HAMZA FAHMI ALI EL-DORRY

FRUCTOSE-1,-6-BISFOSFATASE DE FÍGADO DE COELHO.
ESTRUTURA PRIMÁRIA DA REGIÃO AMINO-TERMINAL
E SÍTIOS DE CLIVAGEM POR AÇÃO CATALÍTICA DA
SUBTILISINA

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para Obtenção do
Título de Livre-Docente.

SÃO PAULO
1977

À Sawsan

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Metry Bacila, o meu sincero agradecimento por todo o apoio manifestado ao longo dos anos de estudos bioquímicos, em que tive a oportunidade de participar dos programas de pesquisa do laboratório, bem como de contar com a sua valiosa discussão durante as atividades desenvolvidas, em especial às de pós-graduação.

Ao Professor Doutor Bernard L. Horecker, que me ofereceu a oportunidade de aprimorar a minha formação científica nos seus laboratórios, o meu reconhecimento por sua atenciosa acolhida, bem como pelo profícuo e constante incentivo recebido.

À Professora Doutora Tomoko Higuchi, o meu agradecimento pelo estímulo e apoio inestimáveis e pelas valiosas sugestões na elaboração do presente trabalho.

À Srta. Inês M. Imperatriz os meus profundos agradecimentos, que desde o início de minha carreira tem se constituído numa incansável, dedicada e eficiente colega de trabalho cuja colaboração tem sido inestimável na organização dos inúmeros manuscritos que tenho apresentado.

Aos Drs. O. Tsolas e C.Y. Lai, do "Roche Institute of Molecular Biology", em Nutley, E.U.A., pelos sugestões durante a parte experimental da presente pesquisa.

Aos pesquisadores Drs. A. Dzugaj, D. Chu, L. Botelho e O. Crivellaro pela colaboração nas diversas etapas da presente pesquisa.

O trabalho de pesquisa apresentado na presente Tese foi realizado no período de 1974 a 1977, no "Departamento de Química Fisiológica do Roche Institute of Molecular Biology", em Nutley, New Jersey, E.U.A. Durante esse tempo, fui recebido como "post-doctoral fellow" daquela instituição, e nos três últimos meses, obtive suplementação concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. A elas, o meu reconhecimento.

Os meus agradecimentos à colaboração da Srta. Madalena Pereira de Paiva na preparação dos trabalhos de datilografia.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	1
1. Isolamento de Fru-P ₂ ase neutra	3
2. Propriedades da Fru-P ₂ ase neutra	4
2.1. Peso molecular e estrutura de subunidade	4
2.2. Propriedades catalíticas	7
2.3. Propriedades alostéricas	8
3. Conversão de Fru-P ₂ ase neutra para forma alca <u>l</u> ina	9
3.1. Conversão de enzimas proteolíticas	9
3.2. Conversão por protease do lisossoma	11
3.3. Mudanças em estrutura associadas com as mudanças de propriedades catalíticas	12
4. Regulação da Fru-P ₂ ase	13
5. Objetivos do presente trabalho	15
II. MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Material	17
2. Métodos	18
2.1. Cromatografia	18
2.1.1. Dowex AG50-X2	18
2.1.2. Filtração em gel	18
2.1.3. Camada delgada em poliamida	19
2.2. Técnicas eletroforéticas	19
2.2.1. Eletroforese em papel	19
2.2.2. Eletroforese em gel de SDS-poli-acrilamida	20
2.3. Determinação de proteína	21
2.3.1. Por espectrofotometria	21
2.3.2. Determinação de fluorescamina após hidrólise alcalina	21
2.4. Determinação da enzima	22
2.5. Determinação de grupo acetila	23

	Pág.
2.6. Detecção de peptídios	24
2.6.1. Colunas	24
2.6.2. Papel	25
2.6.2.1. Fluorescamina	25
2.6.2.2. Ninidrina	26
2.6.2.3. Cl ₂ -amido-iodeto	26
2.7. Redução e carboximetilação de resíduos de cisteína	27
2.8. Carbamilação de amino-grupos	28
2.9. Bloqueio reversível de amino-grupos com metil-acetimidato	28
2.10. Digestão proteolítica	29
2.10.1. Tripsina	29
2.10.2. Quimotripsina	30
2.10.3. Termolisina	30
2.10.4. Subtilisina	30
2.11. Clivagem com brometo de cianogênio	31 /
2.12. Análise de aminoácidos	31
2.13. Análise sequencial	33
2.13.1. Determinação do grupo N-terminal	33
2.13.1.1. Método do cianato	33
2.13.1.2. Método do cloreto de dansila	34
2.13.2. Determinação de grupo carboxi-terminal	35
2.13.2.1. Carboxipeptidases	35
2.13.3. Degradação de Edman	36
III. RESULTADOS	38
1. Efeito da subtilisina sobre as propriedades catalíticas e alostéricas e sobre a estrutura das subunidades da Fru-P ₂ ase	38

	Pág.
1.1. Efeito sobre as propriedades catalíticas e alostéricas	38
1.2. Efeito sobre a estrutura das subunidades	38
1.3. Separação de peptídio-S e da subunidade-S modificada	41
1.4. Análise de aminoácidos do peptídio-S	43
2. Localização do peptídio-S na molécula da Fru-P ₂ ase	48
2.1. Evidência para o grupo N-terminal bloqueado da Fru-P ₂ ase	48
2.2. Clivagem com brometo de cianogênio e identificação do peptídio N-terminal da Fru-P ₂ ase nativa	49
2.3. Isolamento de peptídio N-terminal resultante da reação de brometo de cianogênio na Fru-P ₂ ase nativa	52
2.4. Isolamento de peptídio do N-terminal a partir do peptídio-S por brometo de cianogênio	52
3. Identificação do peptídio N-terminal da subunidade-S e do sítio de clivagem por subtilisina	52
3.1. Isolamento do peptídio sobreposto (PCN2) por brometo de cianogênio	56
3.2. Isolamento do fragmento de BrCN do peptídio N-terminal da subunidade-S	58
4. Sequência do peptídio-S	58
4.1. Procedimento para análise sequencial	58
4.2. Digestão tríptica do peptídio-S carbamila do	61
4.3. Disposição dos peptídios T1, T2, T3 e T4 na sequência primária	64
4.4. Sequência do peptídio tríptico T2 (peptídio N-terminal)	66

	Pág.
4.5. Sequência do peptídeo tríptico T4	74
4.6. Sequência do peptídeo tríptico T1	74
4.7. Sequência do peptídeo tríptico T3	
5. Sequência do peptídeo de superposição	92
5.1. Peptídeos trípticos de PCN2	92
5.2. Peptídeos quimotrípticos de T1-c	97
6. Sequência dos peptídeos amino-terminais produ- zidos pela cisão da subunidade-S com CNBr	97
7. Heterogeneidade de peptídeo-S	111
8. Estimativa da estrutura secundária	111
IV. DISCUSSÃO	115
V. CONCLUSÕES	127
VI. RESUMO	129
SUMMARY	130
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

ABREVIATURAS

TPCK - (L-1-tosilamido-2-fenil)etil clorometil cetona

NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

Fluorescamina - 4-Fenilspiro(Furan-2-(3H),1'-Fatalan)-3,3-diona

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Fru-P₂ase - Frutose 1,6-bisfosfato

EDTA - Etileno diamino tetracetato de sódio

DTT - Ditiotreitól

DMAA - Dimetil alil amina

PITC - Fenil isotiocianato

DFN - Di-iso-propil fluorofosfato

Peptídio-S - O peptídio de P.M. = 6.300 resultante da ação de
subtilisina

Subunidade-S - Subunidade nativa menos o peptídio-S

Cys (CM) = Carboxi metil cisteína

I. INTRODUÇÃO

A fructose-1,6-bisfosfatase (E.C. 3.1.3.11) é uma fosfatase específica, encontrada em fígado, rim e músculo esquelético de mamífero e outros vertebrados. A enzima catalisa a hidrólise de fructose-1,6-bisfosfato para produzir fructose-6-fosfato e Pi.

A enzima foi inicialmente identificada e parcialmente purificada de fígado e de rim de mamífero por Gomori (1), que a separou de outras fosfatases não específicas e mostrou a sua inatividade na ausência de Mg^{2+} .

Embora a atividade de Fru-P₂ase tenha sido descrita pela primeira vez em 1943, somente em 1957 McGilvery et al. (2) propuseram um papel específico para a enzima na gliconeogênese. Foi verificado que uma enzima específica catalisando essa reação seria necessária para a gliconeogênese, a fim de transpor a etapa irreversível, do ponto de vista fisiológico, catalisada pela fosfofructoquinase (3), uma vez que em fígado e em rim a via de Embden-Meyerhoff pode funcionar tanto para o catabolismo da glicose (glicólise) como para a sua síntese (gliconeogênese). A direção do fluxo vai depender do estado fisiológico do animal. A descoberta de que fosfofructoquinase é inibida por ATP e citrato e de que essa inibição é revertida por AMP, juntamente com a descoberta

posterior de que Fru-P₂ase obtida de várias fontes é inibida por AMP (4, 5, 6) indicaram que o nível energético da célula, de acordo com a relação de AMP e ADP para ATP, deveria exercer um papel especial na regulação da glicólise e da gliconeogênese (7). A evidência conclusiva para a função gliconeogênica da Fru-P₂ase proveio da descoberta de linhagens mutantes em Escherichia coli (8), que foram consideradas incapazes de crescer em substratos tais como glicerol, acetato e succinato, a menos que uma fonte de hexose ou pentose fosse também adicionada. A descoberta posterior da doença provocada pela deficiência da Fru-P₂ase no homem (9) confirmou o papel essencial dessa enzima na gliconeogênese em mamíferos.

