são seletivamente convertidos a homoserina (e/ou sua lactona), com simultânea clivagem da ligação peptídica do lado carboxila do aminoácido (Apêndice F). Neste estudo, além do baixo número de resíduos de metionina na sequência derivada do gene PDC 1 (apenas doze, como referido anteriormente), a clivagem com CNBr das três formas de PDC se apresentou, estrategicamente, interessante pela presença de tais resíduos em regiões para as quais pouca informação havia sido obtida com os digestos anteriores.

As massas dos íons quase-moleculares previstos e observados estão listadas na Tabela VII. Para cada caso, duas massas teóricas, com uma diferença característica de 18 D e correspondendo aos derivados homoserina e lactona da metionina, podem ser antecipadas. A análise FAB-MS de cada mistura do digesto CNBr permitiu a identificação de três peptídios previstos, com valores de  $m/z$  976, 1313 e 2552, observados nas três formas de PDC. O de  $m/z$  976 mapeou nas

posições de 128 a 137, uma região não identificada anteriormente, e correspondeu ao derivado homosserina; sua identificação permitiu o mapeamento de vinte e dois resíduos de aminoácidos, para os quais nenhum dado de seqüência havia sido obtido previamente. O fragmento de m/z 1313, uma lactona, derivou da seqüência protéica entre os resíduos 314 e 325, a qual já havia sido mapeada anteriormente.

TABELA VII. Íons quase-moleculares,  $[M + H]^+$ , previstos e observados a partir da seqüência derivada do gene PDC 1, após clivagem de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B por brometo de cianogênio e respectivos resíduos.

| [M + H] <sup>+</sup> previstos |                            |                            |                            | [M + H] <sup>+</sup> observados | Resíduos |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------|
| Lactona de homosserina         |                            | Homosserina                |                            |                                 |          |
| Seq.publicada <sup>a</sup>     | Seq.corrigida <sup>b</sup> | Seq.publicada <sup>a</sup> | Seq.corrigida <sup>b</sup> |                                 |          |
| 4875                           | 4786                       | 4893                       | 4804                       |                                 | 1-43     |
| 2537                           |                            |                            | 2555                       | 2552                            | 44-67    |
|                                |                            |                            |                            | 2568                            |          |
| 6204                           |                            |                            | 6222                       |                                 | 68-127   |
| 977                            |                            |                            | 995                        | 976                             | 128-137  |
|                                |                            |                            |                            | 1072                            |          |
|                                |                            |                            |                            | 1090                            |          |
|                                | 5437                       |                            | 5455                       |                                 | 138-186  |
|                                | 6564                       |                            | 6582                       |                                 | 187-246  |
|                                | 7233                       |                            | 7251                       |                                 | 247-313  |
|                                | 1315                       |                            | 1333                       | 1313                            | 314-325  |
| 4660                           | 4646                       | 4678                       | 4664                       |                                 | 326-369  |
|                                | 9222                       |                            | 9240                       |                                 | 370-456  |
|                                | 9073                       |                            | 9096                       |                                 | 457-534  |
|                                | 444                        |                            | 462                        |                                 | 535-538  |
|                                |                            | 1180                       |                            |                                 | 539-549  |
|                                |                            |                            |                            | 457                             |          |
|                                |                            |                            |                            | 913                             |          |

<sup>a</sup>Considerando a seqüência de Kellermann et al.(1986)

<sup>b</sup>Considerando a seqüência de Kellermann et al.(1986) corrigida com base nos resultados obtidos nesta tese (Figuras 48 e 49)

Para averiguar se os outros dois peptídios de baixa massa previstos (535-538,  $[M + H]^+ 461$  e o C-terminal 539-549,  $[M + H]^+ 1179$ ) haviam sido formados, mas não observados no mapa-FAB devido a efeitos de supressão, a mistura do digesto foi purificada por HPLC de fase reversa. A análise FAB-MS das frações identificou os peptídios de  $m/z$  976, 1313 e 2552, previamente observados nos mapas-FAB das misturas dos digestos CNBr não fracionados.

Um sinal de  $m/z$  2568 foi também detectado na mesma fração do peptídio de  $m/z$  2552. Esse sinal pode ser explicado por uma provável oxidação de um resíduo de triptofano encontrado na seqüência do peptídio de  $m/z$  2552, o que resultaria num incremento de massa de 16 D. Uma observação curiosa é a presença de dois sinais intensos de  $m/z$  1072 e 1090 detectados na mesma fração que o peptídio de  $m/z$  976. A presença do sinal de  $m/z$  1090, que é 18 D maior que o de  $m/z$  976, é indicativa de um peptídio com um resíduo de metionina modificado no C-terminal. Vários passos de degradação de Edman manual de uma alíquota da fração de HPLC, seguidos de análise por FAB-MS, mostraram que o peptídio de  $m/z$  1072 possui seqüência do N-terminal idêntica ao de  $m/z$  976, indicando a possibilidade de uma modificação pós-tradução do peptídio de  $[M + H]^+ 976$ . A diferença de massa entre esses peptídios foi calculada como sendo 96 D, um valor que não corresponde a nenhuma modificação pós-tradução conhecida, tal como ácido 8-carboxiglutâmico, fosforilação ou glicosilação. Porém, uma revisão do procedimento de fracionamento elucidou

a questão com a conclusão de que essa diferença de massa é resultado da ligação de uma molécula de ácido trifluoroacético, TFA, adicionado aos tampões para HPLC, ao peptídeo  $[M + H]^+ 976$ . Uma alíquota da fração contendo apenas o peptídeo de  $m/z$  1072/1090 foi examinada por seqüenciamento em fase gasosa automatizado. O peptídeo de  $m/z$  976 havia sido mapeado na seqüência Ser-Ala-Asn-Ile-Ser-Glu-Thr-Ala-Met (128-137). A degradação de Edman em fase gasosa automatizada do peptídeo de  $m/z$  1072/1090 produziu a seqüência parcial Ser-Ala-Ans- Ile-Ser, porém, após a Ser<sub>132</sub>, os dados foram não interpretáveis, sugerindo que a molécula de TFA se ligou ao resíduo Glu<sub>133</sub> ou Thr<sub>135</sub>. A ligação de uma molécula de TFA ao peptídeo sugere que essa é uma parte da molécula de PDC extremamente ativa. A análise das frações restantes por FAB-MS revelou sinais intensos em  $m/z$  457 e 913, os quais não encontraram correspondência na seqüência derivada do gene PDC 1. Outros sinais observados foram relativamente fracos e não se tem segurança de que derivaram de PDC.

### **1.8.Resultados gerais do mapeamento-FAB**

Os resíduos de aminoácidos que foram confirmados pelos experimentos de mapeamento-FAB estão sublinhados na seqüência derivada do gene PDC 1 para PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B nas Figuras 38, 39 e 40, respectivamente. Deve-se considerar que menos informação de seqüência foi obtida para PDC A<sub>2</sub> e PDC B do que para PDC A<sub>1</sub> pelo fato de os primeiros não terem sido

```

met ser glu ile thr leu gly lys tyr leu phe glu arg leu lys gln val asn val
 1                               10
asn thr val phe gly leu pro gly asp phe asn leu ser leu leu asp lys ile tyr
20                               30
glu val glu gly met arg trp ala gly asn ala asn glu leu asn ala ala tyr ala
40                               50
ala asp gly tyr ala arg ile lys gly met ser cys ile ile thr thr phe gly val
60                               70
gly glu leu ser ala leu asn gly ile ala gly ser tyr ala glu his val gly val
80                               90
leu his val val gly val pro ser ile ser ser gln ala lys gln leu leu leu his
100                              110
thr leu gly asn gly asp phe thr val phe his arg met ser ala asn ile ser glu
120                              130
thr thr ala met ile thr asp ile cys thr pro gln ala glu ile asp arg cys ile
140                              150
arg thr thr tyr val thr gln arg pro val tyr leu gly leu pro ala asn leu val
160                              170
asn leu asn val pro ala lys leu leu gln thr pro ile asp met ser leu lys pro
180                              190
asn asp ala glu ser glu lys glu val ile asp thr ile leu val leu val lys asp
200
ala lys asn pro val ile leu ala asp ala cys cys ser arg his asp val lys ala
210                              220
glu thr lys lys leu ile asp leu thr gln phe pro ala phe val thr pro met gly
230                              240
lys gly ser ile ser glu gln his pro arg tyr gly gly val tyr val gly thr leu
250                              260
ser lys pro glu val lys glu ala val glu ser ala asp leu ile leu ser val gly
270                              280
ala leu leu ser asp phe asn thr gly ser phe ser tyr ser tyr lys thr lys asn
290                              300
ile val glu phe his ser asp his met lys ile arg asn ala thr phe pro gly val
310                              320
gln met lys phe val leu gln lys leu leu thr thr ile ala asp ala ala lys gly
330                              340
tyr lys pro val ala val pro ala arg thr pro ala asn ala ala val pro ala ser
350                              360
thr pro leu lys gln glu trp met trp asn gln leu gly asn phe leu gln glu gly
370                              380
asp val val ile ala glu thr gly thr ser ala phe gly ile asn gln thr thr phe
390
pro asn asn thr tyr gly ile ser gln val leu trp gly ser ile gly phe tyr tyr
400                              410
gly ala thr leu gly ala ala phe ala ala glu glu ile asp pro lys lys arg val
420                              430
ile leu phe ile gly asp gly ser leu gln leu thr val gln glu ile ser thr met
440                              450
ile arg trp gly leu lys pro tyr leu phe val leu asn asn asp gly tyr thr ile
460                              470
glu lys leu ile his gly pro lys ala gln tyr asn glu ile gln gly trp asp his
480                              490
leu ser leu leu pro thr phe gly ala lys asp tyr glu thr his arg val ala thr
500                              510
thr gly glu trp asp lys leu thr gln asp lys ser phe asn asp asn ser lys ile
520                              530
arg met ile glu val met leu pro val phe asp cys ser thr lys leu gly
540

```

FIG. 38. Resíduos de aminoácidos de PDC A<sub>1</sub> mapeados na sequência derivada do gene PDC 1 por FAB-MS. Além das regiões assinaladas, duas outras foram, posteriormente, identificadas por varredura ligada, correspondendo aos resíduos de 2 a 8 (figura 48) e de 332 a 341 (figura 49).

met ser glu ile thr leu gly lys tyr leu phe glu arg leu lys gln val asn val  
 1 10  
asn thr val phe gly leu pro gly asp phe asn leu ser leu asp lys ile tyr  
 20 30  
 glu val glu gly met arg trp ala gly asn ala asn glu leu asn ala ala tyr ala  
 40 50  
ala asp gly tyr ala arg ile lys gly met ser cys ile ile thr thr phe gly val  
 60 70  
 gly glu leu ser ala leu asn gly ile ala gly ser tyr ala glu his val gly val  
 80 90  
 leu his val val gly val pro ser ile ser ser gln ala lys gln leu leu leu his  
 100 110  
 thr leu gly asn gly asp phe thr val phe his arg met ser ala asn ile ser glu  
 120 130  
thr thr ala met ile thr asp ile cys thr pro gln ala glu ile asp arg cys ile  
 140 150  
 arg thr thr tyr val thr gln arg pro val tyr leu gly leu pro ala asn leu val  
 160 170  
asp leu asn val pro ala lys leu leu gln thr pro ile asp met ser leu lys pro  
 180 190  
asn asp ala glu ser glu lys glu val ile asp thr ile leu val leu val lys asp  
 200  
 ala lys asn pro val ile leu ala asp ala cys cys ser arg his asp val lys ala  
 210 220  
 glu thr lys lys leu ile asp leu thr gln phe pro ala phe val thr pro met gly  
 230 240  
lys gly ser ile ser glu gln his pro arg tyr gly gly val tyr val gly thr leu  
 250 260  
ser lys pro glu val lys glu ala val glu ser ala asp leu ile leu ser val gly  
 270 280  
 ala leu leu ser asp phe asn thr gly ser phe ser tyr ser tyr lys thr lys asn  
 290 300  
 ile val glu phe his ser asp his met lys ile arg asn ala thr phe pro gly val  
 310 320  
gln met lys phe val leu gln lys leu leu thr thr ile ala asp ala ala lys gly  
 330 340  
tyr lys pro val ala val pro ala arg thr pro ala asn ala ala val pro ala ser  
 350 360  
thr pro leu lys gln glu trp met trp asn gln leu gly asn phe leu gln glu gly  
 370 380  
 asp val val ile ala glu thr gly thr ser ala phe gly ile asn gln thr thr phe  
 390  
 pro asn asn thr tyr gly ile ser gln val leu trp gly ser ile gly phe tyr tyr  
 400 410  
 gly ala thr leu gly ala ala phe ala ala glu ile asp pro lys lys arg val  
 420 430  
 ile leu phe ile gly asp gly ser leu gln leu thr val gln glu ile ser thr met  
 440 450  
 ile arg trp gly leu lys pro tyr leu phe val leu asn asn asp gly tyr thr ile  
 460 470  
 glu lys leu ile his gly pro lys ala gln tyr asn glu ile gln gly trp asp his  
 480 490  
 leu ser leu leu pro thr phe gly ala lys asp tyr glu thr his arg val ala thr  
 500 510  
 thr gly glu trp asp lys leu thr gln asp lys ser phe asn asp asn ser lys ile  
 520 530  
 arg met ile glu val met leu pro val phe asp cys ser thr lys leu gly  
 540

FIG. 39. Resíduos de aminoácidos de PDC A<sub>2</sub> mapeados na sequência derivada do gene PDC 1 por FAB-MS. Além das regiões assinaladas, duas outras foram, posteriormente, identificadas por varredura ligada, correspondendo aos resíduos de 2 a 8 (figura 48) e de 332 a 341 (figura 49).



```

met ser glu ile thr leu gly lys tyr leu phe glu arg leu lys gln val asn val
1      10
asn thr val phe gly leu pro gly asp phe asn leu ser leu leu asp lys ile tyr
20      30
glu val glu gly met arg trp ala gly asn ala asn glu leu asn ala ala tyr ala
40      50
ala asp gly tyr ala arg ile lys gly met ser cys ile ile thr thr phe gly val
60      70
gly glu leu ser ala leu asn gly ile ala gly ser tyr ala glu his val gly val
80      90
leu his val val gly val pro ser ile ser ser gln ala lys gln leu leu leu his
100     110
thr leu gly asn gly asp phe thr val phe his arg met ser ala asn ile ser glu
120     130
thr thr ala met ile thr asp ile cys thr pro gln ala glu ile asp arg cys ile
140     150
arg thr thr tyr val thr gln arg pro val tyr leu gly leu pro ala asn leu val
160     170
asp leu asn val pro ala lys leu leu gln thr pro ile asp met ser leu lys pro
180     190
asn asp ala glu ser glu lys glu val ile asp thr ile leu val leu val lys asp
200
ala lys asn pro val ile leu ala asp ala cys cys ser arg his asp val lys ala
210     220
glu thr lys lys leu ile asp leu thr gln phe pro ala phe val thr pro met gly
230     240
lys gly ser ile ser glu gln his pro arg tyr gly gly val tyr val gly thr leu
250     260
ser lys pro glu val lys glu ala val glu ser ala asp leu ile leu ser val gly
270     280
ala leu leu ser asp phe asn thr gly ser phe ser tyr ser tyr lys thr lys asn
290     300
ile val glu phe his ser asp his met lys ile arg asn ala thr phe pro gly val
310     320
gln met lys phe val leu gln lys leu leu thr thr ile ala asp ala ala lys gly
330     340
tyr lys pro val ala val pro ala arg thr pro ala asn ala ala val pro ala ser
350     360
thr pro leu lys gln glu trp met trp asn gln leu gly asn phe leu gln glu gly
370     380
asp val val ile ala glu thr gly thr ser ala phe gly ile asn gln thr thr phe
390
pro asn asn thr tyr gly ile ser gln val leu trp gly ser ile gly phe tyr tyr
400     410
gly ala thr leu gly ala ala phe ala ala glu glu ile asp pro lys lys arg val
420     430
ile leu phe ile gly asp gly ser leu gln leu thr val gln glu ile ser thr met
440     450
ile arg trp gly leu lys pro tyr leu phe val leu asn asn asp gly tyr thr ile
460     470
glu lys leu ile his gly pro lys ala gln tyr asn glu ile gln gly trp asp his
480     490
leu ser leu leu pro thr phe gly ala lys asp tyr glu thr his arg val ala thr
500     510
thr gly glu trp asp lys leu thr gln asp lys ser phe asn asp asn ser lys ile
520     530
arg met ile glu val met leu pro val phe asp cys ser thr lys leu gly
540

```

FIG. 40. Resíduos de aminoácidos de PDC B mapeados na sequência derivada do gene PDC 1 por FAB-MS. Além das regiões assinaladas, duas outras foram, posteriormente, identificadas por varredura ligada, correspondendo aos resíduos de 2 a 8 (figura 48) e de 332 a 341 (figura 49).

submetidos ao experimento de digestão com quimotripsina. Com base nesse estudo de mapeamento-FAB, mais de 50% da sequência do gene foi confirmada. Entretanto, foram gerados dados que sugerem a existência de algumas diferenças na sequência da proteína PDC aqui investigada e aquela determinada a partir da sequência do gene publicada. Outrossim, há evidência para sugerir que as diferenças entre as formas PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B são relativamente pequenas e que proteólise limitada de uma cadeia polipeptídica para formar outra é improvável.

O mapeamento-FAB revelou, ainda, que nenhuma das três formas de PDC analisadas é produto dos genes PDC 5 e PDC 6.

## **2. Varredura Ligada B/E-CAD**

Na varredura ligada B/E-CAD, para cada peptídio examinado, uma lei de varredura B/E é computada para permitir a transmissão e a detecção de íons filhos, determinadores de sequência, os quais são enriquecidos por decomposições ativadas por colisão. A denominação de tais íons, obtidos nos espectros de massa deste trabalho, seguiu a nomenclatura proposta por Roepstorff & Fohlman (1984), segundo a qual os três possíveis pontos de clivagem do esqueleto peptídico são chamados A, B e C, quando a carga é retida no fragmento do N-terminal do peptídio, e X, Y, e Z, quando no fragmento do C-terminal; a numeração indica que a ligação peptídica é clivada, contando a partir do N- e do C-terminais, respectivamente, e, portanto, indica também o número de

resíduos de aminoácidos no íon do fragmento; o número de hidrogênios ganhos ou perdidos é indicado com apóstrofes à direita e à esquerda da letra, respectivamente. Assim, por exemplo,  $Y_n''$  indica um íon amônio contendo  $n$  resíduos de aminoácido a partir do C-terminal do peptídeo, para o qual dois hidrogênios foram transferidos. A perda de cadeias laterais ou parte delas é também possível, o que origina os íons do tipo  $d_n$ ,  $w_n$  e  $v_n$  recentemente relatados (Johnson et al., 1987 e 1988). O esquema do Apêndice G apresenta as estruturas dos íons resultantes da clivagem do esqueleto peptídico (íons  $A_n$ ,  $B_n$ ,  $C_n$ ,  $X_n$ ,  $Y_n$  e  $Z_n$ ) e de cadeias laterais (íons  $d_n$ ,  $w_n$  e  $v_n$ ).

Para avaliar a aplicabilidade da técnica na análise direta de componentes desconhecidos de misturas complexas de digestos peptídicos foi necessário, inicialmente, checar a metodologia na análise da sequência de peptídeos puros, como segue.