As preparações da enzima descritas por Gomori (1) foram caracterizadas por um pH ótimo alcalino, e apresentaram pouca ou nenhuma atividade na faixa de pH neutro, o que provocou sérias dúvidas sobre a sua função na gliconeogênese. Curvas semelhantes da atividade da enzima com relação ao pH foram obtidas mais tarde para preparações parcialmente purificadas de fígado de coelho (10, 11) de rim de porco (6), e para a enzima cristalina de coelho (12). Os pHs ótimos alcalinos foram também identificados para preparações purificadas de espinafre (13) e para Fru-P₂ase cristalina de Candida utilis (14).

Esse problema foi discutido em simpósio realizado em Charlottesville, Virgínia, E.U.A., em 1961. Naquela época, foi

sugerido que a atividade verificada a pH neutro deveria ser estimulada pela adição de tampão quelante e também que uma segunda Fru-P₂ase neutra deveria estar presente em fígado (3). Contudo, foi recentemente considerado que a chamada fructose-1,6-bisfosfatase "alcalina" é uma forma modificada pela ação de proteases de lisossoma. Uma fructose-bisfosfatase "neutra", que já havia sido detectada muito antes por Hers e Kusaka (15), foi isolada em forma neutra homogênea por Byrne et al. (16) e por Traniello e seus colaboradores (17) a partir de fígado bovino e fígado de coelho, respectivamente. A Fru-P₂ase purificada com atividade a pH neutro foi também descrita por Carlson et al. (18).

1. Isolamento de Fru-P₂ase neutra

Os experimentos iniciais de Pogell e McGilvery (19), Hers e Kusaka (15) e Byrne (20) indicaram que a causa da mudança no pH ótimo durante o isolamento da enzima de fígado de coelho seria a modificação da enzima pela atividade proteolítica endógena. Esse fato foi confirmado por Nakashima et al. (21), segundo os quais a atividade modificadora seria associada com a fração da partícula pesada de fígado de coelho, e a enzima proteolítica foi liberada dessas partículas por tratamento com acetona. Eles também mostraram que na purificação da enzima a partir de extratos de pós acetônicos de fígado de coelho, segundo Pontremoli et al. (22), a mudança de pH ótimo de neutro

para alcalino ocorreu quando a enzima foi aquecida a pH 4,2; essas condições poderiam favorecer a ação de catepsinas presentes nos extratos. O procedimento para purificação compreendeu aquecimento a pH neutro e cromatografia em fosfocelulose, com a técnica de eluição com substrato introduzida por Pogell (23). Com isso se obteve uma preparação com atividade a pH 7,5 de 3 a 4 vezes maior que a atividade a pH 9,2, e a relação de atividade de pH 7,5/9,2 permaneceu inalterada durante a purificação.

Traniello et al. (17, 24) desenvolveram um processo para evitar tanto a liberação de proteases de lisossoma como as condições em que elas deviam ser ativadas. O uso de pó acetônico para a preparação de extratos foi substituído pela extração da enzima de fígado fresco com sacarose isotônica. Mais tarde, procedimentos para isolamento de Fru-P₂ases neutras foram apresentados a partir de fígado de coelho (18), fígado de bovino (25), fígado de carneiro (26), fígado de rato (27,28), fígado de galinha (29, 30), rim de coelho (31) e rim de porco (32).

2. Propriedades da Fru-P₂ase neutra

2.1. Peso molecular e estrutura de subunidade

A Fru-P₂ase neutra purificada de fígado e rim de coelho foi considerada como constituída de proteínas homogêneas com

peso molecular de 140.000 (24, 31), muito maior do que o peso molecular de aproximadamente 130.000 indicado para a enzima alcalina (33). Cada uma dessas proteínas era constituída de 4 subunidades com peso molecular de cerca de 35.000 - 36.000, conforme foi determinado por eletroforese em gel tipo "disc" em dodecil sulfato de sódio, ou por medidas de equilíbrio de sedimentação em cloridrato de guanidina (34). Esse fato veio contrastar com as preparações da enzima alcalina, as quais produziram duas subunidades diferentes por eletroforese em gel tipo "disc", correspondendo ao peso molecular de aproximadamente 36.000 e 30.000 (Tabela I). A maior subunidade pareceu ser equivalente à subunidade da enzima neutra.

A enzima purificada de rim de porco é também constituída de 4 subunidades cujo peso molecular foi estimado em torno de 34.000 (35), embora o peso molecular apresentado para a enzima não dissociada, 130.000, seja de certa forma baixo quando comparado com aquele apresentado para a enzima de rim de coelho.

Fructose-1,6-bisfosfatases isoladas de fígado e rim de coelho parecem possuir estruturas primárias idênticas, como foi deduzido pelos seus mapas peptídicos trípticos e os perfis peptídicos obtidos após cisão com brometo de cianogênio e cromatografia em Sephadex G-75 (36). A enzima isolada de músculo esquelético de coelho, por outro lado, produz distintamente

Tabela I - Peso molecular e estrutura de subunidades de Fru-P₂ases neutras e alcalinas^a

Preparação	Métodos	Peso molecular	Ref.
Fru-P ₂ ase neutra de fígado	Gradiente de densidade de sacarose	143.000	17
Fru-P ₂ ase neutra de fígado	Equilíbrio de sedimentação	140.000	24
Fru-P ₂ ase neutra de fígado	Dissociada com SDS, por eletroforese em gel tipo "disc"	35.000	17
Fru-P ₂ ase neutra de rim	Equilíbrio de sedimentação	140.000	31
Fru-P ₂ ase neutra de rim	Dissociada por ácido maleico equilíbrio de sedimentação	37.500	31
Fru-P ₂ ase alcalina de fígado	Gradiente de densidade de sacarose	130.000	22
Fru-P ₂ ase alcalina de fígado	Equilíbrio de sedimentação	131.000	
Fru-P ₂ ase alcalina de fígado	Dissociada com SDS por eletroforese em gel tipo "disc"	31.000 e 37.000	33
Fru-P ₂ ase alcalina de fígado	Dissociada por ácido maleico, equilíbrio de sedimentação	29.000 e 35.000	33

^a A enzima com atividade máxima a pH 9,2, de acordo com o isolamento procedido por Pontremoli et al. (22), é designada Fru-P₂ase alcalina.

diferentes resoluções cromatográficas e eletroforéticas ("finger-prints") e produtos da cisão com brometo de cianogênio.

Fru-P₂ase nativa de fígado de coelho mostrou-se resistente à digestão com aminopeptidase M (37), indicando tanto a presença de prolina amino-terminal ou mascarando o resíduo amino-terminal.

2.2. Propriedades catalíticas

Fru-P₂ase neutras purificadas de fígado e rim apresentam pH ótimo cerca de 8,0 na ausência de EDTA ou outros quelantes (24). A atividade foi aumentada e o pH ótimo mudou para a faixa neutra, pH 6,5-7,5, pela adição de uma variedade de quelantes (24, 25, 28, 38). Embora Fru-P₂ase se mostrasse muito sensível à inibição por íons metálicos pesados (39, 40, 41, 42), foi sugerido que o efeito de EDTA e outros quelantes não seria simplesmente um resultado da quelação de tais íons inibitórios (38, 40, 43). Por outro lado, foi evidenciado recentemente um fato para confirmar que EDTA e outros quelantes (e.g. histidina) ativavam Fru-P₂ase através da remoção de íons metálicos inibitórios (25, 28).

A existência de ativadores naturais de Fru-P₂ase foi postulada por Pogell et al. (43, 44). Alguns compostos naturais tais como citrato, histidina e oleato foram indicados como ativadores de Fru-P₂ase purificada. Hers e Eggermont (45), McGilvery (3)

e Pogell (43) verificaram a ativação das enzimas a pH neutro por histidina ou imidazol. Pontremoli (46) observou que histidina, em concentrações verificadas em fígado em jejum, poderia substituir EDTA como ativador da Fru-P₂ase neutra de fígado de coelho. Fu e Kemp (47) observaram que a Fru-P₂ase neutra isolada de músculo esquelético de coelho foi ativada por citrato. Datta et al. (48) verificaram ativação de Fru-P₂ases neutras de fígado e de músculo por citrato e histidina.

Os efeitos de cátions divalentes pareciam variar de acordo com a natureza das preparações da enzima. Ao contrário da enzima "alcalina" de fígado e rim de coelho (49), que apresentou mais atividade com Mn²⁺ do que com Mg²⁺, a Fru-P₂ase neutra das mesmas fontes mostrou atividade máxima com Mg²⁺ (17).

2.3. Propriedades alostéricas

Todas as Fru-P₂ases neutras apresentaram grande atividade pelo substrato e inibição por concentrações mais altas de substrato (17, 50, 51). Mais importante sob o ponto de vista da regulação fisiológica foi a descoberta de que todas as Fru-P₂ases apresentadas até o momento, com exceção da enzima isolada de Polyspondylium pallidum (52) e de músculo de abelhas "mamangavas" (53), são inibidas por AMP. A inibição específica de Fru-P₂ase de fígado de rim por AMP foi relatada quase que simultaneamente por Pogell (4), Newsholme (5) e Mendicino

(6). A natureza alostérica dessa inibição foi inicialmente apresentada por Taketa e Pogell (54) e por Underwood e Newsholme (55). A inibição da Fru-P₂ase nativa de fígado por AMP apresentou cinética sigmoideal (28, 56). A enzima nativa era inibida por concentrações mais baixas de AMP em comparação com a enzima alcalina (17).

3. Conversão de Fru-P₂ase neutra para forma alcalina

3.1. Conversão de enzimas proteolíticas

Já havia sido comunicado anteriormente que o pH ótimo alcalino da Fru-P₂ase, isolada por Gomori et al. (1), era atribuído à modificação proteolítica endógena. Portanto, dois tipos de Fru-P₂ase de mamífero que possuíam propriedades diferentes tinham sido isolados e estudados. A enzima nativa foi caracterizada por um pH ótimo na faixa neutra, maior sensibilidade à inibição por AMP e peso molecular mais elevado, em comparação com a enzima alcalina que se caracteriza por um pH ótimo a pH 9,2, sensibilidade diminuída em relação à inibição por AMP e peso molecular mais baixo. Com o isolamento da enzima nativa de fígado de coelho (17) e de bovino (16), foi possível estudar essa modificação sob condições controladas. Papaína, que havia sido considerada anteriormente fator de aumento para a atividade de Fru-P₂ase, quando adicionada a extratos crus de fígado, foi também considerada modificadora da atividade das

enzimas purificadas (41, 57). O tratamento com papaína causou decréscimo brusco de atividade da enzima na faixa neutra de pH e aumento de atividade a pH 9, de modo que o pH ótimo foi modificado de neutro para alcalino, e o perfil de atividade de pH assemelhou-se àquele previamente indicado para Fru-P₂ase alcalina (12).

Os efeitos de outras enzimas proteolíticas foram também testados por Geller et al. (41). Nagarse e pronase produziram mudanças semelhantes àsquelas observadas com papaína. Quimotripsina causou perda de atividade medida a pH alcalino, enquanto que tripsina causou decréscimo geral de atividade. Pontremoli et al. (57) também consideravam que poderiam dissociar os efeitos de papaína na atividade a pH neutro e alcalino, tornando o pH da digestão mais baixo com papaína. Quando a digestão foi levada a efeito a pH 4,8, o incremento de atividade a pH 9,2 ocorreu antes da perda de atividade a pH 7,5, que foi observada somente depois que a primeira mudança estava completa.

Estudos mais detalhados do efeito da enzima proteolítica na atividade e estrutura de Fru-P₂ase têm sido levados a efeito com subtilisina (24, 37, 58, 59). As mudanças de atividade mostraram-se semelhantes àsquelas produzidas por digestão com papaína a pH 4,8, na forma de incremento de 4 a 6 vezes na atividade medida a pH 9,2, seguido por decréscimo

mais gradativo na sensibilidade à inibição por AMP; a concentração que inibia a enzima nativa em quase 100% causou inibição de somente 25% após digestão por 3 horas com subtilisina.

3.2. Conversão por protease do lisossoma

Os estudos com enzimas proteolíticas parecem confirmar as sugestões anteriores de que as mudanças de pH ótimo em Fru-P₂ase, durante o seu isolamento de extratos hepáticos, foram causadas por atividade proteolítica endôgena nesses extratos. Outra evidência para essa hipótese foi apresentada por Pontemoli et al. (60) quando a Fru-P₂ase neutra purificada foi incubada com lisossomas de fígado de coelho ou de rato e as mudanças observadas nas propriedades catalíticas foram idênticas às aquelas obtidas com subtilisina.

Somente a fração enriquecida de lisossomas mostrou-se efetiva; a incubação com as frações mitocondriais ou microsossomas não alteraram as propriedades catalíticas. Os efeitos foram atribuídos à presença de lisossomas intactos, em base à observação de que a solução do sobrenadante, após remoção de partículas por centrifugação, era inativa.

Nakashima e Ogino (61) observaram recentemente que catepsina B₁, isolada em forma homogênea de lisossomas de fígado de coelho (62), pode catalisar a conversão de Fru-P₂ase

neutra para alcalina. O pH ótimo para conversão foi estimado em 5,0. Os valores apresentados para os pesos moleculares das subunidades nativa e modificada foram de 39.000 e 27.600, respectivamente, correspondendo à perda de um peptídeo ou peptídios equivalentes a peso molecular igual a 11.000.

Nakashima e Ogino (61) também fracionaram as atividades proteolíticas liberadas dos lisossomos por tratamento com acetona e mostraram que a maior atividade estava presente em frações contendo catepsina B₁, embora alguma atividade estivesse associada a outras frações. Foi portanto estabelecido que catepsina B₁ pode catalisar a mudança do pH ótimo, de neutro para alcalino, associada com a conversão de subunidades pesadas para leves.

3.3. Mudanças em estrutura associadas com as mudanças de propriedades catalíticas

Durante a digestão com subtilisina o peso molecular da enzima diminuiu de 143.000 para aproximadamente 120.000 e as subunidades originalmente possuindo peso molecular igual a 36.000 foram reduzidas a peso molecular igual a 29.000 (24). Portanto, a mudança de propriedades catalíticas foi associada com a perda de um peptídeo ou peptídios, equivalente a peso molecular de 6.000, e produziu uma subunidade com peso molecular semelhante ao da subunidade mais leve descrita anteriormente

por Sia et al. (33), em preparações da enzima alcalina. Pontremoli et al. (59) observaram que a enzima nativa era resistente à digestão com aminopeptidase M, indicando tanto a presença de prolina amino-terminal como um resíduo amino-terminal bloqueado. Após digestão com subtilisina, uma extremidade amino-terminal livre foi detectada usando-se aminopeptidase M. A região carboxi-terminal das enzimas não foi atingida. Esse fato sugeriu que modificação por subtilisina envolveu somente a região amino-terminal da enzima.

Mudanças semelhantes em propriedades catalíticas e estrutura foram observadas quando a enzima foi incubada com lisossomas (63, 64).

4. Regulação de Fru-P₂ase

O mecanismo específico para a regulação pela Fru-P₂ase da glicólise e da gliconeogênese deverá ainda ser estabelecido. Conforme já foi mencionado no início desse trabalho, grande parte da pesquisa inicial sobre Fru-P₂ase foi levada a efeito com a forma alcalina da enzima e é importante que essas etapas iniciais da pesquisa sejam repetidas com a enzima neutra ou nativa.

Embora seja geralmente aceito o fato de que a modulação negativa da atividade de Fru-P₂ase por AMP é importante para a sua regulação in vivo (7, 65), mudanças maiores na

concentração de AMP apresentam pouca probabilidade de serem envolvidas no processo (66). Start e Newsholme (67) sugeriram que as atividades catalíticas de fosfofructoquinase e Fru-P₂ase deveriam ser moduladas tanto por mudanças de metabólitos (efetores) bem como por mudanças na concentração da enzima. Essa mudança de orientação no metabolismo de carboidratos seria consubstanciada por aumento da concentração intracelular de citrato que inibiria fosfofructoquinase e ativaria Fru-P₂ase durante as condições gliconeogênicas, como por exemplo o jejum prolongado. O efeito de histidina em Fru-P₂ase neutra durante o jejum prolongado, descrito por Pontremoli et al. (46), já havia sido anteriormente mencionado no presente trabalho. Start e Newsholme (66) demonstraram que o conteúdo hepático de citrato em rato diminuía durante o jejum prolongado. Baseados nesses dados, os autores demonstraram que era pouco provável que mudanças nos níveis de enzima, no caso fosfofructoquinase e Fru-P₂ase, podiam ser responsáveis pela transformação de glicólise para gliconeogênese.

A descoberta de Fru-P₂ase em tecido não gliconeogênico, como o músculo esquelético (68, 69), foi inesperada, uma vez que a sua função era considerada como restrita à gliconeogênese. Várias funções foram atribuídas à Fru-P₂ase em músculo esquelético de vertebrados. Krebs e Woodford (69), seguindo a sua descoberta de atividade da Fru-P₂ase em músculo, sugeriram que essa enzima é necessária para converter α -glicerofosfato,

gerado durante a fase inicial da contração muscular, em glicogênio. Trabalho mais recente (53) sugere que, em alguns organismos, Fru-P₂ase pode agir com fosfofructoquinase para catalisar a síntese cíclica e a hidrólise de Fru-P₂, e portanto agir como um tipo de ATPase para a produção de calor.

5. Objetivos do presente trabalho

A estrutura da região amino-terminal de Fru-P₂ase apresenta especial interesse porque essa porção da cadeia peptídica é sensível à modificação proteolítica tanto in vivo como in vitro. Há várias indicações preliminares de que a modificação proteolítica da enzima pode exercer função na regulação de atividade da Fru-P₂ase, sob condições fisiológicas, uma vez que a hidrólise da ligação peptídica nessa região da cadeia polipeptídica causou considerável mudança nas propriedades catalíticas e alostéricas da enzima. Assim, é importante que se compreenda a natureza das alterações estruturais da enzima, responsáveis pelas mudanças observadas nas suas propriedades catalíticas e alostéricas. Por exemplo, é fundamental saber se há um único sítio ou região na enzima que seja sensível à cisão proteolítica, fato que leva a sugerir que ela pode ser programada para essa modificação. Ainda, desejou-se verificar se os produtos da cisão se dissociam ou não da molécula da enzima, sob condições fisiológicas, ou se a cisão de cadeia

polipeptídica é suficiente para causar mudança conformacional que leve à modificação nas propriedades catalíticas e alostéricas da enzima.