## 2.1. Análise de peptídeos puros

Os peptídeos puros leucina encefalinamida, angiotensina II, substrato da renina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina humana foram analisados para uma avaliação preliminar da aplicabilidade da metodologia.

O espectro da leu-encefalinamida,  $[M + H]^+ 555$ , obtido em espectrômetro de setor duplo com gás hélio ( $1,5 \times 10^{-7}$  Torr) na câmara de colisão, e o esquema de fragmentação

racionalizando a origem dos íons encontrados estão apresentados nas Figuras 41 e 42, respectivamente. Os íons da série B, juntamente com o íon  $A_1$ , permitem deduzir a seqüência Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-amida (YGGFL amida); os demais confirmam essa seqüência. Além das clivagens no esqueleto do peptídio, o espectro mostra a perda de uma cadeia lateral, o que é ilustrado pelo íon de  $m/z$  447, onde a cadeia lateral da tirosina ( $m = 107$ ) foi removida. O íon corresponde ao tipo de íons  $v_n$ , relatado por Johnson et al. (1988). É interessante observar que o espectro FAB normal da leu-encefalinamida (Figura 43) contém virtualmente os mesmos fragmentos que os produzidos por varredura ligada B/E-CAD, porém em muito menor intensidade. A seqüência da encefalina, na realidade, foi, originalmente, determinada por espectrometria de massa por impacto eletrônico, como um opióide natural desconhecido de tecido cerebral, tendo-se encontrado ser uma mistura de dois peptídios relacionados com C-terminal Leu e Met, respectivamente (Hughes et al., 1975). Entretanto, é necessário ressaltar que o grau de fragmentação observado numa análise de peptídios por FAB-MS é imprevisível. Em alguns espectros FAB, dados de fragmentação suficientes para uma análise de seqüência completa são observados, enquanto que, em outros, um seqüenciamento apenas parcial é possível. Em geral, FAB-MS produz poucos dados de fragmentação e, assim, métodos complementares que combinem alta sensibilidade e rápida produção de dados interpretáveis para a elucidação de estrutura constituem uma grande demanda.

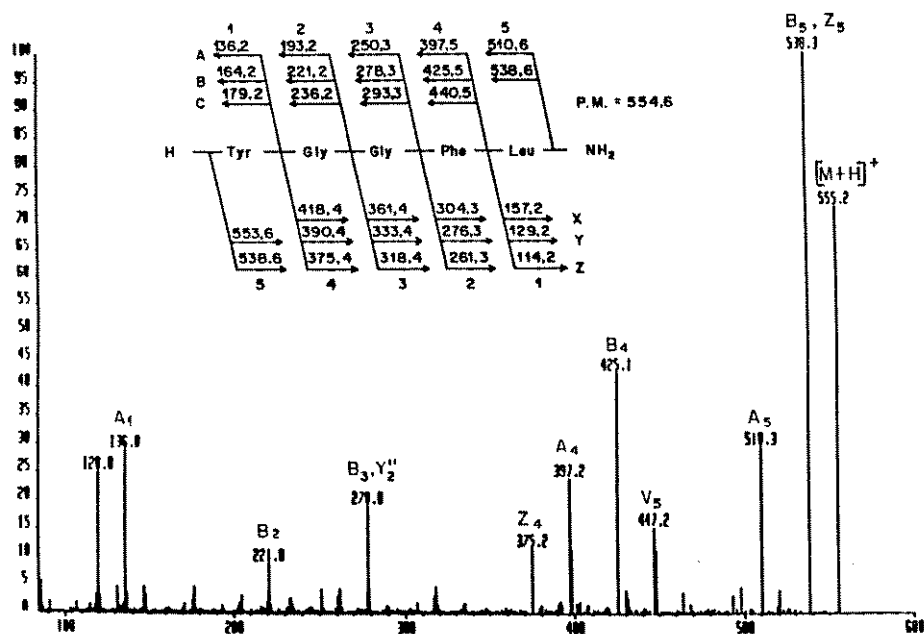


FIG. 41. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD da leucina-encefalina obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E).

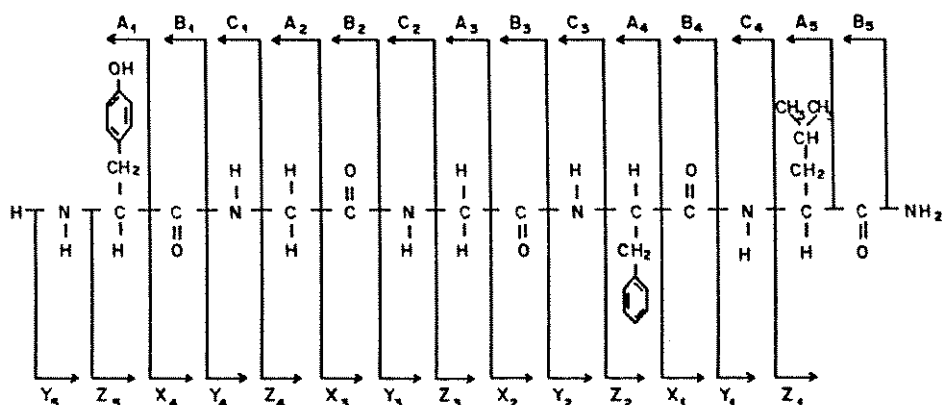


FIG. 42. Esquema de fragmentação racionalizando a origem dos íons encontrados no espectro de massa da figura 41, segundo nomenclatura de Roepstorff & Fohlman (1984).

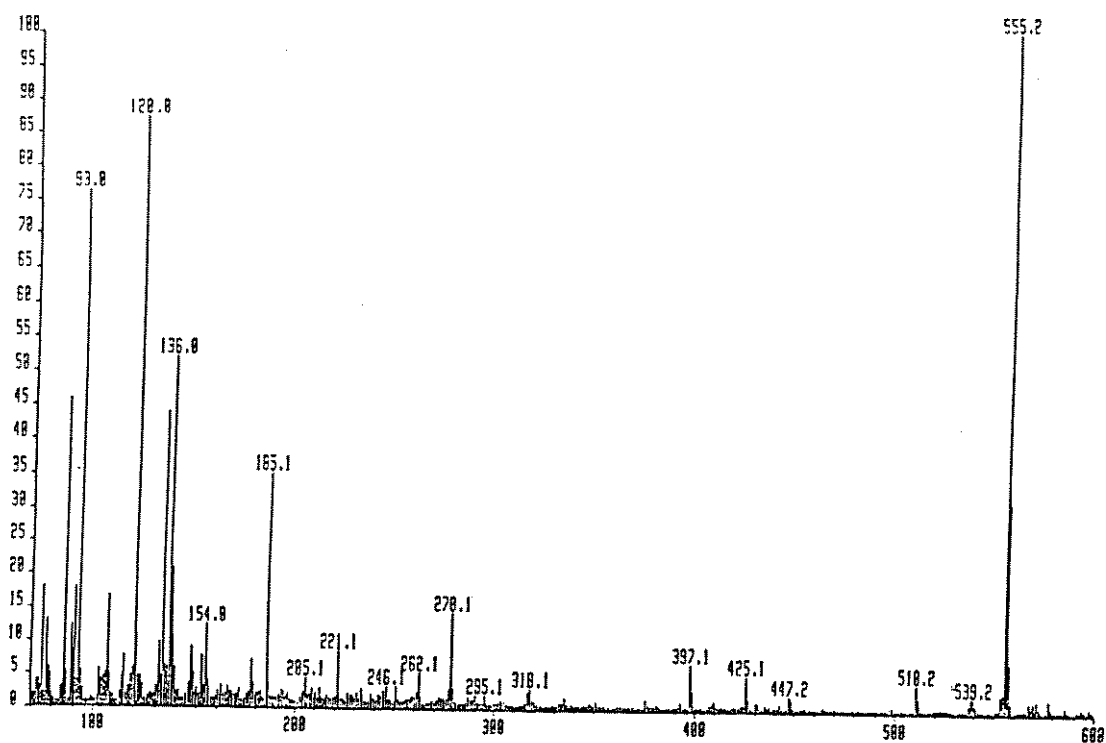


FIG. 43. Espectro FAB-MS da leucina-encefalinamida obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E).

O espectro da angiotensina II está apresentado na Figura 44. Os íons da série A, juntamente com o íon quase-molecular  $[M + H]^+ 1046$ , facilmente definem a seqüência: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe.

Para o tetradecapeptídio do substrato da renina (angiotensinogênio), de origem suína e  $[M + H]^+ 1760$ , foram obtidos dois espectros, sendo um em espectrômetro de setor duplo (Figura 45) e o outro em espectrômetro de quatro setores (Figura 46). Nesse pequeno peptídio, íons da série A permitem deduzir a seqüência Tyr<sub>4</sub>-Ile<sub>5</sub>-His<sub>6</sub>-Pro<sub>7</sub>-Phe<sub>8</sub>-His<sub>9</sub>-Leu<sub>10</sub>-Leu<sub>11</sub>-Val<sub>12</sub>-Tyr<sub>13</sub>-Ser<sub>14</sub>. A diferenciação entre leucina e isoleucina nas posições 5, 10 e 11 é possível graças à presença dos íons d<sub>5</sub>, d<sub>10</sub> e d<sub>11</sub> em combinação com os respectivos íons da série A ( $A_5-d_5 = 28$ ;  $A_{10}-d_{10} = 42$ ; e  $A_{11}-d_{11} = 42$ , respectivamente). É interessante notar que, ao contrário do observado por Johnson et al. (1988), os íons da série d<sub>n</sub>, aqui identificados, se originam dos respectivos íons A<sub>n</sub> e não A<sub>n+1</sub>. Como no caso do íon v<sub>5</sub> do espectro da leucina encefalinamida, referido anteriormente, esses íons não foram mencionados no trabalho publicado (Morris et al., 1989). Os resíduos 2 e 3 podem ser inferidos com o auxílio do íon Y<sub>13</sub><sup>u</sup> que aparece no espectro do tetradecapeptídio obtido num instrumento MS/MS de quatro setores, como segue:

$$Y_{13}^u - 2H - (R_4 \dots R_{14}OH) = R_2 + R_3$$

$$1644,5 - 2 - (1370,6 + 17) = R_2 + R_3$$

$$R_2 + R_3 = 254,9$$

A combinação de dois aminoácidos que se ajusta ao caso é

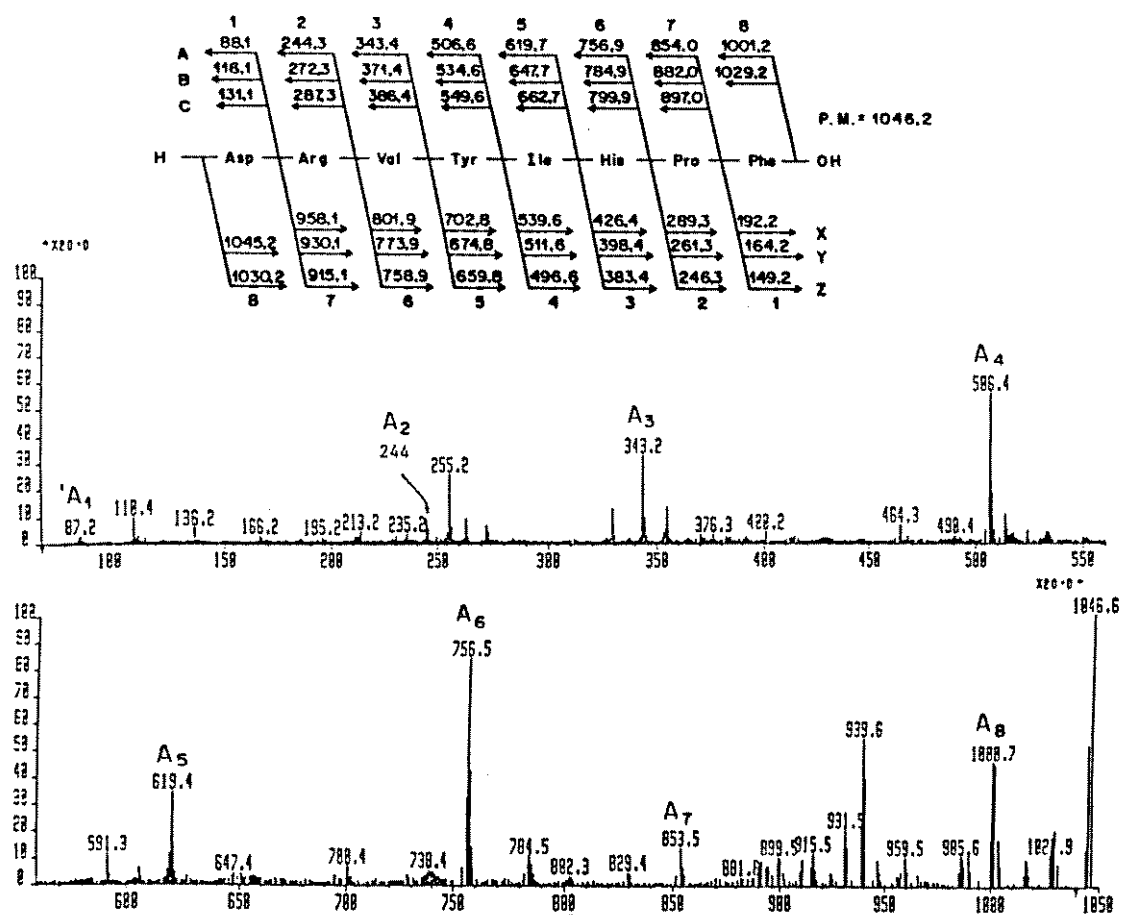


FIG. 44. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD (He) da angiotensina II obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2).



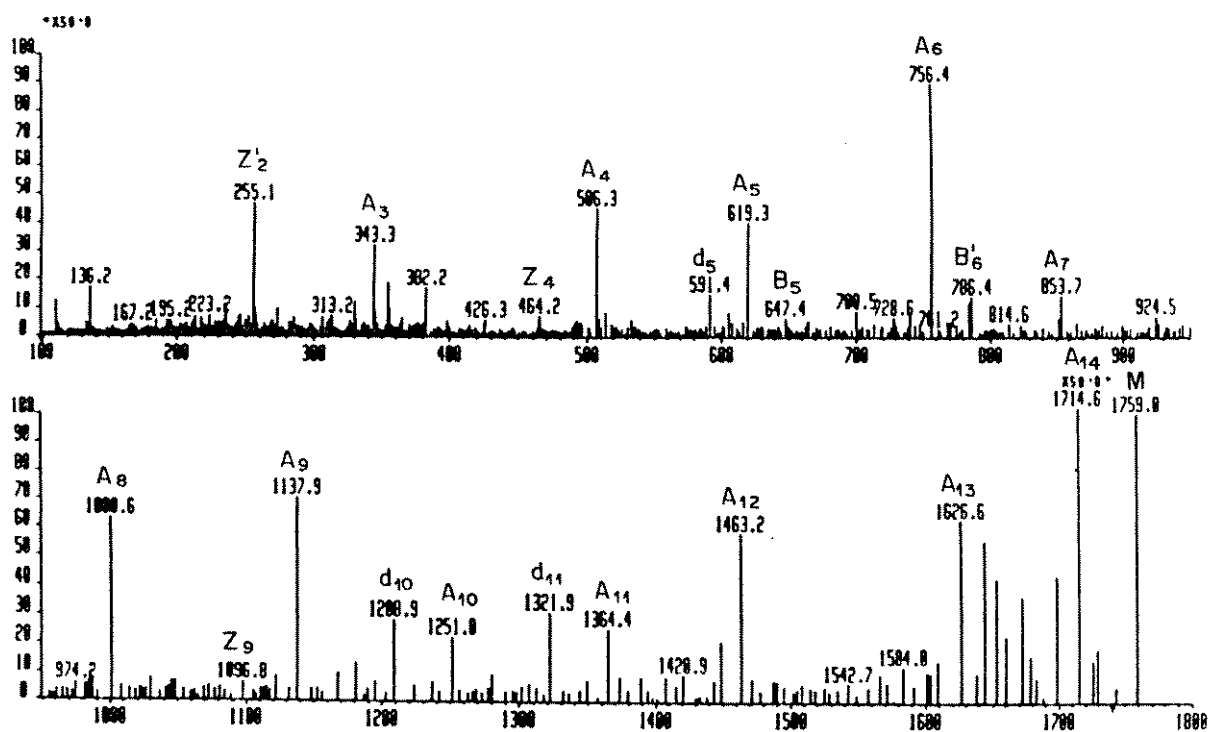
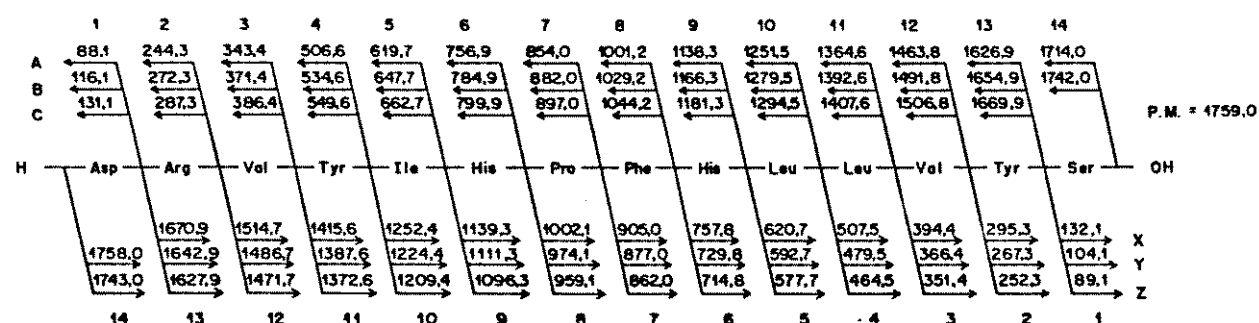


FIG. 45. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD do tetradeca-peptídeo substrato da renina obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E).