No presente trabalho, esse importante assunto foi analisado sob o aspecto estrutural e funcional, tendo sido levada a efeito análise de sequência de aminoácidos da região da molécula da Fru-P₂ase que sofre cisão proteolítica de subtilisina. Para tanto, foram sequenciados resíduos de 78 aminoácidos dessa região e estabelecidos os sítios de clivagem. Foram feitos estudos sobre a possibilidade desse peptídeo se tornar dissociado ou não da molécula depois da cisão proteolítica. O possível significado da cisão proteolítica que a Fru-P₂ase sofre nos mecanismos de regulação da gliconeogênese foi também discutido, como consequência do trabalho estrutural levado a efeito.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Fructose-1,6-bisfosfatase foi purificada de fígado de coelhos da raça Nova Zelândia, de acordo com o método de Traniello et al. (24). Hexose fosfato-isomerase, glicose-6-fosfato desidrogenase, carboxipeptidase A e B (tratadas com DFP), tripsina (tratada com TPCK) e quimotripsina foram obtidas de Whorthington Biochemicals, Freehold, N. Jersey, E.U.A. Termolisina foi adquirida de Calbiochem, Los Angeles, Califórnia E.U.A., Subtilisina (subtilopeptidase A, Carlsberg, tipo III), fructose-1,6-bisfosfato, sal sódico, e NADP foram obtidas da Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo., E.U.A.

Ácido mono-iodo $[C^{14}]$ acético foi fornecido pela New England Nuclear Corp., Boston, Ma, E.U.A., e diluído com ácido mono-iodo-acético não radioativo até atingir aproximadamente 0,6 ci/mol. Fluorescamina (Fluram R) foi obtida de Hoffman-La Roche, Inc., Nutley, New Jersey, E.U.A. Feniliso - tiocianato, ácido trifluoroacético (ambos da Eastman Organic Chemicals, Rochester, N.Y.), dimetilalilamina (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., E.U.A.) e piridina foram purificados por destilação. Esses reativos são usados com boa margem de segurança por período de seis meses.

Todos os outros reagentes utilizados já possuíam grau de pureza suficiente, não necessitando de outras purificações. Sephadex G-75, G-50 e G-25 foram adquiridos de Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, N. Jersey, E.U.A. Dowex AG 50W-X2, 200-400 mesh, foi fornecido por Bio-Rad Laboratories, Richmond, Va., E.U.A., e lavado antes do uso (70).

2. Métodos

2.1. Cromatografia

2.1.1. Dowex AG-50W-X2

200 g de Dowex AG-50W-X2 (200-400 mesh) foram suspensas em 1 litro de água destilada e as partículas finas removidas por decantações sucessivas. A resina foi transferida para funil de Büchner e lavada com 1 litro de NaOH, 1 N, e depois com água destilada até atingir neutralidade. A resina foi então tratada com 1 litro de HCl 3,0 N e lavada com água até neutralidade e estocada em suspensão aquosa até o momento de uso.

2.1.2. Filtração em gel

Sephadex G-25 (fino) e G-75 (tamanho da partícula 40-120 μ) foram previamente entumescidos, equilibrados e empacotados no mesmo solvente usado na cromatografia.

2.1.3. Camada delgada em poliamida

Dansil-amino ácidos foram separados por cromatografia em camada delgada em folhas de poliamida (7 x 8 cm), como descrito por Woods e Wang (71). Uma solução marcada contendo 0,5 nM de dansil-Arg, dansil-Glu, dansil-Gly, dansil-Ile, dansil-Phe, dansil-Pro, dansil-His e dansil-Ser foi aplicada somente num lado da placa e a amostra a ser analisada em ambos os lados. Os sistemas de solventes usados foram os seguintes: 1º solvente - ácido fórmico 1,5% (Wood e Wang, 71); 2º solvente - benzeno-ácido acético 9:1 (v:v) (Wood e Wang, 71); 3º solvente - acetato de etila-metanol-ácido acético (20:1:1 v/v) (Crowshaw, Jessup e Ranwell, 72).

Os solventes 2 e 3 correram perpendicularmente ao solvente 1 e foram utilizados na sequência numérica indicada.

Após o uso, as folhas de poliamida eram imersas por 12 horas em solução 9:1 v/v de metanol-amônia.

2.2. Técnicas eletroforéticas

2.2.1. Eletroforese em papel

Os peptídios foram fracionados por eletroforese em papel, em aparelho procedente de Savant Corporation, semelhante ao descrito por Katz et al. (73). As amostras foram aplicadas em papel de filtro Whatman nº 3 e submetidas à corrente de

50-100 v/cm por um período de uma a duas horas.

Os sistemas-tampão usados foram os seguintes: pH 6,5-
piridina-ácido acético-água (10:3:87); pH 3,5 - piridina-ácido
acético-água (1:10:89).

Varsol (Eastern Standard Oil Co.) foi usado como meio
de troca de calor com água fria circulante através de serpenti-
nas de aço inoxidável imersas em varsol.

Os peptídios foram eluídos do papel com solução de
hidróxido de amônio 0,2 M. A presença de glutamina e asparagi-
na em peptídios com a finalidade de determinar grupos amida
foi verificada por eletroforese em papel a pH 6,5 por 80 min.,
segundo o método de Offord (74).

2.2.2. Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de
SDS 0,1% foi levada a efeito segundo Lemmli (75) em tubos de
11 x 0,5 cm ou em placas de 15 x 14 x 0,2 cm. A percentagem
de acrilamida usada foi de 10%. Usou-se tampão glicina 192 mM
e Tris 25 mM contendo SDS 0,1%. A amostra (da ordem de 1-2
mg/ml) foi previamente aquecida a 100°C por 2-3 min. em tampão
fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, contendo SDS 1%, β -mercapto-
etanol 1% e glicerol 10%. O corante de referência foi adicio-
nado ao primeiro e ao último locais da camada superior da

placa. A eletroforese foi conduzida a 100 volts por 4-5 horas. Os géis foram colocados em temperatura ambiente por uma hora no corante "Coomassie Brilliant Blue R" 0,025% em isopropanol 25% e ácido acético 10%, e a seguir colocados em "Coomassie Brilliant Blue R" 0,0025% em isopropanol 10% e ácido acético 10% por mais um período de uma hora. Placas de gel foram descoradas por lavagens repetidas em solução de ácido acético 10%.

Para a determinação do peso molecular utilizou-se uma curva padrão construída pela projeção do log de peso molecular com a mobilidade de proteínas de peso molecular conhecido.

2.3. Determinação de proteína

2.3.1. Por espectrofotometria

Em soluções puras de fructose-1,6-bisfosfatase a concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente, usando-se $E_{0,1\%}^{280\text{nm}} = 0,63$, com base no peso seco.

2.3.2. Determinação de fluorescamina após hidrólise alcalina

Alíquotas da solução foram submetidas à secagem em tubos de vidro Corning (Nº T 1285-4, 13 x 100 mm). O resíduo seco foi dissolvido em 0,2 ml de NaOH 5 N e autoclavado por 25 minutos. O pH das amostras foi ajustado para 8,5 com 0,2 ml de HCl 5 N e

2 ml de tampão borato 0,5 M, pH 8,5. Foi então adicionado 0,15 ml de fluroescamina 0,03% em acetona. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante usado para medida de fluorescência em espectrofotômetro Aminco-Bowman ajustado para o ponto de excitação a 390 nm e para o ponto de emissão a 475 nm. O método foi padronizado com albumina de soro bovino.

2.4. Determinação da enzima

Fru-P₂ase foi ensaiada usando-se o método espectrofotométrico acoplado de Pontremoli et al. (22). A velocidade de redução de NADP⁺ a 340 nm na presença de excesso de fosfoglicose isomerase e glicose-6-fosfato desidrogenase foi medida de acordo com o esquema 1:

Esquema 1

A mistura de incubação (1 ml) continha tampão trietanolamina 20 mM, dietanolamina 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2 mM, Fru-P₂ 0,1 mM, NADP⁺ 0,2 mM, EDTA 0,1 mM, 2 μ g de fosfoglicose isomerase e 2 μ g de glicose-6-fosfato desidrogenase. A reação é iniciada

com a adição de solução de enzima. Uma unidade de atividade de Fru-P₂ase é definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 µmol de Fru-P₂ por min. a 25°C.

2.5. Determinação de grupo acetila

Grupo acetila foi determinado segundo o método de Word et al. (76) pela clivagem das ligações amídicas do am_inoácido terminal utilizando ácido sulfúrico, e acetílicas utilizando-se ácido sulfúrico. Extrai-se o ácido acético liberado com éter isopropílico e analisa-se por cromatografia a gás. A amostra é colocada em tubo de centrífuga com capacidade de 1,0 ml, submetida à secagem à vácuo sobre P₂O₅ e dissolvida em 10 µl de H₂SO₄ 6 N. O tubo é selado com aplicação de nitrogênio e o seu conteúdo hidrolisado a 105°C por duas horas em banho de óleo de silicone. O tubo que contém o sistema é, então, resfriado e colocado, com auxílio de adaptador, num tubo de centrífuga e então centrifugado a 1.500 x g por 5 - 10 min. com a finalidade de coletar toda a solução no fundo do tubo de hidrólise. A essa solução se adicionam 5 mg de Na₂SO₄ anidro extraíndo-se o ácido acético com 50 µl de éter isopropílico. Para corrigir as perdas durante a hidrólise e extração de ácido acético [C¹⁴] (menos que 50 pmoles) foi adicionado com ácido sulfúrico. Um padrão interno de quantidade conhecida de ácido propiônico foi adicionado ao éter isopropílico. Além do padrão interno mencionado

acima, as seguintes amostras-controle foram utilizadas nos experimentos levados a efeito em todas as fases, incluindo-se a parte referente à hidrólise.

a) Ácido acético e ácido propiônico em H_2SO_4 6 N para avaliar a recuperação de ácido acético em relação ao ácido propiônico;

b) ácido propiônico e acetil-glicina ou trialanina. A recuperação na primeira amostra foi de 80-85%. Na segunda amostra, nenhum pico referente a ácido acético foi verificado. A coluna de cromatografia foi empacotada com HI-EEF-2A sobre "Chromosorb W-AW", 60-80 mesh (Applied Science Laboratories, Inc., University Park, Pa., E.U.A.).