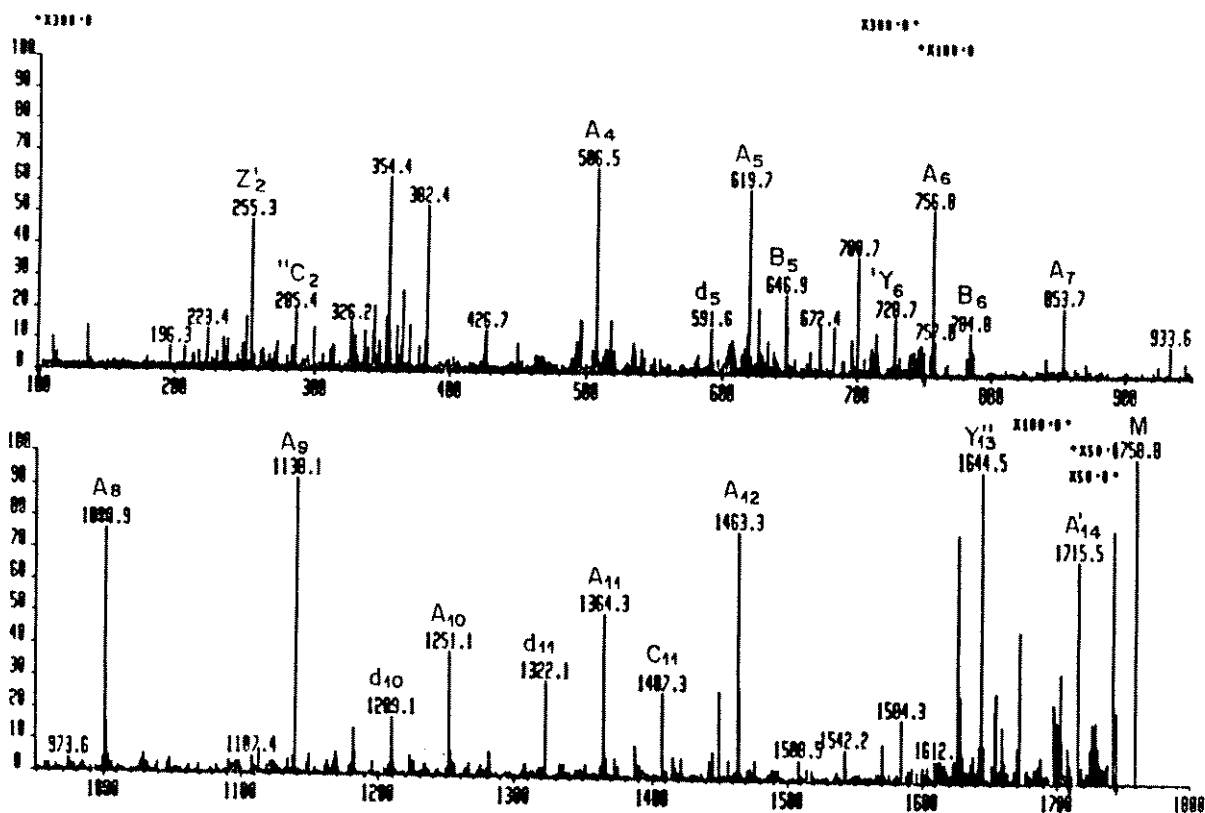
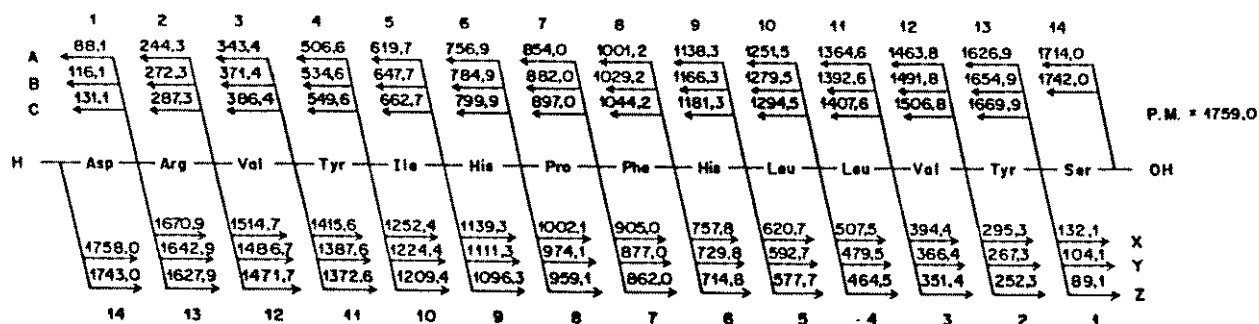


FIG. 46. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD do tetradeca-peptídeo substrato da renina obtido em espectrômetro de setor quádruplo (VG Analytical ZAB SE-4F). Observe-se a similaridade com o espectro da figura 45.

Arg-Val, não se podendo definir, porém, a sua ordem na sequência do peptídio. O resíduo 1 pode ser deduzido subtraindo-se o íon  $Y_{13}''$  do íon molecular, descontando-se devidamente os prótons:

$$M - (Y_{13}'' - 2H) - H = R_1$$

$$1758,8 - (1644,5 - 2) - 1 = 115,3$$

Essa massa corresponde ao resíduo de ácido aspártico, completando, assim, a sequência do peptídio.

A qualidade do espectro obtido para o substrato da renina com um espectrômetro de dois setores é perfeitamente comparável a do obtido com o instrumento de quatro setores, com os sinais de ruído para peptídios puros de intensidade similar para ambos os casos. Menos de 1 nanomol de material foi usado para o instrumento de dois setores, indicando que o procedimento é altamente sensível para a análise de sequência de peptídio.

Os dados apresentados ilustram a aplicabilidade da análise de varredura ligada B/E-CAD para o seqüenciamento rápido de peptídios puros com alta sensibilidade. Para determinar se a técnica tem um limite de massa para se obterem íons de sequência em quantidade que possibilite a dedução completa da sequência de aminoácidos, este estudo foi subseqüentemente estendido ao exame do peptídio relacionado ao gene da calcitonina humana, hCGRP, um peptídio de 37 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular de 3786 D. O espectro gerado indicou uma possível limitação para a aplicabilidade do método a peptídios com uma massa acima de aproximadamente

2000 D. Uma seleção limitada de íons de fragmentos acila e aldimina do N-terminal foi observada, porém não foi possível a dedução de uma sequência parcial, pois esses fragmentos ocorreram ao acaso. Apesar da aparente limitação, a varredura ligada pode ainda ser útil para aplicação a grandes peptídios, tais como o hCGRP, em estudos onde a sequência, ou parte dela, foi determinada por outras técnicas. O papel da varredura ligada seria de fornecer um procedimento rápido e altamente sensível para a confirmação de sequência parcial pelo fornecimento de íons de fragmentos ao acaso, os quais podem ser correlacionados com a sequência elucidada. Uma vantagem indiscutível de se analisarem íons de fragmentos ao acaso é a existência de uma igual probabilidade de se observarem sinais que correspondem a fragmentos derivados tanto da região do C- como do N-terminal de um peptídio grande.

Durante o curso deste trabalho de tese, outros autores (Tomer et al., 1988a) investigaram, independentemente, a aplicabilidade da espectrometria de massa tandem aliada à decomposição ativada por colisão, FAB/MS/CAD/MS, para a determinação da estrutura de vários fragmentos de  $\beta$ -endorfina e dois peptídios de hormônios adrenocorticotrópicos por varredura ligada de seus produtos filhos. Esses autores observaram que: 1) os íons de fragmentos do N-terminal foram ligeiramente mais abundantes que os do C-terminal, embora essa fosse uma característica dependente do composto analisado; 2) outros gases de colisão, tais como argônio,

xenônio e hexafluoreto, não geraram um aumento significativo da fragmentação das espécies protonadas; e 3) a utilidade da decomposição ativada por colisão de moléculas é decrescente à medida que a massa molecular aumenta.

Este trabalho demonstra que a varredura ligada B/E-CAD, num instrumento de dois setores, de peptídios puros com massas comparáveis a dos usados por Tomer et al. (1988a) gera dados de alta qualidade, adequados à análise de seqüência de peptídios. Uma limitação de massa para a aplicabilidade do método foi também observada e um uso alternativo do método para peptídios com massa molecular acima de 2000 D foi proposto. Entretanto, essa investigação não se restringiu à análise de peptídios puros; o principal objetivo foi o estudo da aplicabilidade do método na análise direta de misturas, usando um instrumento de dois setores, o que será relatado a seguir.

## 2.2. Análise de mistura direta

Procedimentos de purificação, tais como HPLC, para o fracionamento de misturas, com vistas à obtenção de componentes puros para análise subsequente por técnicas clássicas, têm-se mostrado valiosos em estudos de seqüenciamento de proteína. Isso tem sido particularmente verdadeiro quando um digesto protéico gerado é inicialmente analisado por FAB-MS, devido ao fenômeno de supressão de certos componentes por outros numa mistura, como referido anteriormente. Entretanto, com o avanço nas técnicas de

seqüenciamento de DNA, a análise da seqüência protéica completa tem-se tornado desnecessária; a atual ênfase está no fornecimento de parte da seqüência, tipicamente de seis a doze resíduos de aminoácidos, visando a geração de sondas de oligonucleotídios sintéticos para a triagem de bancos genômicos. Um método que possibilitasse uma rápida triagem de componentes não separados numa mistura peptídica seria de grande valor com a eliminação da etapa limitante de purificação. No caso particular deste trabalho, tal método seria perfeitamente adequado à análise de componentes para os quais nenhuma correspondência na seqüência derivada do cDNA pôde ser estabelecida pelo mapeamento-FAB. A seguir, são apresentados os primeiros dados relativos à aplicação da varredura ligada à análise de uma mistura complexa.

#### 2.2.1. Análise da angiotensina II numa mistura do digesto tríptico de PDC

Antes de abordar um problema real de estudo de seqüência para determinar componentes desconhecidos de uma mistura de digesto proteolítico, um "contaminante" conhecido, a angiotensina II, foi analisado numa mistura do digesto tríptico de PDC. Esse peptídeo foi selecionado com base na sua massa molecular,  $[M + H]^+ 1046$ , por ser similar a um dos sinais não identificados, de  $m/z$  1016, no mapa-FAB do digesto. Como a largura da janela de massa num instrumento de dois setores pode ser ajustada para aproximadamente 5 D, a

angiotensina II pode ser perfeitamente resolvida do sinal de  $m/z$  1016. A quantidade de angiotensina II adicionada (aproximadamente 1  $\mu$ g, 950 picomoles) foi estimada de modo a estar em concentração similar a dos outros componentes do digesto. Numa análise FAB-MS de uma alíquota dessa mistura, a intensidade do sinal do íon molecular da angiotensina II foi de aproximadamente 80% daquela do peptídeo de  $m/z$  1016. O espectro de varredura ligada B/E-CAD, Figura 47, mostrou alta qualidade. Pelas diferenças de massa entre os íons de fragmentos aldiminas do N-terminal (série A), a sequência completa da angiotensina II foi determinada. A qualidade desse espectro é similar a do obtido com o peptídeo puro (Figura 44), com apenas um ligeiro aumento no ruído observado. Os resultados do experimento foram bastante promissores com relação à aplicação da varredura ligada à análise de sequência de componentes peptídicos desconhecidos. Conforme referido anteriormente, o mapa-FAB de uma mistura do digesto tríptico de PDC de levedura revelou alguns sinais não identificados na sequência derivada do gene PDC 1, sugerindo uma modificação pós-tradução e/ou uma diferença entre a sequência protéica real e a deduzida. Dois desses sinais de  $m/z$  789 e 1016, que se apresentaram com forte intensidade, foram selecionados para análise. Uma rápida confirmação da sequência de componentes identificados do digesto cujas massas mapeiam na sequência prevista foi também demonstrada pela análise do componente de  $m/z$  1778.

Todos os espectros de análise de mistura foram gerados a

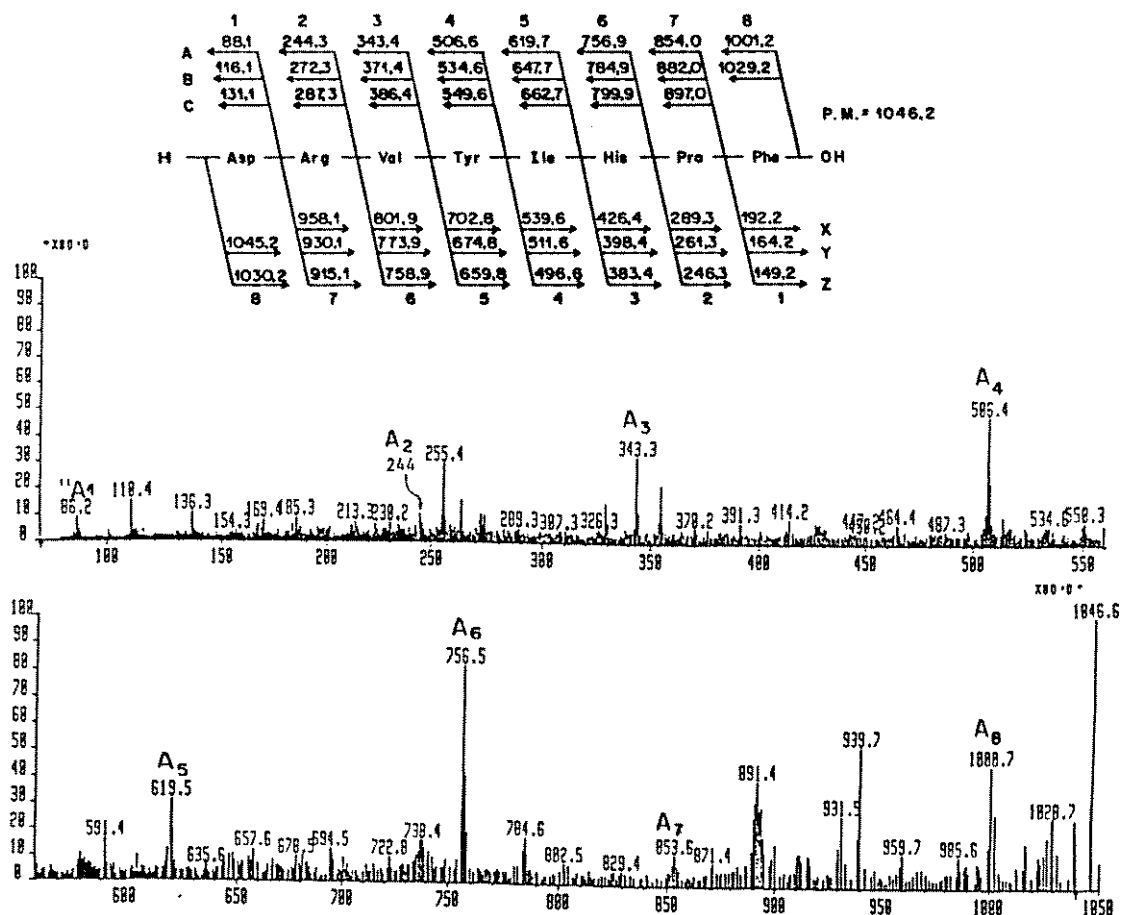


FIG. 47. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD (He) da angiotensina II numa mistura do digesto tríptico de PDC obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E).



partir de uma única aplicação de 1-2 nanomols das misturas dos digestos trípticos não fracionados.

### 2.2.2. Análise do componente de um digesto tríptico de PDC de m/z 789

O espectro de varredura ligada B/E-CAD do componente de m/z 789 (Figura 48) foi gerado a partir de uma única aplicação da mistura do digesto tríptico de PDC não fracionado.

A interpretação do espectro permitiu, inicialmente, a definição da relação entre os sinais de m/z 204, 259, 317, 372, 418, 473 e 531, os quais correspondem a uma mistura de íons de fragmentos do N- e do C-terminais.

Para definir que íons derivavam do N-terminal e quais pertenciam ao C-terminal, utilizou-se o conhecimento de que, tendo o peptídio sido gerado a partir de um digesto tríptico, o resíduo de aminoácido do C-terminal teria que ser uma lisina ou uma arginina. Os sinais terminais de m/z 204 e 259 foram testados e apenas o de m/z 204 se adequou ao caso, correspondendo aos resíduos Gly-Lys ( $\text{Gly} + \text{Lys} + \text{OH} + 2\text{H} = 57 + 128 + 17 + 2 = 204$ ), definindo, assim, o carboxi-terminal e levando à sequência Leu-Thr-Leu-Gly-Lys. Portanto, os sinais de m/z 259, 372 e 473 foram estabelecidos como íons de fragmentos do N-terminal e os de m/z 204, 317, 418 e 531, do C-terminal. Nessa sequência, Leu e Ile são indistinguíveis. Poder-se-ia cogitar que o sinal de m/z 317 corresponde ao íon  $d_3$ , uma vez que  $(A_3+1)-28 = 317$ , o que definiria a isoleucina

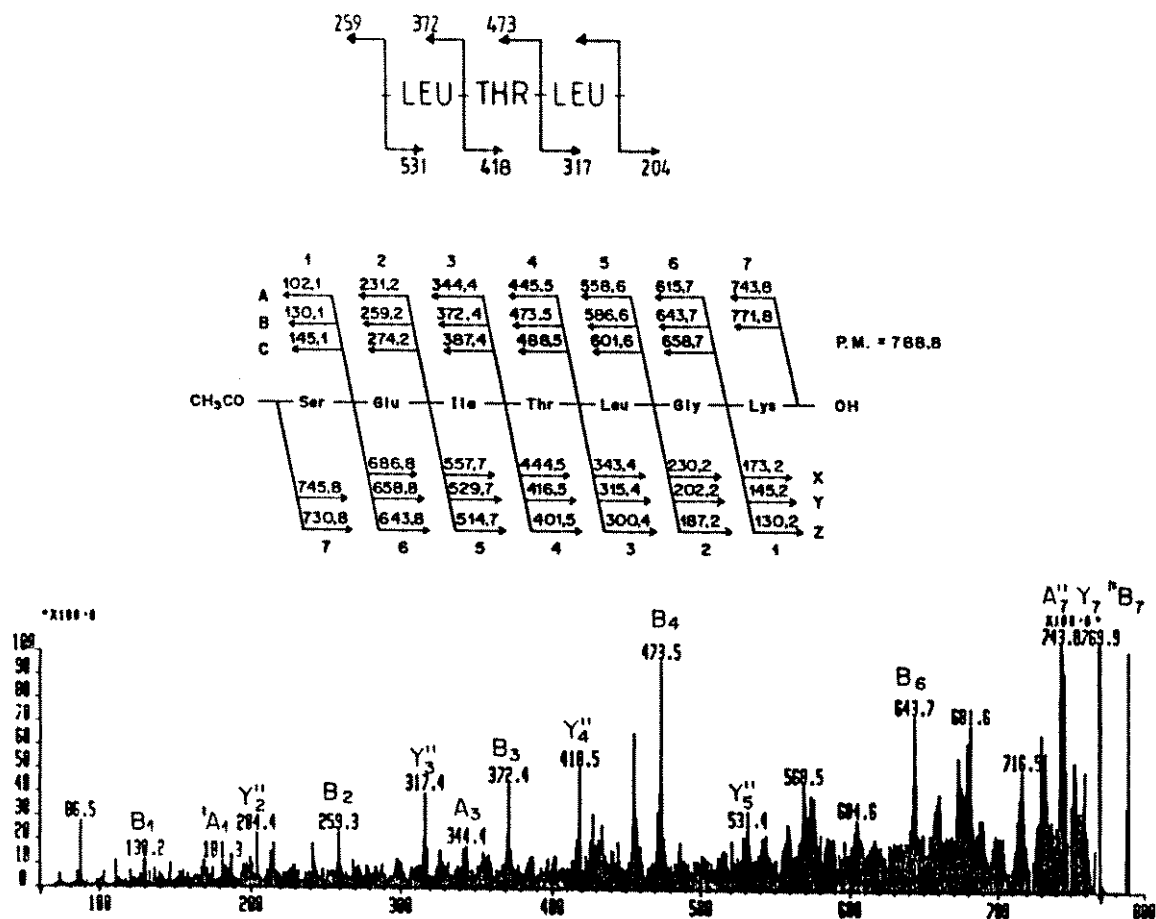


FIG. 48. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD do componente desconhecido de  $m/z$  789 da mistura do digesto tríptico de PDC detectado no mapa-FAB obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E). A sequência derivada do espectro, apresentada no alto, revela um mecanismo de processamento e modificação pós-tradução do N-terminal que inclui remoção do resíduo de Met<sub>1</sub> e acetilação da Ser<sub>2</sub>. O componente corresponde aos resíduos de 2 a 8 nas sequências derivadas dos genes PDC 1, PDC 5 e PDC 6, figuras 35 e 36, com um grupo acetil bloqueando o N-terminal. O mesmo espectro foi obtido para as três formas de PDC.

no resíduo 3. No entanto, o peptídeo em questão não preenche uma das condições requeridas para a definição de íons da série  $d_n$ , a qual estabelece que deve haver um aminoácido básico no N-terminal ou, pelo menos, N-terminal em relação aos aminoácidos que os originam (Johnston et al., 1988). Assim, a interpretação desse sinal como correspondendo ao íon do C-terminal  $Y_3''$  deve, de fato, ser a correta. A partir daí, os sinais restantes do espectro foram interpretados e a seqüência geral submetida a uma nova triagem à procura de um ajuste para o pentapeptídeo. A busca encontrou a seqüência Met-Ser-Glu-Ile-Thr-Leu-Gly-Lys, que corresponde ao N-terminal da proteína prevista. Entretanto, a massa calculada do íon  $[M + H]^+$  desse peptídeo é de 878, o que, claramente, não se ajusta à massa observada no sinal de  $m/z$  789. A diferença de 89 D entre os peptídios sugere que não se trata meramente de uma simples truncagem do N-terminal da proteína expressa, pois essa diferença não corresponde a nenhum valor de massa de um resíduo de aminoácido. Uma diferença na seqüência que precede o pentapeptídeo e/ou uma modificação pós-tradução são possíveis explicações. A presença do sinal de  $m/z$  130 no espectro identifica que o resíduo que precede a isoleucina é o ácido glutâmico. A massa do resíduo de serina que precede o ácido glutâmico, no entanto, é de 87 D e, assim, restam 43 D. Um teste para possíveis grupos bloqueadores forneceu a resposta, sugerindo um resíduo de serina bloqueado por acetilação. Um único passo de degradação de Edman na mistura do digesto intacto seguido de mapeamento-

FAB mostrou, subseqüentemente, que o sinal de  $m/z$  789 não se moveu, confirmando, assim, um N-terminal bloqueado. A seqüência correta do N-terminal de PDC é, portanto, **Acetil-Ser-Glu-Ile-Thr-Leu-Gly-Lys** (Acetil-SEITLGK).