2.6. Detecção de peptídios

2.6.1. Colunas

Peptídios eluídos de colunas foram detectados usando-se fluorescamina, segundo Nakai et al. (77). Alíquotas do material eluído foram submetidas à secagem em tubos de vidro (13 x 100 mm), dissolvidas em 0,2 ml de NaOH 0,5 N e autoclavadas por 25 min. As amostras foram de início neutralizadas com 0,2 ml de solução de HCl 0,5 N e depois adicionadas de 2 ml de tampão borato 0,5 N, pH 8,5 e a seguir de 0,15 ml de fluorescamina em solução a 0,03% em acetona. Medidas de fluorescência foram levadas a efeito em espectrofotômetro Aminco-

-Bowman ajustado no ponto de excitação a 390 nm e no ponto de emissão a 475 nm. As medidas de radioatividade para peptídios que contendo cisteína foram feitas em contador de cintilação Beckman, Modelo L-250, em 10 ml de Aquasol (New England Nuclear Corp., Boston, Mass, E.U.A.).

2.6.2. Papel

2.6.2.1. Fluorescamina

Para a detecção de peptídios utiliza-se fluorescamina (4-fenilspiro(furan-2(3H),1'-ftalan)-3,3'-diona) (78), de acordo com Mendez et al. (79). Verificou-se que este reagente é muito superior à ninidrina, principalmente por sua sensibilidade, podendo ser detectadas aminas primárias com concentrações na faixa de picomol. Após eletroforese ou cromatografia, o papel é submetido à secagem e tratado como se segue: a) aquecido a 55°C por pelo menos 1 hora; b) lavado com acetona; c) mergulhado em solução de trietanolamina a 1% v/v em acetona e deixado secar por 5 min. à temperatura ambiente; d) mergulhado em solução contendo 10 mg de fluorescamina por 100 ml de acetona e deixado secar durante 5 min.; e) lavado com acetona e deixado secar. As manchas fluorescentes foram identificadas com o auxílio da lâmpada ultravioleta (335 nm). Devido à grande sensibilidade da reação, pouco material corado é necessário para localizar o peptídio. Esse fato permite detectar

e eluir um determinado peptídio, mesmo em quantidades muito reduzidas, depois da reação com fluorescamina, para análise de aminoácidos e para análise sequencial.

2.6.2.2. Ninidrina

O método da ninidrina foi usado em alguns casos de coloração de peptídios em papel, especialmente para localizar peptídio N-terminal bloqueado, que produz coloração negativa com ninidrina mas poderia ser visualizado com o método de Cl_2 -amido-iodeto. O papel foi tratado com ninidrina 0,3% em acetona e submetido à revelação à temperatura ambiente.

2.6.2.3. Cl_2 -amido-iodeto

O método de Rydon et al. (80) foi usado segundo Lai et al. (81) para detectar o peptídio N-terminal. Depois de marcar os peptídios positivos com ninidrina, as fitas de papel receberam aplicação de solução comercial de hipoclorito de sódio diluído 3 vezes em água, e foram a seguir deixadas por 20-30 min. em corrente de ar para remover excesso de Cl_2 e, em seguida, receberam aplicação de etanol 95%. As fitas de papel foram deixadas novamente em corrente de ar e finalmente receberam aplicação de solução de amido-iodeto (mistura 1:1 de amido 1% e KI 1% em água). O peptídio amino-terminal bloqueado apresentou resultados negativos mas desenvolveu coloração

azul com aplicação de amido-iodeto por meio de um vaporizador.

2.7. Redução e carboximetilação de resíduos de cisteína

Redução e S-carboximetilação foram levadas a efeito nas condições descritas por Crestfield (82). Proteína liofilizada foi dissolvida em Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 contendo EDTA 0,02 M e cloridrato de guanidina 6 M para obter-se concentração final de 5-10 mg de proteína/ml. Nitrogênio purificado de O_2 foi aplicado por 20 min. ao sistema. Foi adicionado um excesso, em termos de concentração molar de 5 vezes, de DTT sobre os grupos SH de proteína. O recipiente da reação foi protegido da luz por folha de alumínio e nitrogênio purificado de O_2 foi aplicado por 1 hora à temperatura ambiente. Foi adicionado ácido-mono-iodo-acético [C^{14}] (0,5 ci/mol, dissolvido em água e neutralizado com NaOH) também em concentração molar 5 vezes maior do que a dos grupos SH na mistura. A mistura foi deixada 20 min. no escuro à temperatura ambiente, acidificada com ácido fórmico a uma concentração final de 1% e passada em coluna (2,5 x 45 cm) de Sephadex G-25 (fino) equilibrada com ácido fórmico em solução aquosa a 1%. A proteína carboximetilada e livre de contaminação por sais foi então liofilizada.

2.8. Carbamilação de amino-grupos

Carbamilação de amino grupos (α - e ϵ -) foi levada a efeito com cianato de potássio em tampão de acetato de N-etilmorfolina contendo uréia 8 M, segundo Stark (83). Solução tampão de acetato de morfolina foi preparada dissolvendo-se 2 ml de N-etilmorfolina em 2 ml de água e o pH ajustado a 8,0 com ácido acético glacial. Nessa solução, 2,4 g de uréia foram dissolvidas e o volume foi ajustado para 5 ml com água. Em 2,5 ml de tampão uréia-acetato de N-etilmorfolina foram dissolvidas 50 mg de material proteico liofilizado e a solução foi tratada com 250 mg de KCNO. Carbamilação foi levada a efeito durante 12 horas a 50°C. A mistura foi dialisada contra água à temperatura ambiente, por cerca de 12 horas com várias trocas de água e depois liofilizada. A concentração dos reagentes utilizados foi adaptada para reação com 1 mg de material proteico. A extensão da carbamilação foi medida pela determinação da quantidade de homocitrulina e de lisina liberadas após hidrólise com solução de HCl a 5,7 N (83).

2.9. Bloqueio reversível de amino grupos com metil-acetimidato

Acetimidação e desacetimidação foram levadas a efeito de acordo com Hunter e Ludwig (84), conforme descrito por Ronalds (85) e Garnen e Gurd (86). Cloridrato de metilacetimidato

em excesso molar de 200 vezes com relação a α - e ϵ -amino grupos, foi adicionado à solução de 0,5% de proteína em água e o pH ajustado a 10,5 com solução a 40% de NaOH. A reação foi deixada em repouso por 2 horas à temperatura ambiente e o pH mantido constante com a adição de HCl em solução 1 N. A solução foi dialisada contra água destilada a 4°C por 6 horas com várias trocas de água e liofilizada. Os grupos acetimidilícos foram removidos dissolvendo-se a proteína acetimidada em mistura concentrada de amônia-ácido acético (15:1 v/v) em concentração de proteína a 4% e pH aparente de 11,5. Após amonólise por 9 horas a solução foi dialisada contra água por 6 horas com várias trocas de água e liofilizada.

2.10. Digestão proteolítica

2.10.1. Tripsina

Soluções de TPCK-tripsina foram preparadas em HCl 1 mM em concentração de proteína de 10 mg/ml e estocadas a - 80°C por 1 a 3 meses. Digestões foram levadas a efeito em relação de enzima/substrato de 1:50 (w:w) em bicarbonato de amônio 0,2 M, pH 8,5, em concentração de proteína de 10 mg/ml ou de peptídios de 1 μ mol/ml por 4 horas a 37°C. A digestão foi aplicada diretamente à coluna de Sephadex para separação de peptídios ou liofilizada.

2.10.2. Quimotripsina

Digestão de peptídios por quimotripsina foi levada a efeito como descrito acima, para a digestão triptica, com exceção de que o pH foi ajustado para 8,0 com HCl 1 M. A solução de quimotripsina foi preparada em água (10 mg/ml), congelada e usada no período de 1 semana.

2.10.3. Termolisina

Suspensão de termolisina (4 mg/ml) foi preparada em água desionizada e estocada a -20°C por alguns meses. Digestão foi levada a efeito por 4 horas a 37°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, em concentração de substrato de 1 $\mu\text{mol/ml}$ e relação enzima/substrato de 1/50 (w:w).

2.10.4. Subtilisina

Solução de subtilisina foi preparada no dia da experiência em acetato de amônio 0,1 M, pH 6,5. Solução de Fru- P_2 ase foi dialisada em acetato de amônio 0,1 M, pH 6,5 e ajustada à concentração final de 2,5 mg/ml. Digestão foi levada a efeito em relação enzima/substrato de 1:500 (w:w) por 3 horas em temperatura ambiente. A digestão foi interrompida pela adição de 1/20 do volume de solução etanólica (2 mM) de fluoreto de fenil-metil-sulfonila ou pela adição de ácido

fórmico concentrado para concentração final de 1%. A digestão foi também aplicada diretamente a uma coluna de Sephadex ou liofilizada.

2.11. Clivagem com brometo de cianogênio

Proteína S-carboximetilada foi dissolvida em ácido fórmico 70% em concentração de proteína de 10-15 mg/ml e tratada com brometo de cianogênio segundo Gross e Witkop (87), como descrito por Lai (88). Para cada 100 mg de proteína, 40 mg de brometo de cianogênio em 0,2 ml de ácido fórmico 70% foram adicionadas e o sistema deixado no escuro, por 12 horas, à temperatura ambiente. Ao final da reação, a amostra foi diluída com água e o excesso de brometo de cianogênio removido por evaporação. Essa reação é repetida 3 vezes com adição de água e subsequente evaporação. A amostra concentrada foi liofilizada.