Esse resultado foi observado nas três formas de PDC analisadas e a seqüência, além de corresponder à derivada do gene PDC 1, é também idêntica às deduzidas a partir dos dois outros genes estruturais descritos, PDC 5 e PDC 6 (Figura 36).

Assim, um evento de processamento e modificação pós-tradução foi identificado pela análise por varredura ligada B/E-CAD de um componente não separado de uma mistura complexa de digesto proteolítico.

### 2.2.3. Análise do componente de um digesto tríptico de PDC de $m/z$ 1016

O sinal de  $m/z$  1016 foi analisado por varredura ligada sem o uso de gás de colisão. O espectro obtido (Figura 49) ilustra o fato de que dados interpretáveis podem ser produzidos mesmo em tais condições, isto é, analisando-se o espectro-filho não ativado. Embora a qualidade não tenha sido muito boa, devido à falta de colisão de alta energia que aumente a fragmentação, produzindo um espectro de massa mais baixa, de intensidade adequada, os dados possibilitaram a pronta determinação da seqüência do peptídio. Aplicando a mesma lógica interpolativa descrita para o sinal de  $m/z$  789, deduziu-se a seqüência Leu/Ile-Thr-Thr-Leu/Ile-Ala-Asp-Ala

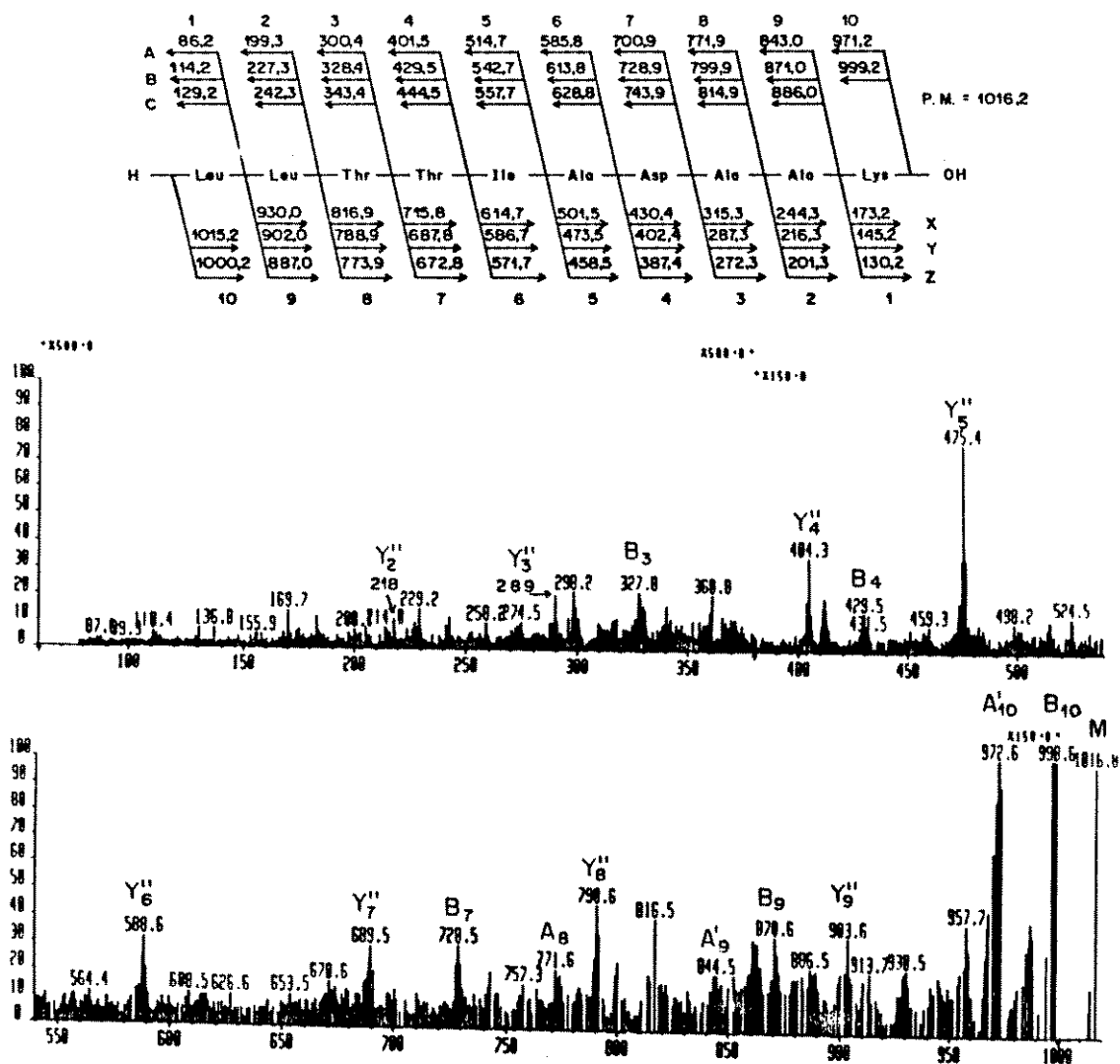


FIG. 49. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD do componente desconhecido de  $m/z$  1016 da mistura do digesto triptico de PDC detectado nos mapas-FAB das figuras 32, 33 e 34, obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E). A seqüência derivada do espectro, apresentada no alto, corresponde aos resíduos de 332 a 341 na seqüência de Kellermann et al. (1986), figura 35, e revela um erro de seqüenciamento: a  $Asn_{335}$  é, na realidade, Thr. O mesmo espectro foi obtido para as três formas de PDC.

via sinais de  $m/z$  218, 289, 404, 475, 588, 689, 790 e 903. Sabendo-se que o peptídeo derivou de uma digestão tríptica, um teste para os sinais de  $m/z$  218 e 903 para ajuste a um resíduo de lisina ou de arginina mostrou que o primeiro se ajusta à sequência Ala-Lys, determinando, assim, que os sinais correspondem a uma série do C-terminal. A diferença entre a massa do íon  $[M + H]^+$  1016 e a do íon de  $m/z$  903 identificou um resíduo de Leu/Ile no N-terminal do peptídeo, completando, assim, a sequência Leu/Ile-Leu/Ile-Thr-Thr-Leu/Ile-Ala-Asp-Ala-Ala-Lys. A mesma apresenta uma estreita relação com a compreendida entre os resíduos 332 a 341 previstos a partir do gene PDC 1, qual seja, Leu-Leu-Thr-Asn-Ile-Ala-Asp-Ala-Ala-Lys (LLTNIADAAK). Claramente, no entanto, a derivada do espectro de varredura ligada demonstra que o resíduo de aminoácido da posição 335 da prevista é uma treonina e não uma asparagina, o que foi confirmado por quatro passos de degradação subtrativa de Edman. Esse resultado substantia um crescente volume de literatura que enfatiza a necessidade da análise de sequências independente, por métodos protéicos, quando as mesmas são deduzidas unicamente a partir da análise dos nucleotídeos. Com relação às sequências derivadas dos genes PDC 5 e PDC 6, três dos dez resíduos de aminoácidos apresentaram diferenças.

#### 2.2.4. Análise do componente de um digesto tríptico de PDC de $m/z$ 1778

Tendo o peptídeo de  $m/z$  1778 mapeado na sequência prevista

a partir do gene PDC 1 entre os resíduos 233 a 248 (Leu-Ile-Asp-Leu-Thr-Gln-Phe-Pro-Ala-Phe-Val-Thr-Pro-Met-Gly-Lys; LIDL TQFP AFVTPMGK), não seria necessário analisar os dados de fragmentação exaustivamente, mas apenas confirmar a ocorrência de alguns fragmentos antecipados. O espectro de varredura ligada, usando ar como gás de colisão, apresentado na Figura 50, no entanto, permitiu facilmente a confirmação da sequência completa através dos íons do N-terminal da série B,  $m/z$  229, 342, 831, 1246 e 1346, e do C-terminal da série Y,  $m/z$  432, 533, 947, 1094, 1438 e 1553. Novamente foram encontradas diferenças entre essa sequência e as deduzidas a partir dos genes PDC 5(3) e PDC 6(1). Esses resultados, juntamente com os do peptídeo de  $m/z$  1016, reforçam os obtidos pelo mapeamento-FAB, no sentido de que as formas de PDC analisadas não são produtos dos genes PDC 5 e PDC 6 e sim do gene PDC 1.

Embora demonstrado neste trabalho que dados de sequência perfeitamente interpretáveis são obtidos por varredura ligada B/E sem gás de colisão (análise do peptídeo de  $m/z$  1016) ou com ar (análise do peptídeo de  $m/z$  1778), o uso de um gás de colisão, como o hélio, produz espectros mais "limpos"; Isto é, espectros com uma relação sinal/ruído mais alta, pelo aumento significativo de íons de fragmentos na região de baixa massa, sendo, portanto, preferível.

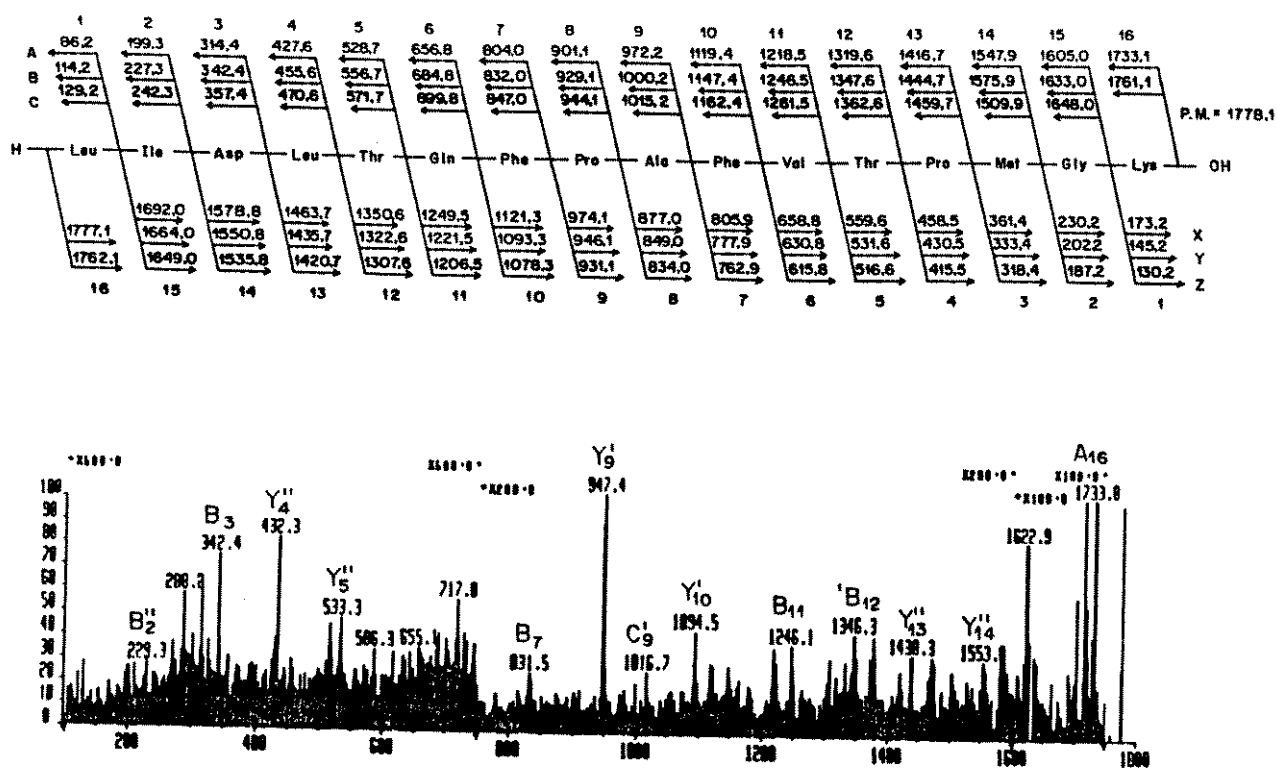


FIG. 50. Espectro de massa de varredura ligada B/E-CAD (ar) do componente conhecido de  $m/z$  1778 da mistura do digesto trípico de PDC detectado nos mapas-FAB das figuras 32, 33 e 34, obtido em espectrômetro de setor duplo (VG Analytical ZAB 2E). O espectro confirma a seqüência dos resíduos de 233 a 248 prevista por Kellermann et al. (1986), figura 35. O mesmo espectro foi obtido para as três formas de PDC.



### 3. Ionização por Eletrospray (ESI-MS)

A espectrometria de massa por ionização eletrospray, ESI-MS, se constitui num método altamente preciso de determinação da massa molecular, tendo sido utilizado para detectar possíveis diferenças nas seqüências das formas isoladas de PDC.

Um espectro ESI-MS é caracterizado por uma distribuição em forma de sino de íons moleculares de cargas múltiplas. O fenômeno de carregamento múltiplo reduz a faixa de massa molecular efetiva por um fator igual ao número de cargas e, assim, um quadrupolo pode ser empregado em vez de um espectrômetro de massa de setor duplo convencional. A resolução de um quadrupolo é baixa, não permitindo a distinção de cada uma das contribuições isotópicas do íon molecular para substâncias de alta massa molecular. Portanto, métodos de determinação da massa molecular a partir do íon mais abundante ou da média das massas se baseiam no centróide do envelope do íon molecular. Picos adjacentes diferem por apenas uma carga. A Figura 51 ilustra a distribuição em forma de sino característica para um espectro ESI-MS. A expansão da distribuição para PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B é mostrada nas Figuras 52, 53 e 54, respectivamente, cujos picos representam a contribuição isotópica não resolvida de cada espécie carregada. Os centróides desses picos são mostrados nas Figuras 55, 56 e 57, respectivamente. Os cálculos para a determinação do massa molecular se baseiam na identificação

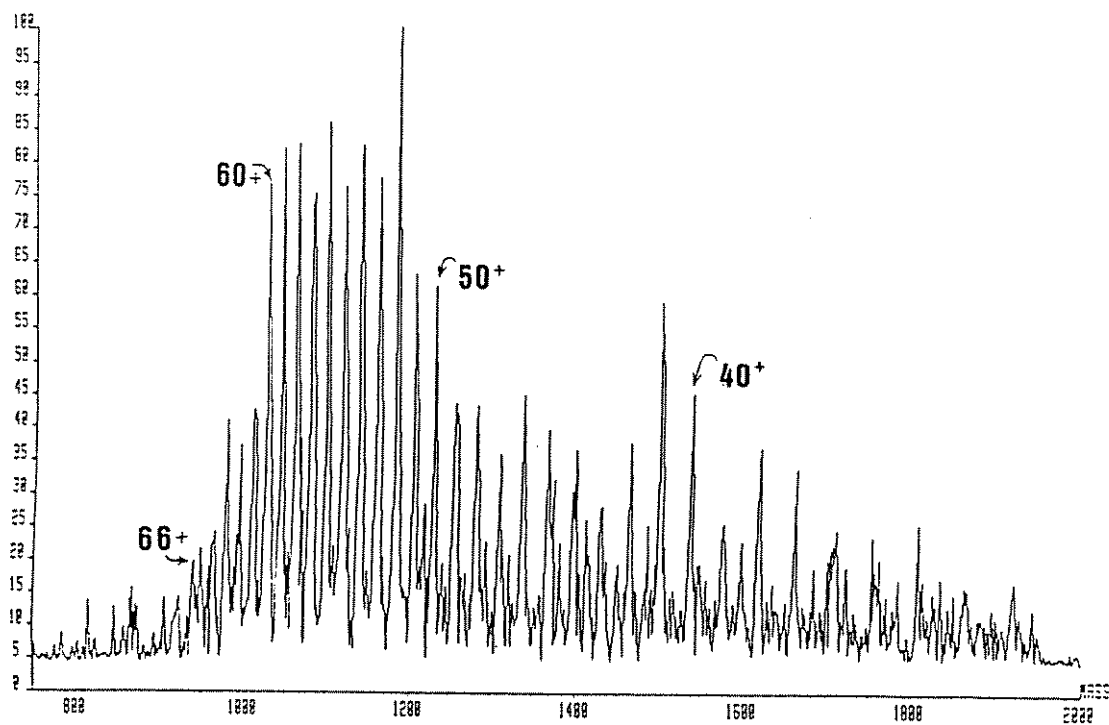


FIG. 51. Espectro ESI-MS carregando múltiplas cargas positivas. PDC A<sub>2</sub>