2.12. Análise de aminoácidos

Amostras de proteína carboximetilada foram hidrolisadas em solução 5,7 N de ácido clorídrico de ponto de ebulição constante contendo fenol em mistura a 1% (w/v). A hidrólise foi levada a efeito a 105°C por 24, 48 e 72 horas para proteínas e por 18-20 horas para peptídios em tubos obturados a chama e em ambiente isento de fase gasosa. O material

hidrolisado foi então seco por evaporação (Evapomix, Buchler Insts.) e dissolvido em tampão citrato 0,2 M, pH 2,4. Análise foi realizada de acordo com Spackman et al. (89). Foi utilizado um analisador de aminoácidos automático Joel, Modelo 5AH e 6AH, equipado com célula óptica de 6 mm, com sistema automático de estocagem, injeção de amostra e com programador. A sensibilidade de detecção com este instrumento foi de 1 nmol. Quando necessário (após digestão com carboxipeptidase) para discriminar entre Ser, Asn, Gln, não resolvida pelo analisador automático sob as condições referidas, usaram-se as indicações do Manual 120-PM-1, da Spenco Division of Beckman Inst., Inc., Palo Alto, California. Tampões lítio-citrato, lítio 10,3 N e citrato 0,16 N pH 2,8 como 1º tampão e lítio 0,3 N e citrato 0,1 N como 2º tampão, foram usados. A troca de tampões foi realizada após 137 min., quando a temperatura da coluna era de 39°C. Lisina foi medida como lisina livre e homocitrulina quando proteína-carbamila foi hidrolisada em HCl 5,7 N. Lisina é obtida em recuperação de 24% quando homocitrulina livre é hidrolisada em HCl 5,7 N (83). Recuperação de carbamil peptídio-S foi correspondente a lisina livre da ordem de 25-28% quando hidrolisada em HCl 5,7 N, mostrando carbamilação completa de grupo amino-terminal.

Cisteína foi determinada como carboximetilcisteína. O conteúdo de triptofano foi determinado por análise de aminoácidos, estritamente de acordo com o método de Liu e Chang

(90). Amostra de 7 nmoles foi hidrolisada a vácuo, a 105°C, por 24 horas em 1,0 ml de ácido metano-sulfônico 3 M contendo indol 3-(2-aminoetil) 0,2%. Ao final da hidrólise, 2,0 ml de NaOH 1 N foram adicionados e a solução foi transferida quantitativamente para um frasco volumétrico de 5,0 ml, completada para 5,0 ml com água e analisada em analisador de aminoácidos. Indol 3-(2-aminoetil) foi liberado de HCl pelo método de Liu e Chang (90).

2.13. Análise sequencial

2.13.1. Determinação de grupo N-terminal

2.13.1.1. Método do cianato

O aminoácido amino-terminal de Fru-P₂ase foi determinado usando-se o método de cianato de Stark (83), que consiste em carbamilação completa da proteína com KCNO na presença do agente desnaturante. A proteína carbamilada e aquecida em ácido para formar hidantoína correspondente aos resíduos amino-terminais. Assim, as hidantoínas podem ser isoladas, hidrolisadas e o aminoácido correspondente quantificado.

Os reagentes foram ajustados em quantidades suficientes para reação com sistemas contendo 5 mg de Fru-P₂ase, exatamente como foi descrito para carbamilação do grupo amino (ver 2.8). Ciclização para formar hidantoína foi levada a

efeito com sistemas contendo 0,138 μ moles de carbamil-proteína. Para hidrolisar a carbamil-proteína, 1,0 ml de ácido acético 50% e 1,0 ml de HCl 12 N foram adicionados ao sistema e o tubo, a seguir, foi submetido a vácuo e imerso por 1 hora em banho-maria fervente. A solução de hidantoína foi evaporada, dissolvida em 1,0 ml de H₂O e transferida para coluna (10 x 0,9 cm) de Dowex 50-X2, lavada de acordo com o que foi descrito em cromatografia (ver 2.1.1) e equilibrada com água. A eluição do material retido pelo Dowex foi levada a efeito com água, à temperatura ambiente, e a fluxo lento de 100 ml por hora. Frações de hidantoína-aminoácidos foram coletadas e hidrolisadas como foi descrito por Stark (83). Ribonuclease, FDP aldolase de músculo de coelho e ovalbumina foram usados como padrões de proteína.

2.13.1.2. Método do cloreto de dansila

Determinação de aminoácido N-terminal de Fru-P₂ase usando-se o método de cloreto de dansil foi levada a efeito segundo Hartley (91). O dansil-aminoácido foi separado por cromatografia em camada delgada, em folhas de poliamida, pelo método de Woods e Wang (71). Para tanto 22 nmoles de Fru-P₂ase foram dissolvidos em 0,5 ml de bicarbonato de sódio 0,5 M contendo uréia em solução a 8 M. A essa solução, 0,5 ml de solução de cloreto de dansil (20 mg/ml em acetona) foi adicionado e o tubo

selado e incubado a 37°C por 12 horas. A solução foi dialisada contra água, liofilizada a seguir hidrolisada por solução de solução de HCl 5,7 N. O tubo foi selado a vácuo e hidrolisado a 105°C por 17 horas. O hidrolisado foi seco e o resíduo dissolvido em 10 µl de piridina 50% para aplicação em folha de camada delgada de poliamida (2.1.3).

2.13.2. Determinação de grupo carboxi-terminal

2.13.2.1. Carboxipeptidases

Liberação sequencial de aminoácidos por tratamento com carboxipeptidase foi usada para determinar a sequência carboxi-terminal de peptídios. Imediatamente antes do uso, carboxipeptidase A cristalina tratada com DFP foi lavada por 3 vezes para purificá-la de aminoácidos livres de peptídios de baixo peso molecular por suspensão em água desionizada e centrifugação. Os cristais lavados foram então dissolvidos em solução de LiCl 2 M. Carboxipeptidase B, tratada com DFP, obtida como solução aquosa, foi usada diretamente quando a remoção de resíduos de lisina ou arginina se fazia necessária.

O material peptídico (30-60 µmoles obtidos nos tubos cônicos) foi seco por aplicação de corrente de nitrogênio no fundo do tubo (tubo Corning Nº 8140), dissolvido com 50 µl de

tampão acetato-N-etilmorfolina 0,2 N, pH 8,0 e tratado com 2 μ l de carboxipeptidase (A, B ou ambas, 4 μ g/ μ l) à temperatura ambiente. A intervalos específicos, alíquotas contendo 8-10 nmoles de peptídios foram removidas e adicionadas a 1,0 ml de tampão Na-citrato 0,2 M, pH 2,2 e aplicadas diretamente ao analisador de aminoácidos. Experimentos controle foram realizados por análise de uma alíquota de mistura de incubação antes de se adicionar carboxipeptidase e incubando-se proporções comparáveis de todos os componentes na mistura de digestão, omitindo-se o peptídio adicionado.

2.13.3. Degradação de Edman

Peptídios foram degradados sequencialmente da região amino-terminal pelo uso de fenil-isotiocianato (PITC) pelo método de Edman (92-94), segundo modificação descrita por Lai (95). Peptídios (0,1 - 0,5 μ mole) foram secos por aplicação de nitrogênio em tubos de cultura (tubo Corning Nº 6880). 0,2 ml de tampão DMAA (0,5 ml de DMAA, 5 ml de piridina, 2,5 ml de água, e o pH ajustado com CF_3COOH até 9,4) e 10 μ l de PITC foram adicionados a cada tubo, misturados por 10 um jato de N_2 por segundos, tampados e deixados em repouso a 45°C por uma hora, misturando-se ocasionalmente. Outros 10 μ l de PITC foram adicionados e a incubação continuou por mais uma hora e foi liofilizada. Para a degradação, o resíduo foi dissolvido em

aproximadamente 0,5 ml de CF_3COOH , o tubo foi tampado e aquecido a 45°C por 20 min e até esta etapa o conteúdo do tubo foi seco com aplicação de corrente de N_2 . Para a extração, 0,5 ml de água foi adicionado ao resíduo e as 2-anilino-5-tiazolinas extraídas 3 vezes com 2,0 ml de éter etílico. A camada de éter foi seca com aplicação de nitrogênio e as tiazolinas hidrolisadas com 1,0 ml de solução de HCl 5,7 N contendo SnCl_2 a 0,1% por 4 horas a 150°C , de acordo com Mendez e Lai (96). Os aminoácidos regenerados foram analisados em analisador de aminoácidos. Alíquotas da solução aquosa contendo peptídeo residual foram hidrolisadas em HCl 5,7 N a 110°C por 20 horas para análise por diferença.

III. RESULTADOS

1. Efeito da subtilisina sobre as propriedades catalíticas e alostéricas e sobre a estrutura das subunidades da Fru-P₂ase

1.1. Efeito sobre as propriedades catalíticas e alostéricas

Digestão da Fru-P₂ase nativa com subtilisina resultou em aumento da atividade da enzima em seis vezes, a pH 9,2. A atividade ensaiada a pH 7,5 permaneceu inalterada. A pH 7,5, contudo, houve mudança considerável na susceptibilidade da enzima para AMP. A concentração de AMP (0,1 mM) que inibiu a enzima nativa por mais de 90% exerceu efeito relativamente pequeno sobre a enzima tratada com subtilisina (Figura 1), inibindo em cerca de 10 por cento apenas.

1.2. Efeito sobre a estrutura das subunidades

Eletroforese em placa e também em gel, esta do tipo "disc", na presença de SDS, foi levada a efeito com alíquotas retiradas a intervalos variáveis durante digestão da Fru-P₂ase com subtilisina. Os resultados obtidos durante a digestão são mostrados na Figura 2. Uma subunidade mais leve, de peso molecular em torno de 29.000, apareceu e pouco a pouco substituiu

Figura 1 - Modificações nas propriedades catalíticas e regulatórias durante a digestão da frutose-1,6-bisfosfatase com subtilisina. A solução de enzima (19,2 mg em 8,2 ml de solução de acetato de amônio 0,1 M, pH 6,5) foi incubada com 44 µg de subtilisina a 24°C. Aliquotas foram removidas e analisadas para atividade a pH 7,5 e pH 9,2. A susceptibilidade da enzima para inibição pelo AMP foi determinada em sistemas contendo AMP em concentração de 0,1 M.