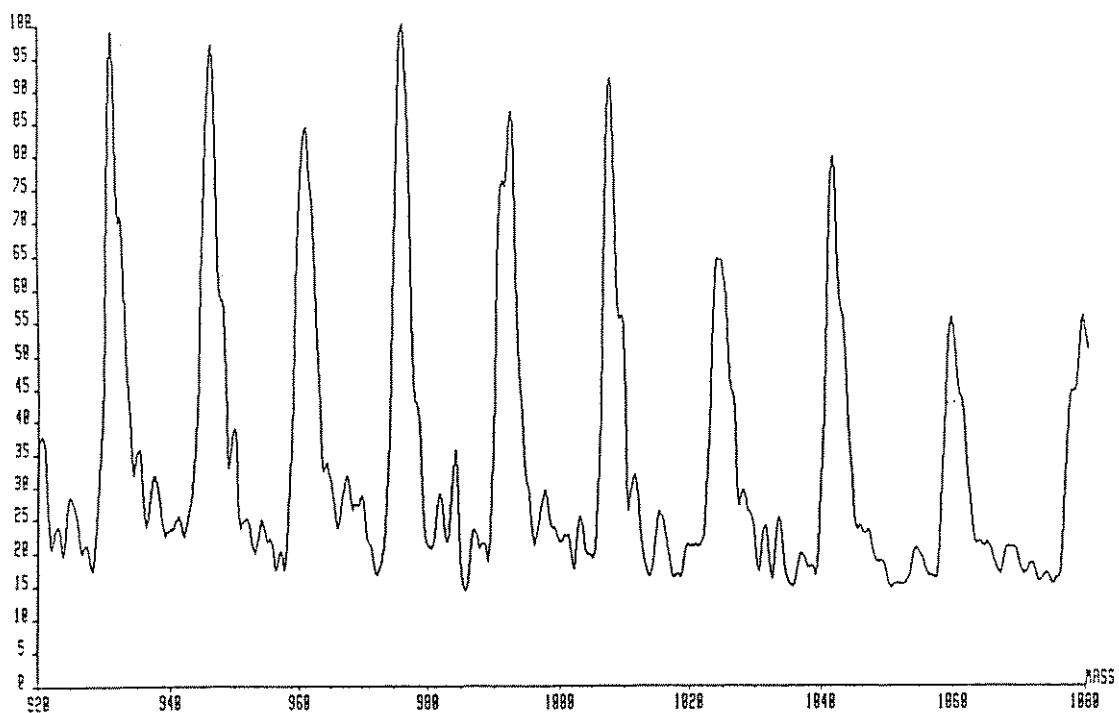


FIG. 52. Espectro ESI-MS ilustrando uma região expandida de sua distribuição em forma de sino. PDC A<sub>1</sub>

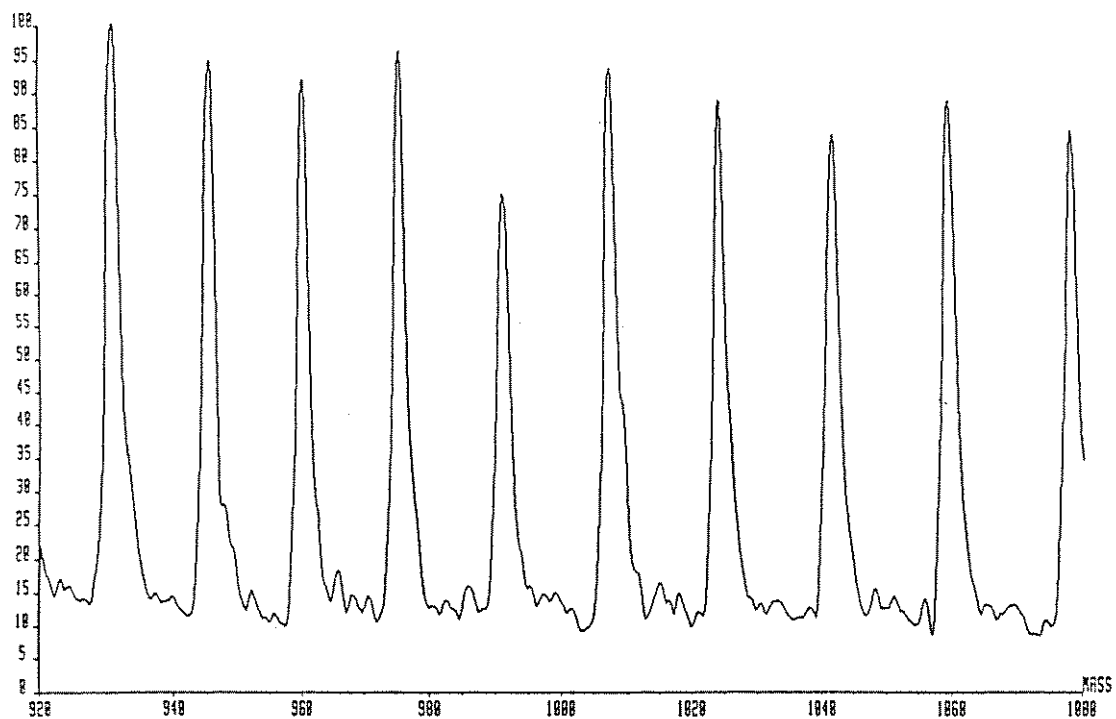


FIG. 53. Espectro ESI-MS ilustrando uma região expandida de sua distribuição em forma de sino. PDC A<sub>2</sub>

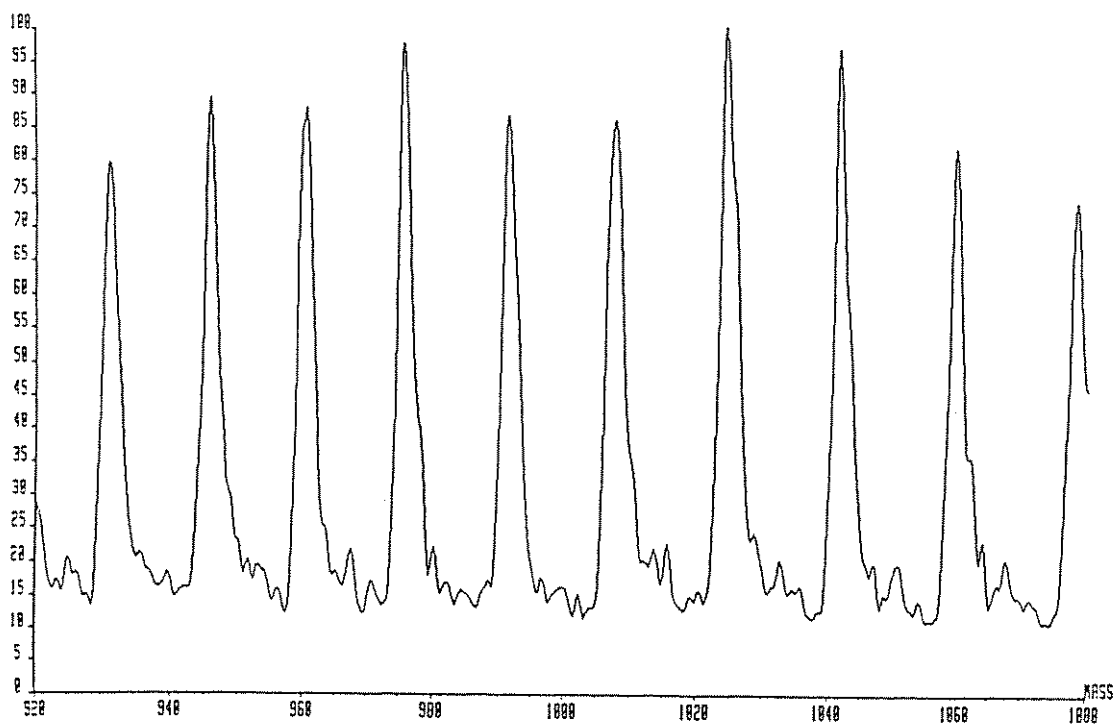


FIG. 54. Espectro ESI-MS ilustrando uma região expandida de sua distribuição em forma de sino. PDC B

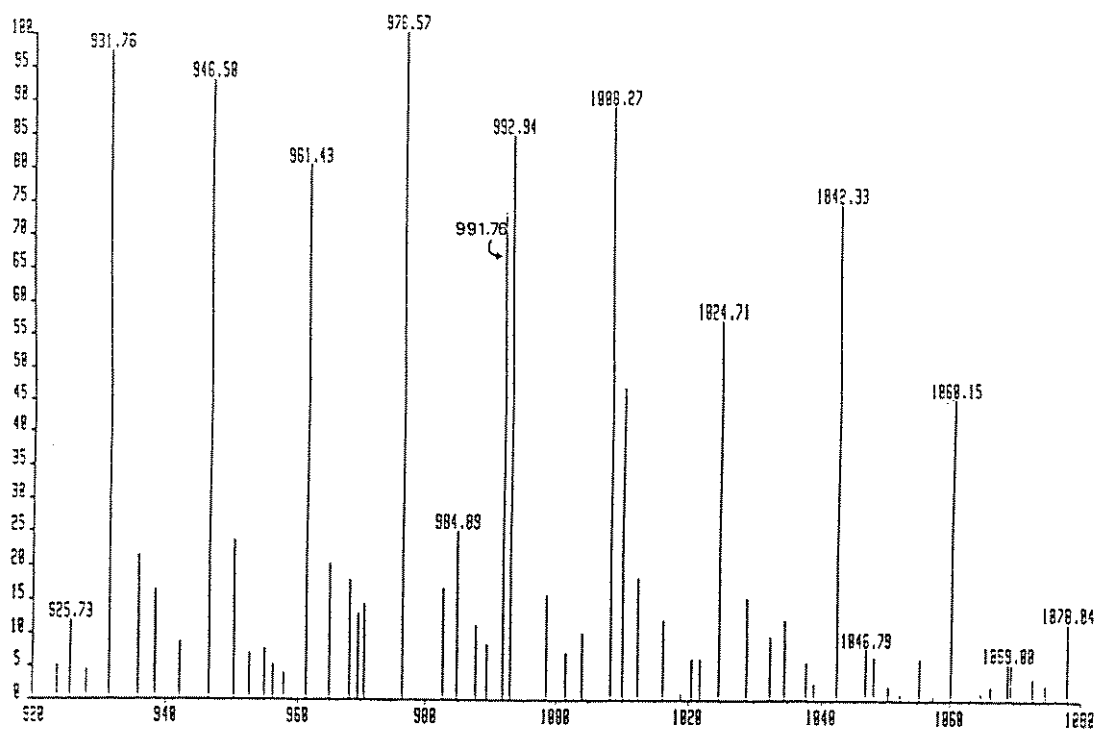


FIG. 55. Espectro ESI-MS contendo os centróides de cada envelope de íon molecular. PDC A<sub>1</sub>.

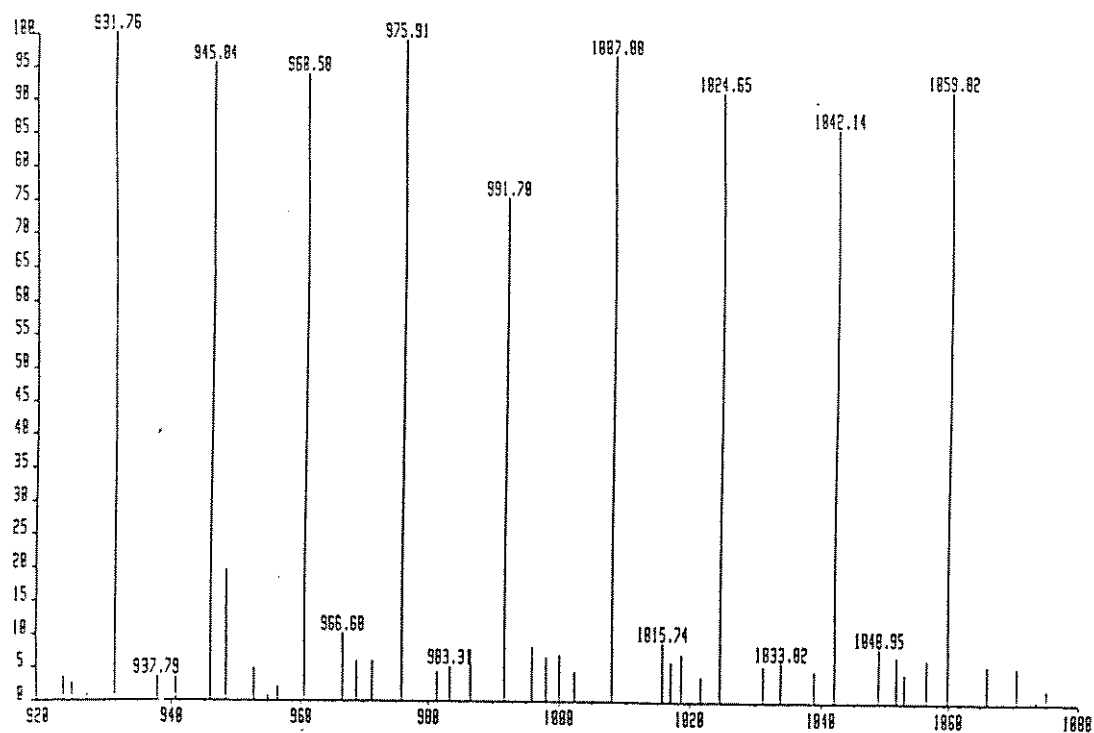


FIG. 56. Espectro ESI-MS contendo os centróides de cada envelope de íon molecular. PDC A<sub>2</sub>.

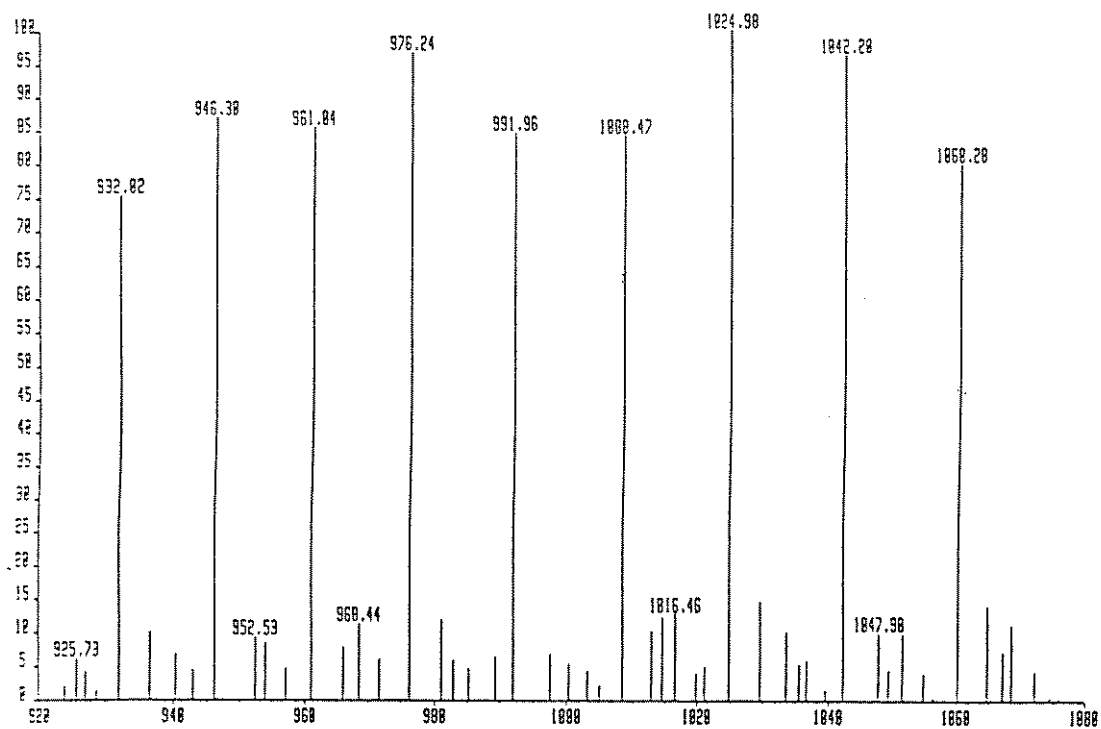


FIG. 57. Espectro ESI-MS contendo os centróides de cada envelope de íon molecular. PDC B.



das massas para cada centróide. Para a interpretação dos espectros contendo os centróides, considera-se a relação entre um íon de múltipla carga  $m_1$  e a massa molecular, isto é,

$m_1 n = \text{massa molecular} + Hn$ , onde  $n = \text{nº de cargas}$ .

A relação da massa molecular entre dois íons de cargas múltiplas  $m_1$  e  $m_2$ , onde  $m_2 > m_1$ , é, portanto:

$$m_2(n-1) = \text{massa molecular} + H(n-1)$$

Essas duas equações podem ser resolvidas para  $n$ , de modo que:

$$n = (m_2 - H) / (m_2 - m_1)$$

A Tabela VIII apresenta dados para nove determinações de massas moleculares das três formas de PDC, a partir dos respectivos espectros ESI-MS contendo os centróides dos envelopes dos íons moleculares, os quais permitem definir as seguintes massas moleculares:

$$\text{PDC } A_1 \rightarrow 61\,441,56 \pm 16,3 \text{ D}$$

$$\text{PDC } A_2 \rightarrow 61\,419,30 \pm 6,3 \text{ D}$$

$$\text{PDC } B \rightarrow 61\,441,46 \pm 6,9 \text{ D}$$

Esses dados indicam que PDC  $A_1$  e PDC B apresentam seqüências idênticas e que PDC  $A_2$ , com uma diferença de massa de apenas 22 D, não é formada por proteólise limitada daquelas formas, uma vez que essa diferença não corresponde sequer à massa de um único resíduo de aminoácido. Os mesmos dados também substanciam as evidências, derivadas dos experimentos de mapeamento-FAB, de que há regiões na seqüência de aminoácidos não codificadas pela seqüência do gene PDC 1. A massa média calculada a partir da seqüência do

gene publicada (Kellermann et al., 1986), após correção do N-terminal para acetil-serina e do resíduo 335 para treonina no lugar de asparagina — baseada nos resultados dos experimentos de varredura ligada desta tese —, é de 59971,64 D. Esse valor é aproximadamente 1470 D inferior aos observados para PDC A<sub>1</sub> e PDC B, e 1448 D inferior ao determinado para PDC A<sub>2</sub>. Incluindo a histidina extra na posição 115, conforme seqüência apresentada por Hohmann (1991) e resultados do mapeamento-FAB desta tese, a massa molecular se eleva para 60108,78 D. Considerando o C-terminal da referida seqüência, chega-se ao valor de 61496,37 D, que está bem próximo dos observados; porém, nenhum dado foi obtido, neste trabalho, para essa região da proteína.

TABELA VIII. Determinação da massa molecular de PDC A<sub>1</sub>, PDC A<sub>2</sub> e PDC B por espectrometria de massa por ionização eletrospray.

| Nº de cargas  | PDC A <sub>1</sub> |                        | PDC A <sub>2</sub> |                        | PDC B   |                        |
|---------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|---------|------------------------|
|               | Massa              | Massa molecular<br>(D) | Massa              | Massa molecular<br>(D) | Massa   | Massa molecular<br>(D) |
| 66            | 931,76             | 61429,64               | 931,76             | 61429,64               | 932,02  | 61446,80               |
| 65            | 945,50             | 61456,99               | 945,84             | 61414,09               | 946,30  | 61443,99               |
| 64            | 961,43             | 61467,01               | 960,58             | 61412,61               | 961,04  | 61442,05               |
| 63            | 976,57             | 61460,41               | 975,91             | 61418,83               | 976,24  | 61439,62               |
| 62            | 991,76             | 61426,63               | 991,70             | 61422,91               | 991,96  | 61439,03               |
| 61            | 1008,27            | 61442,99               | 1007,88            | 61419,20               | 1008,47 | 61455,19               |
| 60            | 1024,71            | 61422,13               | 1024,65            | 61418,53               | 1024,98 | 61438,33               |
| 59            | 1042,33            | 61438,00               | 1042,14            | 61426,79               | 1042,20 | 61430,33               |
| 58            | 1060,15            | 61430,24               | 1059,82            | 61411,10               | 1060,28 | 61437,78               |
| Média         |                    | 61441,56               |                    | 61419,30               |         | 61441,46               |
| Desvio padrão |                    | ±16,3                  |                    | ±6,3                   |         | 6,9                    |

Para demonstrar a precisão da técnica, o espectrômetro de massa foi inicialmente calibrado com mioglobina, cuja massa molecular média é de 16950,7 D. A massa molecular determinada a partir do espectro ESI foi de  $16950,58 \pm 3,3$  D. A análise de uma proteína de massa molecular similar à de PDC apresentou um desvio padrão de  $\pm 20$  D (Loo et al., 1989).

## C O N C L U S Ã O

Com base neste trabalho, as seguintes respostas às questões relativas à origem das três formas de PDC isoladas podem ser formuladas:

### 1) Dissociação tetramero-dímero/holoenzima-apoenzima

Esta hipótese foi descartada, a priori, devido às condições utilizadas durante o processo de purificação e estocagem da enzima, quais sejam, pH 6,3 e excesso dos cofatores, TPP e  $Mg^{2+}$ .

### 2) Fosforilação reversível

A determinação precisa da massa molecular por ESI-MS ( $\pm 6-16$  D ou  $\pm 0,01-0,03\%$ , como demonstrado) afastou definitivamente a hipótese de uma fosforilação reversível pois a diferença de massa de 22 D observada entre PDC A<sub>2</sub> e PDC A<sub>1</sub>/PDC B é inferior à massa de um grupo fosfato (97 D).

### 3) Proteólise

Os espectros do mapeamento-FAB sugeriram que as diferenças entre as três formas são relativamente pequenas e que proteólise limitada de uma cadeia para originar outra é improvável. A análise detalhada do componente do digesto tríptico de m/z 789 por varredura ligada revelou um processamento proteolítico acompanhado de um mecanismo de

modificação pós-tradução (acetilação) do N-terminal comum as três formas de PDC. Os espectros ESI-MS eliminaram definitivamente a hipótese de uma proteólise como causa da origem das três proteínas isoladas, uma vez que a diferença de massa observada não corresponde sequer a um único aminoácido.

#### 4) Diferentes subunidades/isoenzimas

Os resultados gerados pelo mapeamento-FAB mostraram que as três formas de PDC isoladas são codificadas pelo gene PDC 1 provando que PDC 1 é, de fato, um gene estrutural para piruvato descarboxilase de levedura. Esses resultados provaram também que nenhuma das três formas é produto dos genes PDC 5 e PDC 6. Em adição, revelaram uma série de sinais comuns as três formas para os quais nenhuma correlação com a sequência derivada do gene pôde ser estabelecida, o que deixa em aberto a questão de uma segunda cadeia polipeptídica para a enzima; esse fato, porém, pode estar relacionado com erros na sequência, a exemplo do detectado nesta tese pela análise do componente de  $m/z$  1016 do digesto trípico por varredura ligada.

Mais uma vez, os espectros ESI-MS parecem definir a questão com relação às formas de PDC analisadas. Embora a possibilidade de uma mutação pontual com troca de um único aminoácido (por exemplo, Trp no lugar de Tyr ou His no lugar de Asn) não possa ser descartada, mais provavelmente as três cadeias polipeptídicas são idênticas e a diferença de 22 D se

deve à presença de um cofator,  $Mg^{2+}$  (PM = 24) ou de um aducto de sódio (PM = 23) extra nas formas de PDC A<sub>1</sub>, e PDC B. Os resultados dos espectros ESI-MS mostraram ainda — após correção para o N-terminal Ac-Ser e para a Thr<sub>335</sub> no lugar da Asn<sub>335</sub>, conforme resultados dos experimentos de varredura ligada — uma diferença de 1470 e 1447 D para PDC A<sub>1</sub>/PDC B e PDC A<sub>2</sub>, respectivamente, em relação à massa molecular da sequência derivada do gene PDC 1. É possível que o C-terminal da proteína seja mais extenso ou que haja uma sequência de inserção. Isso se correlaciona com o mapeamento-FAB, onde vários dos sinais de massa observados não encontraram correspondência na sequência derivada do gene, e racionaliza a incapacidade de mapear o C-terminal das três formas da proteína, apesar dos métodos de extensiva análise de sequência empregados. Por fim, é importante salientar que as condições utilizadas neste trabalho não necessariamente levaram ao isolamento de todas as possíveis formas de PDC. Novas estratégias — considerando o microrganismo utilizado (diferentes mutantes), condições de cultivo e processo de purificação — se fazem necessárias para a análise dos produtos dos genes PDC 5, PDC 6 e outros que venham a ser identificados para que se possa definitivamente solucionar a questão de distintas cadeias polipeptídicas para a enzima piruvato descarboxilase de levedura. A abordagem de espectrometria de massa desenvolvida e descrita nesta tese se apresenta como uma alternativa metodológica ideal para tal tipo de investigação.

## L I T E R A T U R A C I T A D A

- AMICON CORPORATION SCIENTIFIC SYSTEMS DIVISION. Stirred ultrafiltratron cells; operating instructions. Massachusetts, 1984. 11p. (Publication No 1-228).
- ANDREASEN, A.A.; STIER, T.J.B. Anaerobic nutrition of Saccharomyces cerevisiae. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. Journal of Cellular and Comparative Physiology, v. 41, p. 23-36, 1953.
- AUBAGNAC, J.L.; SALESSE, A.; JAUREGUI-ADELL, J. Fast atom bombardment mass spectra of various peptides from sarcoplasmic calcium-binding protein. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, v. 16, p. 469-472, 1988.
- BARBER, M.; BORDOLI, R.S.; ELLIOTT, G.F. et al. Fast atom bombardment mass spectrometry of bovine insulin and other large peptides. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, p. 936-938, 1982.
- . Fast atom bombardment mass spectrometry of human proinsulin. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 110, n. 3, p. 753-757, 1983.
- BARBER, M.; BORDOLI, R.S.; SEDGWICK, R.D. et al. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, v. 1, p. 325-327, 1981.
- BATEMAN, A.; DELL, A.; MORRIS, H.R. Fast atom bombardment mass spectrometry of large peptides: a rapid method for

- molecular weight analysis. Journal of Applied Biochemistry, v. 7, p. 126-132, 1985.
- BAUCHOP, T.; ELSDEN, S.R. The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. Journal of General Microbiology, v. 23, p. 457-469, 1960.
- BEGGS, J.D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. Nature, v. 275, p. 104-109, 1978.
- BERKSON, J.; MAGATH, T.B.; HURN, M. The error of estimate of the blood cell count as made with the hemocytometer. American Journal Physiology, v. 128, p. 309-323, 1940.
- BIEMANN, K. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, v. 16, p. 99-111, 1988.
- . Sequencing of proteins. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, v. 45, p. 183-194, 1982.
- BIEMANN, K.; MARTIN, S.A. Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins. Mass Spectrometry Reviews, v. 6, p. 1-76, 1987.
- BIO-RAD. Bio-Rad protein assay instruction manual. München, 1981. 17p.
- BOITEUX, A.; HESS, B. Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. FEBS LETTERS, v. 9, n. 5, p. 293-296, 1970.
- BOND, J.S.; BEYNON, R.J. Proteolysis and physiological regulation. Molecular Aspects of Medicine, v. 9, p. 173-287, 1987.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the



quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUNER, T.; ULLRICH, J. Yeast pyruvate decarboxylase: number and reactivity of mercapto groups. Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fuer Physiologische Chemie, v. 353, p. 825-831, 1972.

BRUNNÉE, C. New instrumentation in mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, v. 45, p. 51-86, 1982.

BUKO, A.M.; PHILLIPS, L.R.; FRASER, B.A. Peptide studies using a fast atom bombardment high field mass spectrometer and data system. 2-Characteristics of positive ionization spectra of peptides, m/z 858 to m/z 5729. Biomedical Mass Spectrometry, v. 10, n. 7, p. 408-419, 1983a.

\_\_\_\_\_. Peptide studies using a fast atom bombardment high field mass spectrometer and data system. 3-Negative ionization: mass calibration, data acquisition and structural characterization. Biomedical Mass Spectrometry, v. 110, n. 6, p. 387-393, 1983b.

BUTLER, G.; McCONNELL, D.J. Identification of an upstream activation site in the pyruvate decarboxylase structural gene (PDC 1) of Saccharomyces cerevisiae. Current Genetics, v. 14, n. 5, p. 405-412, 1988.

CAIRNS, M.T.; ALVAREZ, J.; PANICO, M. et al. Investigation of the structure and function of the human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection. Biochimica

- et Biophysica Acta, v. 905, p. 295-310, 1987.
- CANDI, J.M.; DUGGLEBY, R.G.; MATTICK, J.S. Expression of active yeast pyruvate decarboxylase in Escherichia coli. Journal of General Microbiology, v. 137, p. 2811-2815, 1991.
- CHATTERJEE, A.A.K. Structure elucidation of biopolymers by mass spectrometry. London: Imperial College of Science, Technology and Medicine, 1986. 285p. Tese Doutorado.
- CHEUNG, W.Y. A yeast pyruvate decarboxylase regulatory gene. London: Imperial College of Science and Technology, 1985. p. 221. Tese Doutorado.
- DAHL, J.S.; DAHL, C.E.; BLOCH, K. Effect of cholesterol on macromolecular synthesis and fatty acid uptake by Mycoplasma capricolum. The Journal of Biological Chemistry, v. 256, n. 1, p. 87-91, 1981.
- DAHL, H.-H.M.; HUNT, S.M.; HUTCHISON, W.M. et al. The human pyruvate dehydrogenase complex; isolation of cDNA clones for the E1 $\alpha$  subunit, sequence analysis, and characterization of the mRNA. The Journal of Biological Chemistry, v. 262, n. 15, p. 7398-7403, 1987.
- DE MARCUCCI, O.; LINDSAY, J.G. Component X: an immunologically distinct polypeptide associated with mammalian pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex. European Journal of Biochemistry, v. 149. p. 641-648, 1985.
- DE VRIES, W.; KAPTEIJN, W.M.C.; BEEK, E.G. et al. Molar growth yields and fermentation balances of Bacillus casei L 3 in batch cultures and in continuous cultures. Journal of

- General Microbiology, v. 63, p. 333-345, 1970.
- DELL, A.; MORRIS, H.R. Fast atom bombardment- high field magnet mass spectrometry of 6000 Dalton polypeptides. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 106, n. 4, p. 1456-1462, 1982.
- DEMEL, R.A.; DE KRUYFF, B. The function of sterols in membranes. Biochimica et Biophysica Acta, v. 457, n. 2, p. 109-32, 1976.
- DIFCO LABORATORIES/UK DIVISION. Bacto-yeast extract typical analyses. June 1987 (Comunicação pessoal).
- DOLE, M.; MACK, L.L.; HINES, R.L. et al. Molecular beams of macroions. The Journal of Chemical Physics, v. 49, n. 5, p. 2240-2249, 1968.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ECKART, K. Generation and interpretation of fast atom bombardment mass spectra of modified peptides. In: WITTMANN-LIEBOLD, B.; SALNIKOW, J.; ERDMANN, V.A. Advanced Methods in Protein Microsequence Analysis. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p. 403-414.
- ECKART, K.; SCHWARZ, H.; CHOREV, M. et al. Sequence determination of N-terminal and C-terminal blocked peptides containing N-alkylated amino acids and structure determination of these amino acid constituents by using fast-atom-bombardment/tandem mass spectrometry. European Journal of Biochemistry, v. 157, n. 1, p. 209-216, 1986.

- EDMAN, P. On de mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides. Acta Chemica Scandinavica, v. 10, p. 761-768, 1956.
- ERDJUMENT, H.; LANE, D.A.; IRELAND, H. et al. Formation of a covalent disulfide-linked antithrombin-albumin complex by an antithrombin variant, antithrombin "Northwick park". The Journal of Biological Chemistry, v. 262, n. 28, p. 13381-13384, 1987.
- ERDJUMENT, H.; LANE, D.A.; PANICO, M. et al. Single amino acid substitutions in the reactive site of antithrombin leading to thrombosis; congenital substitution of arginine 393 to cysterne in antithrombin Northwick Park and to histidin in antithrombin Glasgow. The Journal of Biological Chemistry, v. 263, n. 12, p. 5589-5593, 1988.
- FRENCH, E.R.; HEBERT, T.T. Métodos de investigación fitopatológica. San José: Editorial IICA, 1980. cap. 11, p. 168-186.
- FUJISAWA, H.; YAMAUCHI, T.; NAKATA, H. et al. Regulation of tyrosine 3-monooxygenase and tryptophan 5-monooxygenase by phosphorylation - dephosphorylation. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. cap. 9, p. 167-183.
- GOUNARIS, A.D.; TURKENKOPF, I.; BUCKWALD, S. et al. Pyruvate decarboxylase. I. Protein dissociation into subunits under conditions in which thiamine pyrophosphate is released. The Journal of Biological Chemistry, v. 246, n. 5, p. 1302-

1309, 1971.

GOUNARIS, A.D.; TURKENKOPF, I.; CIVERCHIA, L.L. et al.

Pyruvate decarboxylase. III. Specificity restrictions for thiamine pyrophosphate in the protein association step. sub-unit structure. Biochimica et Biophysica Acta, v. 405, p. 492-499, 1975.

GRAY, W.R.; HARTLEY, B.S. A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. Biochemical Journal, v. 89, p. 59P, 1963.

GREEN, J.B.A. Control of pyruvate decarboxylase and phosphoglucose isomerase in yeast. London: Imperial College of Science and Technology, 1987. 193p. Tese Doutorado.

———. Pyruvate decarboxylase is like acetolactate synthase (ILV 2) and not like the pyruvate dehydrogenase E<sub>1</sub> subunit. FEBS Letters, v. 246, n. 1-2, p. 1-5, 1989.

GREER, F.M.; MORRIS, H.R. Fab mapping protein structural determination. Protein Engineering, v. 1., n. 3, p. 243, 1987.

GREER, F.M.; MORRIS, H.R.; FORSTROM, J. et al. Fast atom bombardment mass spectral search for the amino terminus of genetically engineered  $\alpha_1$ -antitrypsin. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, v. 16, p. 191-195, 1988.

GROSS, E.; WITKOP, B. Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. The Journal of Biological Chemistry, v. 237, p. 1856-1860, 1962.

- HAMES, B.D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1981, p.1-91.
- HAUKELI, A.D.; LIE, S. Molar growth yields of yeasts in anaerobic batch cultures. Journal of General Microbiology, v. 69, p. 135-141, 1971.
- HEMMINGS, B.A. The role of protein phosphorylation in the regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase from yeast. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 8, p. 155-165.
- HERNANDEZ, E.; JOHNSON, M.J. Anaerobic growth yields of *Aerobacter cloacae* and *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, v. 94, n. 4, p. 991-995, 1967.
- HOHMANN, S. Characterization of PDC 6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, v. 173, n.24, p. 7963-7969, 1991.
- HOHMANN, S.; CEDERBERG, H. Autoregulation may control the expression of yeast pyruvate decarboxylase structural genes PDC 1 and PDC 5. European Journal of Biochemistry, v. 118, p.615-621, 1990.
- HOLZER, H. Mechanism and function of reversible phosphorylation of fructose 1,6-bisphosphatase in yeast. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible

- phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 7, p. 143-154.
- . Regulation of carbohydrate metabolism by enzyme competition. In: COLD Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 26, p. 277-288, 1961.
- HOLZER, E.; SÖLING, H.D.; GOEDDE, H.W. et al. Thiamine pyrophosphate. In: BERGMEYER, H.V. Methods of Enzymatic Analysis. [S.l.] Verlag Chemie, 1963, p. 602-605.
- HOPMANN, R.F.W. Hydroxyl-ion-induced subunit dissociation of yeast cytoplasmic pyruvate decarboxylase: a circular dichroism study. European Journal of Biochemistry, v. 110, p. 311-318, 1980.
- HÜBNER, G.; KÖNIG, S.; SCHNACKERZ, K.D. Correlation of cofactor binding and the quaternary structure of pyruvate decarboxylase as revealed by  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. FEBS Letters, v. 314, n. 1, p.101-103, 1992.
- HÜBNER, G.; SCHELLENBERGER, A. Pyruvate decarboxylase-potentially inactive in the absence of the substrate. Biochemistry International, v. 13, n. 5, p. 767-772, 1986.
- HÜBNER, G.; SCHELLENBERGER, A.; STELMASHCHUK, V. Yu. et al. Electron microscopic investigation of the subunit structure of yeast pyruvate decarboxylase. Acta Biologica Medica Germanica, v. 34, p. 699-701, 1975.
- HÜBNER, G.; WEIDHASE, R.; SCHELLENBERGER, A. The mechanism of substrate activation of pyruvate decarboxylase: a first approach. European Journal of Biochemistry, v. 92, p. 175-

181, 1978.

HUGHES, J.; SMITH, T.W.; KOSTERLITZ, H.W. et al.

Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature, v. 258, n. 5536, p. 577-579, 1975.

IBF/LKB. Ultrogel AcA and Ultrogel A. Paris: Imp. J. Hiver, [198-] (Product information, 200912 IBF).

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY - IUB. Enzyme nomenclature. London: Academic Press, 1984. 646p.

JOHNSON, R.S.; MARTIN, S.A.; BIEMANN, K. Collision-induced fragmentation of  $(M + H)^+$  ions of peptides, side chain specific sequence ions. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, v. 86, p. 137-154, 1988.

JOHNSON, R.S.; MARTIN, S.A.; BIEMANN, K. et al. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. Analytical Chemistry, v. 59, n. 1, p. 2621-2625, 1987.

JUNI, E.; HEYM, G.A. Properties of yeast pyruvate decarboxylase and their modification by proteolytic enzymes. II. Selective alternation by yeast proteases. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 127, p. 89-100, 1968.

KATSUMATA, M.; INOUE, H.; IZUTANI, M. et al. Isoelectric point of pyruvate decarboxylase from baker's yeast and some properties of pI 5.83 preparation. Vitamins, v. 40, n. 5, p. 345-353, 1969.



- KELLERMANN, E.; HOLLENBERG, C.P. The glucose - and ethanol-dependent regulation of PDC1 from Saccharomyces cerevisiae are controlled by two distinct promoter regions. Current Genetics, v. 14, n. 4, p. 337-344, 1988.
- KELLERMANN, E.; SEEBOTH, P.G.; HOLLENBERG, C.P. Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC 1) from Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Research, v. 14, n. 22, p. 8963-8977, 1986.
- KIRSOP, B.H. Developments in beer fermentation. In: WISEMAN, A. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. West Sussex: Ellis Horwood Limited, 1982. vol. 6, cap. 5, p. 79-131.
- KNOTT, T.J.; RALL Jr., S.C.; INNERARITY, T.L. et al. Human apolipoprotein B: structure of carboxyl-terminal domains, sites of gene expression, and chromosomal localization. Science, v. 230, n. 4721, p. 37-43, 1985.
- KÖNIG, W.A.; AYDIN, M.; SCHULZE, U. et al. Fast atom bombardment for peptide sequencing - a comparison with conventional ionization techniques. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, v. 46, p. 403-406, 1983.
- KÖNIG, S.; SVERGUN, D.; KOCH, M.H.J. et al. Synchrotron radiation solution X-ray scattering study of the pH dependence of the quaternary structure of yeast pyruvate decarboxylase. Biochemistry, v. 31, p. 8726-8731. 1992.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. The yeasts: a taxonomic study. 3ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. p. 100-

101.