Figura 2 - Alterações na estrutura das subunidades de fructo-
se-1,6-bisfosfatase durante a digestão com subtilisina. Ali-
quotas (20 µg) foram removidas do sistema antes da adição de
subtilisina e a intervalos durante a digestão. A reação foi
interrompida pela adição de igual volume de solução de HCOOH
a 45% e as amostras foram liofilizadas. Eletroforese em gel
de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio foi levada a
efeito. A amostra inicial continha somente a subunidade de
PM = 36.000, após 3 horas foi quase completamente substituí-
da (>95%) pela subunidade de peso molecular menor (~29.000).
O peptídio-S não era visível nas placas mas pode ser visto na
eletroforese do tipo "disc" (eletroforese com 40 µg).

as subunidades nativas de peso molecular 36.000. A conversão completou-se após 180 min. Um novo peptídeo com peso molecular de cerca de 6.000 podia também ser detectado em eletroforese em gel tipo "disc", mas não em eletroforese em placa. A possível mudança de conformação, contudo, não pareceu afetar a mistura global da enzima com base na mudança de peso molecular da subunidade de 36.000 para 29.000. Na verdade, esperava-se que o peso molecular da enzima modificada fosse reduzido de 144.000 para menos de 120.000 (144.000-24.000). Porém, em experimentos de sedimentação de sacarose em gradiente de densidade (Figura 3) levados a efeito a pH 7,5 ou 9,2, o peso molecular da enzima digerida manteve-se inalterado e idêntico ao da enzima nativa. O mesmo resultado foi obtido a pH 7,5, quando não houve incremento da atividade, e a pH 9,2, quando a atividade aumentou de 6 vezes. Se o peptídeo-S tivesse sido dissociado, a proteína teria aparecido pelo menos em dois tubos adjacentes. É evidente que o fragmento peptídico formado pela ação de subtilisina permaneceu associado com a enzima digerida e a estrutura tetramérica foi preservada.

1.3. Separação do peptídeo-S e da subunidade-S modificada

Quando a enzima tratada com subtilisina foi filtrada em coluna de Sephadex G-75 sob condições não desnaturantes, a proteína apareceu como um pico simétrico na posição ou perto do volume excluído, sem que houvesse indicação da presença

Figura 3 - Centrifugação por gradiente de densidade de sacarose de Fru-P₂ase nativa e digerida. O processo empregado foi descrito por Martin e Ames (97). Aliquotas (0,25 mg) de enzima nativa e de enzima digerida com subtilisina por 3 horas, de acordo com o descrito na Fig. 1, foram cuidadosamente pipetadas na superfície de soluções (13,4 ml) de sacarose em gradiente de 5 a 20 por cento em tampão Tris, 10 mM, pH 7,5 ou em tampão de dietanolamina 20 mM-trietanolamina 20 mM, pH 9,2. As centrifugações foram executadas em ultracentrífuga Beckman Modelo L2-65B, em rotor SW40, por 20 horas, a 40.000 rpm, a 5°C. Frações de 5 gotas obtidas por um orifício produzido no fundo de cada tubo foram analisadas para atividades de Fru-P₂ase e aldolase. Os resultados foram registrados em µmoles de substrato clivados por ml de fração. As frações 1 e 38 foram do fundo e da superfície do gradiente, respectivamente. Fru-P₂ase foi analisada em A e B a pH 7,5 e em C a pH 9,2. Um padrão contendo 0,25 mg de aldolase de músculo de coelho foi misturado a cada amostra antes de aplicá-la às soluções de sacarose. As flechas indicam as posições esperadas para proteínas tendo pesos moleculares correspondentes a 144.000 e 120.000, considerando o peso molecular da aldolase, de 160.000, como padrão. A- Análise realizada antes da digestão; B e C- análise realizada após digestão.

de fragmentos peptídicos (Figura 4). Pode-se mostrar, contudo, que este pico apresentava peptídio-S. Quando as frações contendo o pico foram reunidas, desnaturadas, carboximetiladas e filtradas em coluna de Sephadex G-75, como descrito na Figura 5, um grande pico correspondente às subunidades modificadas, de peso molecular 29.000, e o peptídio-S apareceram nas posições esperadas. Ainda no experimento da Figura 5, o pico III contendo peptídio-S foi responsável por 17,1% da proteína total, conforme determinação da análise com fluorescamina, após hidrólise alcalina (ver Métodos). Considerando-se o peso molecular de 36.000 da subunidade original e a massa de 6.300 daltons para o peptídio-S (calculado a partir da análise de aminoácidos (Tabela II)), pode-se verificar que tal fato representa total recuperação do peptídio-S, que deve ter permanecido completamente associado à proteína em seguida à clivagem da ligação peptídica por subtilisina. Esse resultado foi confirmado por determinação de radioatividade (Figura 5). O pico 3 continha 16,4% da radioatividade total, como seria esperado para um peptídio contendo um dos seis resíduos de cisteína nas subunidades nativas (ver Tabela III).

1.4. Análise de aminoácidos do peptídio-S

A composição em aminoácidos do peptídio-S é mostrada na Tabela II. Possui um total de 60 resíduos de aminoácidos,

Figura 4 - Cromatografia em Sephadex G-75 sob condições não dissociadas de Fru-P₂ase digerida por subtilisina. A amostra (8,9 mg) foi digerida por 3 horas de acordo com o que foi descrito na legenda da Fig. 1. Após a adição de fluoreto de fenilmetilsulfonila, a mistura foi aplicada em uma coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-75, previamente equilibrada, a 2°C, com solução de acetato de amônio 0,1 M, pH 6,5, e eluída com o mesmo tampão a uma velocidade de fluxo de 14 ml/hora. Frações de 3,9 ml foram obtidas e analisadas para proteínas ou para peptídeo com fluorescamina, como foi descrito em Métodos. As frações indicadas pelo traço horizontal foram reunidas e liofilizadas.

Figura 5 - Perfil cromatográfico de Fru-P₂ase digerida por subtilisina em Sephadex G-75 sob condições dissociadas. As frações liofilizadas do experimento da Fig. 4 foram dissolvidas e carboximetiladas como descrito em Métodos. A enzima carboximetilada foi dialisada contra solução de HCOOH a 1%. Depois, a concentração de HCOOH foi elevada para 9% pela adição de solução de HCOOH a 90% e alíquotas foram tomadas para determinação de proteína e de radioatividade. Ao restante da solução (2,7 ml, 7,0 mg) foi adicionada uréia até concentração de 6 M e logo em seguida aplicada a coluna (1,5 x 190 cm) de Sephadex G-75 previamente equilibrada a temperatura ambiente com solução de HCOOH a 9%. Eluição foi procedida em solução de HCOOH a 9%, a uma velocidade de fluxo de 15 ml/hora. Amostras de 3 ml foram coletadas e alíquotas de 0,1 ml analisadas para radioatividade. Outras alíquotas foram analisadas para peptídios em fluorescamina após hidrólise alcalina. As frações marcadas com I, II e III foram reunidas e o conteúdo em proteína e radioatividade de cada pico determinado.

Tabela II - Composição de aminoácidos do peptídio-S isolado após digestão de Fru-P₂ase com subtilisina

Resíduo de aminoácidos	Moles de aminoácidos/mol de peptídio-S*
Lys	3,99 (4)
His	1,00 (1)
Arg	2,95 (3)
Cys (Cm)	0,65 (1)
Asp	3,85 (4)
Thr	6,55 (7)
Ser	2,85 (3)
Glu	4,07 (4)
Pro	0,99 (1)
Gly	5,75 (6)
Ala	8,69 (9)
Val	2,90 (3)
Met	2,85 (3)
Ile	3,85 (4)
Leu	3,97 (4)
Tyr	0,97 (1)
Phe	1,97 (2)
Total	(60)

* Baseado na suposição de que o peptídio contém um resíduo de histidina. Os valores entre parêntesis são arredondados para o valor integral mais próximo.

Tabela III - Composição de aminoácidos de Fru-P₂ase neutra de fígado de coelho*

Aminoácidos	moles/144.000 de proteína
Lys	115,0
His	13,0
Arg	40,0
Cys (Cm)	23,0
Asp	147,0
Thr	71,0
Ser	71,0
Glu	93,0
Pro	60,0
Gly	102,0
Ala	111,0
Val	104,0
Met	35,0
Ile	77,0
Leu	111,0
Tyr	52,0
Phe	47,0

* Dados obtidos de Abrams et al. (36).

incluindo 1 de histidina, 1 de cisteína, 1 de prolina e 1 de tirosina. O peso molecular calculado a partir da análise de aminoácidos foi de 6.300.