KRESZE, G.-B.; RONFT, H. Bovine kidney pyruvate dehydrogenase complex; limited proteolysis and molecular structure of the lipoate acetyltransferase component. European Journal Biochemistry, v. 112, p. 589-599, 1980.

\_\_\_\_\_. Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. 1. Purification and some kinetic and regulatory properties. European Journal of Biochemistry, v. 119, p. 573-579, 1981a.

\_\_\_\_\_. Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. 2. Molecular structure, dissociation, and implications for the origin of mitochondria. European Journal of Biochemistry, v. 119, p. 581-587, 1981b.

KUEHN, G.D. Regulation of ornithine decarboxylase by reversible phosphorylation: an example of an end-product mediated protein kinase reaction. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 10, p. 185-207.

KUO, D.J.; DIKDAN, G.; JORDAN, F. Resolution of brewers' yeast pyruvate decarboxylase into two isozymes. The Journal of Biological Chemistry, v. 261, n. 7, p. 3316-3319, 1986.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, n. 227, p. 680-685, 1970.

- LANCASHIRE, W.E.; PAYTON, M.A.; WEBBER, M.J. et al. Petite-negative mutants of Saccharomyces cerevisiae. Molecular and General Genetics, v. 181, n. 3, p. 409-410, 1981.
- LINN, S.; LEHMAN, I.R. An endonuclease from Neurospora crassa specific for polynucleotides lacking an ordered structure. The Journal of Biological Chemistry, v. 240, n. 3, p. 1287-1293, 1965.
- LOO, J.A.; UDSETH, H.R.; SMITH, R.D. Peptide and protein analysis by electrospray ionization-mass spectrometry and capillary electrophoresis-mass spectrometry. Analytical Biochemistry, v. 179, p. 404-412, 1989.
- LUDEWIG, R.; SCHELLENBERGER, A. A new procedure to prepare highly purified and crystallized yeast pyruvate decarboxylase. FEBS Letters, v. 45, n. 1, p. 340-343, 1974.
- MAGNI, G.; NATALINI, P.; SANTARELLI, I. et al. Bakers' yeast protease A purification and enzymatic and molecular properties. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 213, n. 2, p. 426-433, 1982.
- MAITRA, P.K., LOBO, Z. A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. The Journal of Biological Chemistry, v. 246, n. 2, p. 475-488, 1971.
- MORRIS, H.R. Biomolecular mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics, v. 45, p. 331-343, 1982b.
- MORRIS, H.R. Biomolecular structure determination by mass spectrometry. Nature, v. 286, p. 447-452, 1980.

- MORRIS, H.R.; CHATTERJEE, A.; PANICO, M. et al. Linked-scans of peptides and protein digests: amino acid sequence determination of components of complex mixtures. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v. 3, n. 4, p. 110-116, 1989.
- MORRIS, H.R.; DELL, A.; ETIENNE, A.T. et al. New methods for the characterization of biopolymers. Pure & Applied Chemistry, v. 54, n. 2, p. 267-279, 1982a.
- MORRIS, H.R.; PANICO, M.; BARBER, M. et al. Fast atom bombardment: a new mass spectrometric method for peptide sequence analysis. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 101, n. 2, p. 623-631, 1981.
- MORRIS, H.R.; PANICO, M.; ETIENNE, T. et al. Isolation and characterization of human calcitonin gene-related peptide. Nature, v. 308, n. 5961, p. 746-748, 1984.
- MORRIS, H.R.; PANICO, M.; TAYLOR, G.W. FAB-mapping of recombinant-DNA protein products. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 117, n. 1, p. 299-305, 1983.
- MORRIS, H.R.; PUCCI, P. A new method for rapid assingment of S-S bridges in proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 126, n. 3, p. 1122-1128, 1985.
- MUECKLER, M.; CARUSO, C.; BALDWIN, S.A. et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. Science, v. 229, n. 4717, p. 941-945, 1985.
- NAIK, S.; OATES, J.E.; DELL, A. et al. A novel mass spectrometric procedure for the rapid determination of the

- types of carbohydrate chains present in glycoproteins: application to  $\alpha$ -galactosidase I from Vicia faba seeds. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 132, n. 1, p. 1-7, 1985.
- NEALE, A.D.; SCOPES, R.K., WETTENHALL, R.E.H., et al. Pyruvate decarboxylase of Zymomonas mobilis: isolation, properties, and genetic expression in Escherichia coli. Journal of Bacteriology, v. 169, n. 3, p. 1024-1028, 1987.
- NES, W.R.; SEKULA, B.C.; NES, W.D. et al. The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. The Journal of Biological Chemistry, v. 253, n. 17, p. 6218-25, 1978.
- NIMMO, H.G. The control of bacterial isocitrate dehydrogenase by phosphorylation. IN: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 6, p. 123-141.
- ORLOWSKI, J.; BARFORD, J. The effect of inoculum preparation on the fully aerated growth of Saccharomyces cerevisiae with a glucose substrate. Journal of General Applied Microbiology, v. 33, n. 2, p. 113-121, 1987.
- PARKS, L.W. Metabolism of sterols in yeast. CRC Critical Reviews in Microbiology, v. 6, n. 4, p. 301-341, 1978.
- PAYNE, W.J. Energy yields and growth of heterotrophs 1541. Annual Review of Microbiology, v. 24, p. 17-52, 1970.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São

- Paulo: McGraw-Hill, c 1980. v. 1. p. 203.
- PHARMACIA. PhastGel silver kit instruction manual.
- Piscataway, 1987. 4p.
- PILKIS, S.J.; REGEN, D.M.; STEWART, B.H. et al. Rat liver 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase: a unique bifunctional enzyme regulated by cyclic AMP-dependent phosphorylation. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 5, p. 95-121.
- PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975. cap. 2 e 16, p. 4-14, 156-169.
- PRETORIUS, I.S.; WESTHUIZEN, T.J. van der. The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry - a review. South Africa Journal of Enology and Viticulture, v. 12, n. 1, p. 3-31, 1991.
- PRINGLE, J.R. Methods for avoiding proteolytic artefacts in studies of enzymes and other proteins from yeasts. Methods in Cell Biology, v. 12, p. 149-185, 1975.
- PRINGLE, J.R.; MOR, J.R. Methods for monitoring the growth of yeast cultures and for dealing with the clumping problem. Methods in Cell Biology, v. 11, p. 131-168, 1975.
- PROUDLOCK, J.W.; WHEELDON, L.W.; JOLLOW, D.J. et al. Role of sterols in Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta, v. 152, p. 434-437, 1968.

- RAMGOPAL, M.; BLOCH, K. Sterol synergism in yeast. Proceedings of the National Academy of Science USA, v. 80, n. 3, p. 712-715, 1983.
- RANDLE, P.J.; FATANIA, H.R.; LAU, K.S. Regulation of the mitochondrial branched-chain 2-oxoacid dehydrogenase complex of animal tissues by reversible phosphorylation. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier, 1984. v. 3. cap. 1. p. 1-26.
- RANDLE, P.J.; SALE, G.J.; KERBEY, A.L. et al. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation and dephosphorylation. In: ROSEN, O.M.; KREBS, E.G. Protein Phosphorylation. Book B. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. V. 8. p. 687-699. CSH, 1981.
- RAWN, J.D. Biochemistry. Part 3 & 4. Burlington: Neil Patterson Publishers, 1989. p. 235-660.
- REED, L.J.; PETTIT, F.H. Phosphorylation and dephosphorylation of pyruvate dehydrogenase. In: ROSEN, O.M.; KREBS, E.G. Protein phosphorylation. Book B. Cold Spring Harbor Conferences on Cell proliferation. V. 8. CSH, 1981. p. 701-711.
- ROBB, R.J.; KUTNY, R.M.; PANICO, M. et al. Posttranslational modification of human T-cell growth factor. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 116, n. 3, p. 1049-1055, 1983.
- ROCHE, T.E.; CATE, R.L. Purification of porcine liver

- pyruvate dehydrogenase complex and characterization of its catalytic and regulatory properties. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 183, p. 664-677, 1977.
- RODRIGUEZ, R.J.; LOW, C.; BOTTEMA, C.D.K. et al. Multiple functions for sterols in Saccharomyces cerevisiae. Biochimica et Biophysica Acta, v. 837, n. 3, p. 336-343, 1985.
- ROEPSTORFF, P.; FOHLMAN, J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomedical Mass Spectrometry, v. 11, n. 11, p. 601, 1984.
- ROSE, K.M.; JACOB, S.T. Phosphorylation of DNA-dependent RNA polymerases. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation=further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 11, p. 209-226.
- SAIER Jr., M.H. Enzymes in metabolic pathways: a comparative study of mechanism, structure, evolution, and control. New York: Harper & Row, 1987. p. 67.
- SANO, Y.; NOZU, Y.; INOUE, H. Abnormal behaviour of plant virus coat proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and in guanidine hydrochloride gel filtration. In: MARKHAN, R.; HORNE, R.W. Structure-function relationships of proteins. Proceedings of the Third John Innes Symposium held in Norwich, July 1976. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1976.
- SCHAAFF, I.; GREEN, J.B.A.; GOZALBO, D. et al. A deletion of



- the PDC 1 gene for pyruvate decarboxylase of yeast causes a different phenotype than previously isolated point mutations. Current Genetics, v. 15, n. 2, p. 75-81, 1989.
- SCHELLENBERGER, A. The amino group and steric factors in thiamin catalysis. Annals of the New York Academic of Sciences, v. 378, p. 51-62, 1982.
- SCHELLENBERGER, A.; HÜBNER, G. Molecular aspects of the function of yeast pyruvate decarboxylase. Proceedings FEBS Meeting, v. 52, p. 331-339, 1978.
- SCHMITT, H.D.; CIRIACY, M.; ZIMMERMANN, F.K. The synthesis of yeast pyruvate decarboxylase is regulated by large variations in the messenger RNA level. Molecular and General Genetics, v. 192, p. 247-252, 1983.
- SCHMITT, H.D.; ZIMMERMANN, F.K. Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. Journal of Bacteriology, v. 151, n. 3, p. 1146-1152, 1982.
- SCOPES, R.K. Protein purification: principles and practice. New York:Springer-Verlag, 1982. cap. 4-6 , 8, p. 67-200, 213-243.
- SEEBOTH, P.G.; BOHNSACK, K.; HOLLENBERG, C.P. pdc 1<sup>o</sup> mutants of Saccharomyces cerevisiae give evidence for an additional structural PDC gene: cloning of PDC 5, a gene homologous to PDC 1. Journal of Bacteriology, v. 172, n. 2, p. 678-685, 1990.
- SEEHAUS, T.; RODICIO, R.; HEINISCH, J. et al. Specific gene probes as tools in yeast taxonomy. Current Genetics, v. 10, n. 2, p. 103-110, 1985.

- SIEBER, M.; KÖNIG, St.; HÜBNER, G. et al. A rapid procedure for the preparation of highly purified pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. Biomedica Biochimica Acta, v. 42, n. 4, p. 343-349, 1983.
- STEPHENSON, M.P.; DAWES, E.A. Pyruvic acid and formic acid metabolism in Sarcina ventriculi and the role of ferredoxin. Journal of General Microbiology, v. 69, p. 331-343, 1971.
- STOUTHAMER, A.H.; BETTENHAUSSEN, C. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms; a reevaluation of the method for the determination of ATP production by measuring molar growth yields. Biochimica et Biophysica Acta, v. 301, p. 53-70, 1973.
- STRÅLFORS, P.; BELFRAGE, P. Reversible phosphorylation of hormone-sensitive lipase/cholesterol ester hydrolase in the hormonal control of adipose tissue lipolysis and of adrenal steroidogenesis. In: COHEN, P. Enzyme regulation by reversible phosphorylation-further advances. Molecular aspects of cellular regulation. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1984. v. 3, cap. 2, p. 27-62.
- SUKATSCH, D.A.; DZIENGEL, A. Biotechnology: a handbook of practical formulae. Essex: Longman Group UK Limited, 1987. p. 9-36.
- TEAGUE, W.M.; PETTIT, F.H.; WU, T.-L. et al. Purification and properties of pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine heart and kidney. Biochemistry, v. 21, p. 5585-

5592, 1982.

TOMER, K.B.; GROSS, M.L.; ZAPPEY, H. et al. FAB and tandem mass spectrometry for endorphin- and ACTH peptides of molecular weight to 2000. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, v. 15, n. 12, p. 649-657, 1988.

TOMER, K.B.; GUENAT, C.; DINO Jr., J.J. et al. Applications of fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, v. 16, p. 473-476, 1988.

TZAGOLOFF, A. Oxidative pathways of mitochondria. In: TZAGOLOFF, A. Mitochondria. New York: Plenum Press, 1982. cap. 3, p. 39-60.

UHLINGER, D.J.; YANG, C.-Y.; REED, L.J. Phosphorylation - dephosphorylation of pyruvate dehydrogenase from baker's yeast. Biochemistry, v. 25, p. 5673-5677, 1986.

ULLRICH, J. Structure-function relationships in pyruvate decarboxylase of yeast and wheat germ. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 378, p. 287-305, 1982.

ULLRICH, J. Yeast pyruvate decarboxylase (2-oxoacid carboxylase, EC 4.1.1.1.) assay of thiamine pyrophosphate. Methods in Enzymology, v. 18, p. 109-15, 1970.

ULLRICH, J.; KEMPFLER, M. Subunit size of cytoplasmic yeast pyruvate decarboxylase. FEBS Letters, v. 4, n. 4, p. 273-274, 1969.

ULLRICH, J.; WITTORF, J.H.; GUBLER, C.J. Molecular weight and coenzyme content of pyruvate decarboxylase from brewer's yeast. Biochimica et Biophysica Acta, v. 113, p.

595-604, 1966.

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. Biochemischer Zeitschrift: v. 310, p.384-421, 1941.

WELCH, P.; SCOPES, R.K. Studies on cell-free metabolism: ethanol production by a yeast glycolytic system reconstituted from purified enzymes. Journal of Biotechnology, v. 2, p. 257-273, 1985.

WELLER, M. Protein phosphorylation; the nature, function, and metabolism of proteins which contain covalently bound phosphorus. [S.l.]: Pion limited, 1979. cap. 6. p. 183-185.

WHITEHOUSE, C.M.; DREYER, R.N.; YAMASHITA, M. et al. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. Analytical Chemistry, v. 57, p. 675-679, 1985.

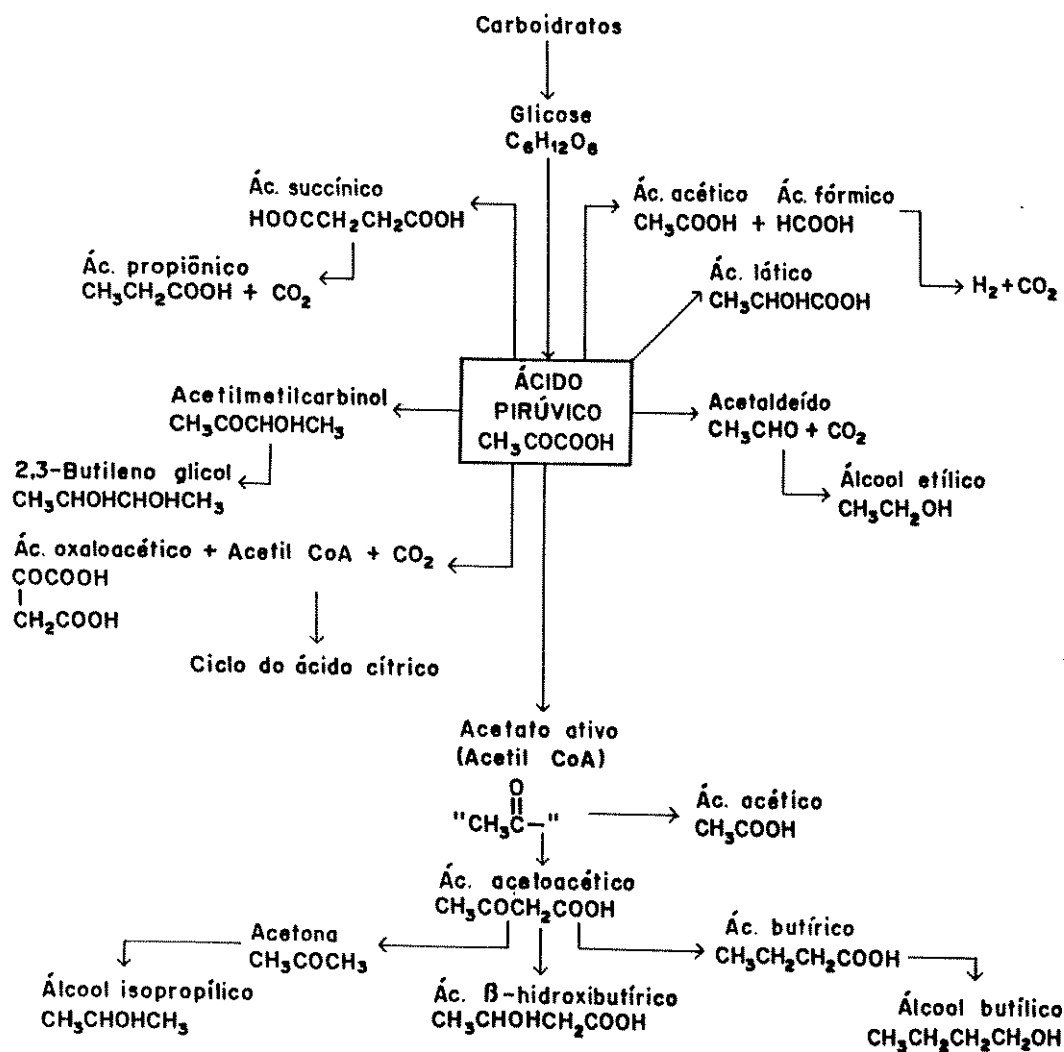
WILLIAMS, D.H.; BRADLEY, C.V.; SANTIKARN, S. et al. Fast-atom-bombardment mass spectrometry; a new technique for the determination of molecular weights and amino acid sequences of peptides. Biochemical Journal, v. 201, n. 1, p. 105-117, 1982.

WRIGHT, A.P.H.; PNG, H-L.; HARTLEY, B.S. Identification, cloning and characterization of a new gene required for full pyruvate decarboxylase activity in Saccharomyces cerevisiae. Current Genetics, v. 15, n. 3, p. 171-175, 1989.

YAMASHITA, M.; FENN, J.B. Negative ion production with the

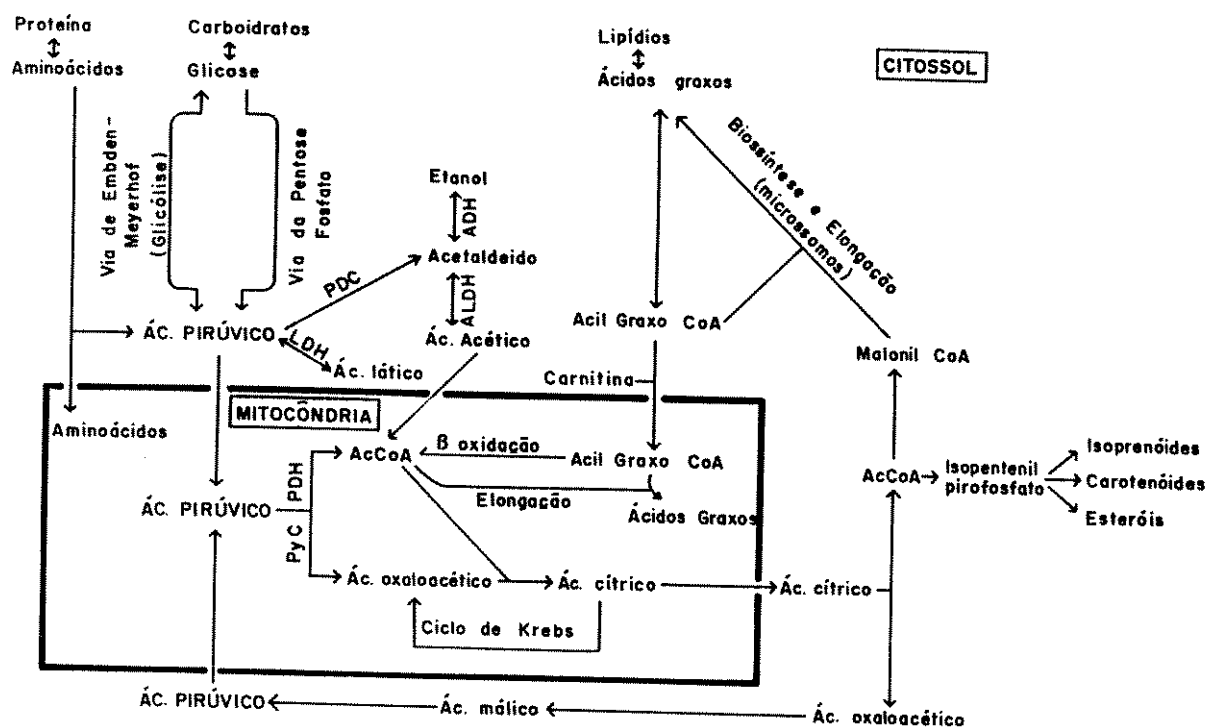
- electrospray ion source. The Journal of Physical Chemistry, v.88, n. 20, p. 4671-4675, 1984.
- YEAMAN, S.J.; HUTCHESON, E.T.; ROCHE, T.E. et al. Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. Biochemistry, v. 17, n. 12, p. 2364-2370, 1978.
- ZEHENDER, H.; TRESCHER, D.; ULLRICH, J. Activity stain for pyruvate decarboxylase in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, v. 135, p. 16-21, 1983.
- . Improved purification of pyruvate decarboxylase from wheat germ; its partial characterization and comparison with the yeast enzyme. European Journal of Biochemistry, v. 167, p. 149-154, 1987.
- ZEHENDER, H.; ULLRICH, J. Amino acid composition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of yeast and wheat germ pyruvate decarboxylase. FEBS Letters, v. 180, n. 1, p. 51-54, 1985.
- ZIMMERMANN, F.K. Informal meeting of German-speaking yeast geneticists, biochemists, physiologists and biotechnologists at Ober-Ramstadt, 2 and 3 November 1984. Yeast, v. 1, p. 79-81, 1985.

## APÊNDICE A



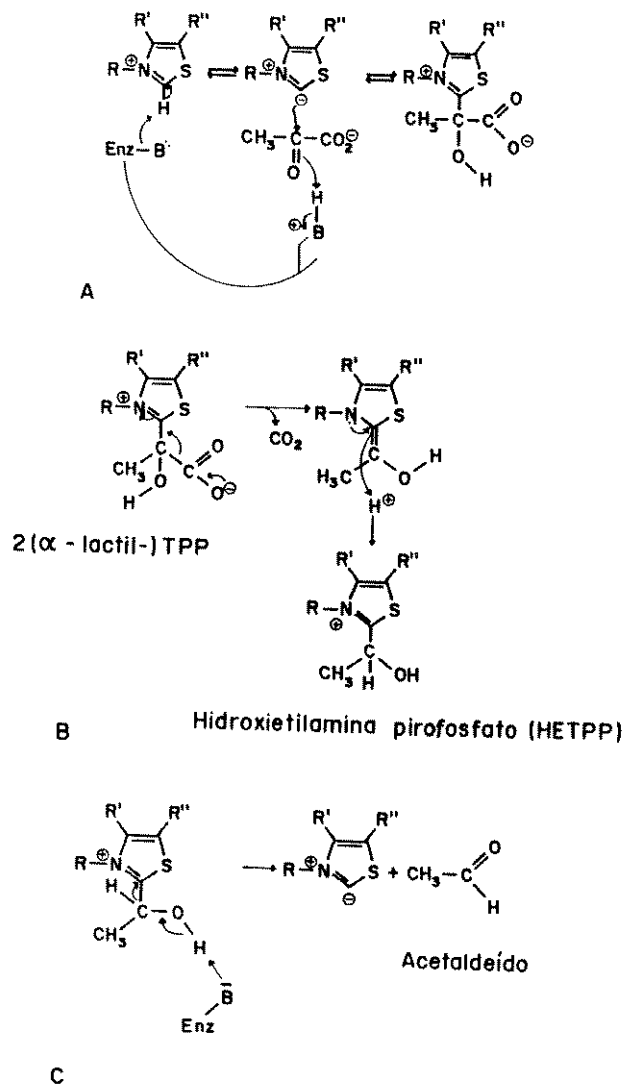
Ácido pirúvico como composto-chave no metabolismo bacteriano da glicose. Todas as reações são anaeróbicas (fermentativas), com exceção daquelas que ocorrem no ciclo de Krebs. (Extraído de Pelczar et al., 1980).

## APÊNDICE B



Relação entre as principais vias metabólicas em eucariotos, e suas compartimentalizações, destacando o papel central do ácido pirúvico. (Adaptado de Rawn, 1989).

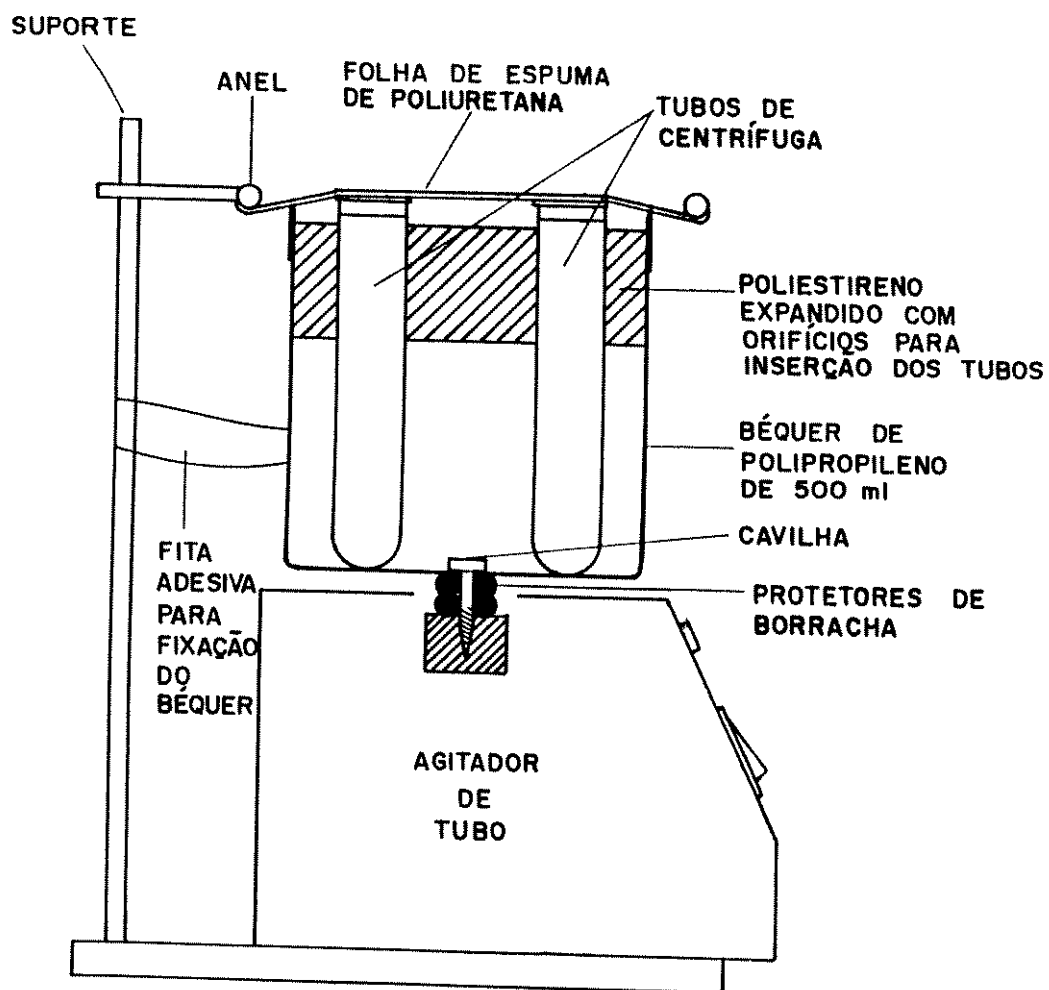
## APÊNDICE C



Mecanismo de ação de piruvato descarboxilase de levedura. A sequência da reação ocorre em três estágios: A. formação de um complexo coenzima-substrato covalente; B. descarboxilação; C. dissociação do complexo produto-coenzima. (Extraído de Saier, 1987).



## APÊNDICE D



Equipamento de Green para preparo de extratos de levedura pelo método de pérolas de vidro. (Green, 1987)

## APÊNDICE E

```

10  Fullw 2:Clearw 2
20  PRINT "PROGRAMA PARA LINEARIZACAO;  $X=X_0e^{(t_2-t_1)n}$  (DA SILVA G.A.)"
30  PRINT "COMPUTADOR ATARI 250ST EXPANDIDO PARA 1MB RAM"
40  PRINT "LINGUAGEM: ST BASIC"
50  PRINT "CODIGO DO PROGRAMA: LRGR.BAS"
60  print "write 1 for the following question after checking the printer is on"
70  PRINT " ENTRE COM OS VALORES ENCONTRADOS QUE ESTE PROGRAMA OS TRANSFORMA"
80  PRINT " EM LOG NEPERIANOS"
90  LPRINT CHR$(27); "W0";
100 input "remind switching the printer on!"; yes
110 input " experiment number:"; E
120 INPUT "NUM.OF PAIR OF VARIABLES"; N
130 PRINT "N= "; N
140 DIM X(N), Y(N)
150 FOR I=1 TO N
160 PRINT TAB(5) "ENTER X": I; ", Y": I
170 INPUT X(I)
180 INPUT Y(I)
190 LET Y(I)=LOG(Y(I))
200 NEXT I
210 SP=0
220 FOR I=1 TO N
230 SP=SP+X(I)*Y(I)
240 NEXT I
250 LPRINT CHR$(27); "W1";
260 LPRINT TAB(20) "LINEAR REGRESSION"
270 LPRINT
280 LPRINT
290 LPRINT
300 LPRINT CHR$(27); "W0";
310 LPRINT CHR$(27); "4";
320 LPRINT TAB(35) "EXPERIMENT NUMBER-"; E
330 LPRINT TAB(32) "SP= "; SP
340 SX=0
350 FOR I=1 TO N
360 SX=SX+X(I)
370 NEXT I
380 LPRINT TAB(32) "SUM X= "; SX
390 LET X1=SX^2
400 PRINT "THE SQUARE OF SUM OF X AND X1 = "; X1
410 SUMY=0
420 FOR I=1 TO N
430 SUMY= SUMY+Y(I)
440 NEXT I
450 LET PS=SUMY*SX
460 LPRINT TAB(32) "SUMY= "; SUMY
470 LPRINT TAB(32) "SUMX*SUMY is PS = "; PS
480 LET Y1=SUMY^2
490 LPRINT TAB(32) "SQUARE OF SUM OF Y AND Y1= "; Y1
500 SQ(X)=0
510 FOR I=1 TO N
520 BX=X(I)^2
530 SQ(X)=SQ(X)+BX

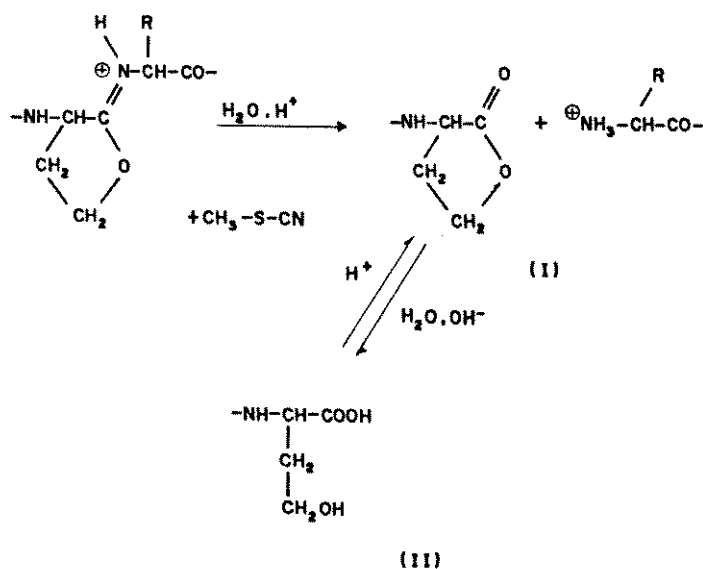
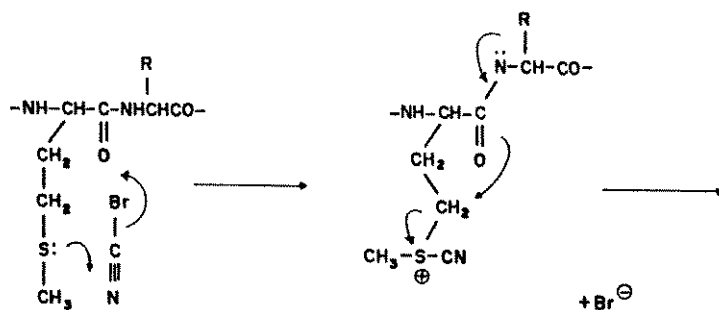
```

```

540 NEXT I
550 PRINT "SQ(X)= ";SQ(X)
560 SQY=0
570 FOR I=1 TO N
580 Y=A+BX
590 SQY=SQY+Y(I)^2
600 NEXT I
610 PRINT "SQY= ";SQY
620 R1=(SP-(PS/N))^2
630 LPRINT TAB(32)"R1= ";R1
640 R2=SQ(X)-(X1/N)
650 LPRINT TAB(32)"R2= ";R2
660 R3=SQY-(Y1/N)
670 LPRINT TAB(32)"R3= ";R3
680 R=R1/(R2*R3)
690 LPRINT TAB(32)"DETERM.COEFIC.= ";R
700 PRINT TAB(32)"DETERM.COEFIC.= ";R
710 LPRINT CHR$(27);"5";
720 LPRINT
730 LPRINT
740 LPRINT TAB(32)CHR$(27);"x1";
750 LPRINT TAB(41)"X"," Y";
760 FOR I=1 TO N
770 LPRINT TAB(35)" X= ";X(I),"Y= ";Y(I);
780 NEXT I
790 LPRINT CHR$(27);"W0";
800 LPRINT CHR$(27);"4";
810 LPRINT
820 B=(SP-(PS/N))/R2
830 LPRINT
840 LPRINT TAB(32)"B= ";B
850 PRINT TAB(32)"B= ";B
860 A=(SUMY/N)-(B*(SX/N))
870 LPRINT TAB(32)"A= ";A
880 PRINT TAB(32)"A= ";A
890 LPRINT TAB(32)"Linear Equation"
900 LPRINT
910 LPRINT TAB(22)"Yc=Ycalculated";TAB(46)"Yobs.=Y observed"
920 LPRINT TAB(5)CHR$(2);tab(25)chr$(2)
930 FOR I=1 TO N
940 Yc=A+B*X(I)
950 LPRINT TAB(22)"Yc=A+BX= ";Yc;TAB(46)"YObs.= ";Y(I)
960 LPRINT TAB(22)"Yc(q/I)= ";EXP(Yc);TAB(46)"YObs.=";EXP(Y(I))
970 NEXT I
980 LPRINT CHR$(27);"W0";
990 LPRINT CHR$(12); 'form feed
1000 END

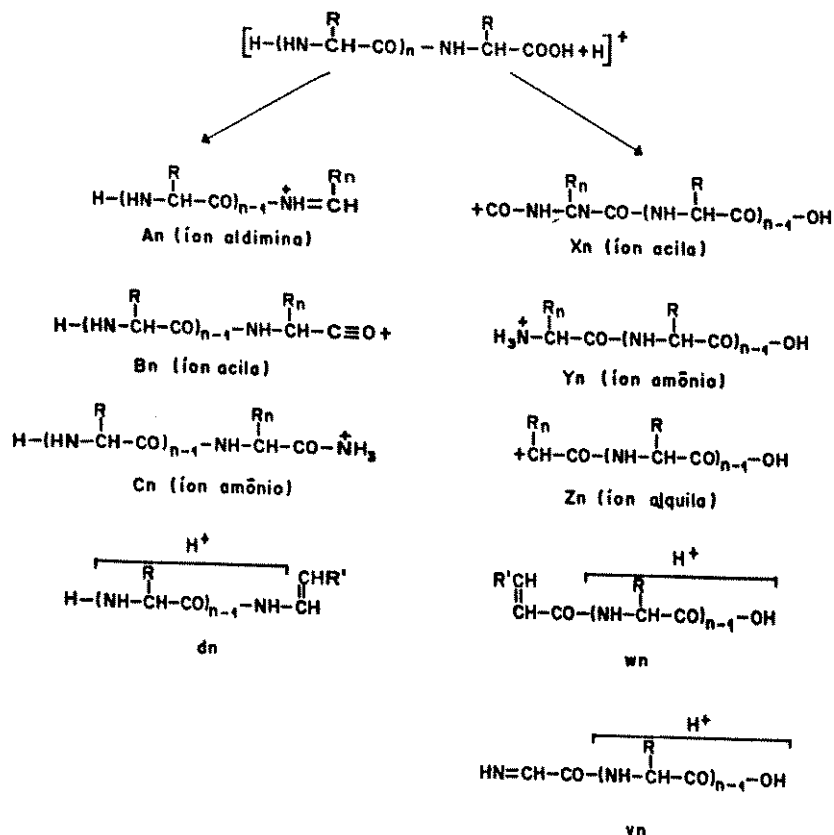
```

# APÊNDICE F



Reação do brometo de cianogênio. Resíduos de metionina são convertidos a uma mistura de resíduos de lactona de homoserina (I) e de homoserina (II) do C-terminal. (Extraído de Chatterjee, 1989).

## APÊNDICE G



Estruturas dos íons produzidos a partir de peptídios por espectrometria de massa. Os íons  $A_n$ ,  $B_n$ ,  $C_n$ ,  $X_n$ ,  $Y_n$  e  $Z_n$  resultam da clivagem do esqueleto peptídico, sendo os três primeiros a partir do N-terminal e os últimos, do C-terminal, enquanto que  $d_n$ ,  $w_n$  e  $v_n$  se originam da perda parcial ou total de cadeias laterais. O uso de letras maiúsculas para denominar os íons de cadeia peptídica foi mantido de acordo com a nomenclatura de Roepstorff & Fohlman (1984) e de letras minúsculas para os íons das cadeias laterais, de acordo com Johnston et al. (1988). Nestes últimos,  $R'$  denota um substituinte, quando houver, no átomo de carbono do aminoácido clivado. (Adaptado de Johnson et al., 1988).