2. Localização do peptídio-S na molécula da Fru-P₂ase

2.1. Evidência para o grupo N-terminal bloqueado da Fru-P₂ase

Os resultados experimentais obtidos mostram que a ação proteolítica da subtilisina ocorre na ligação peptídica na altura do sexagésimo resíduo de aminoácidos que poderia ser no caso a partir da extremidade N-terminal ou da C-terminal. Essa verificação foi evidenciada pela eletroforese em gel do tipo "disc" e filtração em Sephadex G-75 após digestão da Fru-P₂ase com subtilisina que revelam a presença de dois polipeptídios, sendo um de peso molecular de 29.000 e outro de peso molecular de 6.300 (peptídio-S). Para mostrar que a atividade da subtilisina envolve a formação de um peptídio que se destaca da extremidade N-terminal e não da C-terminal, o aminoácido N-terminal da Fru-P₂ase e o peptídio-S foram analisados segundo o método de Stark (83) e a técnica do cloreto de dansila (ver Métodos). Os resultados obtidos com ambas as técnicas mostram definitivamente que o resíduo N-terminal da Fru-P₂ase estava bloqueado. Por sua vez, al-dolase de músculo de coelho e ribonuclease, analisadas ao mesmo tempo, produziram os aminoácidos esperados, prolina e lisina, respectivamente. Ainda, Pontremoli et al. (37) obtiveram resultado

negativo para o aminoácido N-terminal da Fru-P₂ase com amino-peptidase M.

2.2. Clivagem com brometo de cianogênio e identificação do peptídeo N-terminal da Fru-P₂ase nativa

O peptídeo resultante da ação de subtilisina (peptí - dio-S, PM = 6.300) e a subunidade modificada (subunidade-S, PM = 29.000) podem ser separados por filtração em Sephadex G-75 (Figura 5). A subunidade-S não contém mais a porção da extremidade N-terminal da molécula nativa. Subsequentemente, a identificação do peptídeo obtido por cisão pelo brometo de cianogênio (derivado da subunidade N-terminal intacta da Fru-P₂ase), foi realizada por comparação dos perfis de filtração em gel de Sephadex das subunidades intacta e modificada (subunidade-S) (Figuras 6 e 7).

As subunidades intactas (Figura 6) produziram quantidade pequena de material agregado, seguida de oito picos bem definidos de peptídeo, quatro dos quais (picos 1, 2, 5 e 7) continham os seis resíduos de carboximetil-cisteína marcada, sendo 3 no pico 1 e 1 nos picos 2, 5 e 7. Clivagem com brometo de cianogênio da subunidade-S (Figura 7) levou a distribuição semelhante a essa exceto que os picos 2 e 6 estavam ausentes e uma faixa de sobreposição apareceu no pico 5 (Figura 7, pico 2').

Figura 6 - Separação de peptídios de BrCN da Fru-P₂ase nativa em Sephadex G-75. Fru-P₂ase foi carboximetilada com ácido mono-iodo [¹⁴C] acético e cindida com BrCN, de acordo com o que foi descrito em Métodos. Após evaporação e liofilização, a mistura de peptídios (9,5 mg) foi dissolvida em 1 ml de solução 0,2 M de NH₄HCO₃, pH 9,0 contendo uréia em concentração de 3 M, e cromatografia em duas colunas dispostas em série (cada uma em 1,5 x 195 cm). O eluente utilizado foi solução 0,2 M de NH₄HCO₃, pH 9,0, e a velocidade de fluxo de 14 ml/hora. Frações de 3,5 ml foram coletadas e alíquotas de 0,2 ml analisadas com fluorescamina. Medidas de radioatividade foram levadas a efeito com alíquotas de 0,2 ml.

Figura 7 - Separação de peptídios de BrCN da subunidade-S em Sephadex G-75. Fru-P₂ase foi primeiro digerida com subtilisina e as subunidades modificadas foram recuperadas por cromatografia em Sephadex G-75 (ver Fig. 5). Cisão com BrCN e cromatografia foram levadas a efeito como foi descrito à pág. 6 com 2,5 mg de proteína ($3,7 \times 10^5$ cpm). Aliquotas de 0,5 ml foram separadas para contagem e de 0,8 ml para análise com fluorescamina.

2.3. Isolamento de peptídeo N-terminal resultante da reação do brometo de cianogênio na Fru-P₂ase nativa

O pico 2 (Figura 6) foi identificado como sendo o peptídeo-BrCN contendo o sítio de clivagem de subtilisina (ver 3.1). As frações 6 e 7 foram reunidas (Figura 6), liofilizadas e cromatografadas em Sephadex G-25, resultando no peptídeo PCN6 (Figura 8), que continha 18 resíduos de aminoácidos, proporcionando a degradação de Edman negativa (Tabela IV, comparar PCN6 e PCN6^b) devido ao bloqueio do resíduo N-terminal.

2.4. Isolamento de peptídeo do N-terminal a partir do peptídeo-S por brometo de cianogênio

Clivagem com brometo de cianogênio das ligações peptídicas contendo as três metioninas (Tabela II) de peptídeo-S, seguida de filtração em gel de Sephadex G-25 (Figura 9) produziu peptídeo-SCN2 que apareceu na mesma posição de PCN6 (ver Figura 8) e com a mesma composição em aminoácidos do peptídeo PCN6 (Tabela IV). Os resultados obtidos confirmam que o peptídeo-S provém da parte N-terminal da subunidade da Fru-P₂ase.

3. Identificação do peptídeo N-terminal da subunidade-S e do sítio de clivagem por subtilisina

Para identificar o ponto de clivagem e para determinar se uma única ou várias ligações peptídicas foram hidrolisadas,

Figura 8 - Purificação do peptídeo N-terminal resultante da cisão da Fru-P₂ase nativa com BrCN. Duas preparações foram procedidas, de acordo com o que foi descrito na legenda da Fig. 6, e as frações 6 e 7 reunidas como foi indicado pelas retas horizontais mostradas na Fig. 6. O material reunido (1,5 mg) foi liofilizado, dissolvido em 2 ml de solução a 30% de CH₃COOH e cromatografado em coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-25 (fino), previamente equilibrado com a mesma solução de CH₃COOH que também foi utilizada como eluente. A velocidade de fluxo foi de 8 ml/hora, obtendo-se fração de 2,0 ml. Aliquotas de 25 μ l e de 0,1 ml foram tomadas para contagem e análise com fluorescamina, respectivamente. As frações indicadas (PCN6) foram reunidas e liofilizadas.

Figura 9 - Isolamento do peptídeo N-terminal do peptídeo-S por brometo de cianogênio. Uma preparação de peptídeo-S (4,2 mg) foi dissolvida em 0,2 ml de solução a 70% de HCOOH e cindida com 4,6 mg de BrCN, à temperatura ambiente por 16 horas. BrCN foi removido por evaporação e a solução liofilizada. A mistura de peptídeos foi dissolvida em 2 ml de solução de CH₃COOH e cromatografada em Sephadex G-25 (fino), de acordo com o que foi descrito na Fig. 8. Aliquotas de 25 ml foram utilizadas para contagem e de 0,1 ml para análise com fluorescamina. As frações indicadas por SCN2 e SCN2B foram reunidas.

Tabela IV - Peptídios da região N-terminal isolados após clivagem de Fru-P₂ase nativa e do peptídio-S de subtilisina com brometo de cianogênio

Resíduo de aminoácido	Peptídio (moles/mol) ^a		
	PCN6	PCN6 ^b	SCN2
Lys	1,04 (1)	0,78	0,97
Arg	1,00 (1)	1,00	1,00
Asp	2,68 (3)	2,79	2,71
Thr	2,83 (3)	2,53	2,75
Ser	0,91 (1)	1,01	0,92
Pro	0,84 (1)	0,92	0,65
Ala	1,89 (2)	2,24	1,84
Val	0,91 (1)	1,14	0,95
Homoserina ^c	1,69 (2)	1,87	1,68
Ile	0,93 (1)	0,86	0,91
Phe	1,85 (2)	1,87	1,87
Total	(18)		

^a Baseado em Arg = 1. Os números entre parêntesis são os valores integrais mais próximos.

^b Análise do peptídio recuperado após a primeira etapa da degradação de Edman; nenhum aminoácido foi detectado após hidrólise do extrato de éter; portanto, tiazolinonas não foram formadas.

^c A soma de homoserina e lactona-homoserina. O peptídio contém dois resíduos de homoseril porque a ligação para treonina não é clivada imediatamente (ver Discussão).

foram procedidos o isolamento dos peptídios carboxi-terminal do peptídio-S e aminoterminal da subunidade-S e de um peptídio sobreposto contendo sítio de clivagem de subtilisina. O esquema para essa análise está ilustrado na Figura 10.

3.1. Isolamento do peptídio sobreposto (PCN2) por brometo de cianogênio

Cada subunidade nativa contém 9 resíduos de metionina (ver Tabela III) três dos quais estão localizados no peptídio-S (Tabela II e Figura 10). Contudo, somente uma das três ligações de metionina poderia ser clivada por tratamento com BrCN (porque as outras duas foram ligadas à treonina, e a ligação metionil-treonina é resistente à clivagem por BrCN ver Discussão e Figura 25). Dessa forma, a subunidade-S deveria estar ausente em somente 2 peptídios de BrCn quando o seu perfil de clivagem é comparado àquele das subunidades intactas (Figuras 6 e 7). Na verdade, dois picos estavam faltando, o 2 e o 6. Uma vez que o pico 6 foi purificado e continha peptídio PCN6, identificado como N-terminal da subunidade nativa, o pico 2 deveria conter o sítio de clivagem pela subtilisina. Outra evidência de que PCN2 é o peptídio sobreposto, contendo sítio de clivagem por subtilisina, proveio do isolamento de dois peptídios trípticos contendo as sequências conhecidas 19-23 (peptídio T3-d) e 43-49 (peptídio T3-C) no peptídio-S (ver peptídios

Figura 10 - Estrutura parcial da molécula de Fru-P₂ase mostrando os pontos de clivagem com subtilisina e BrCN.

trípticos a partir de PCN2). O pico 2 foi purificado por passagem em coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-50 em ácido acético 30%. O primeiro pico a apresentar PCN2 era um peptídeo puro contendo os resíduos 19-78 da cadeia peptídica (Tabela V, ver também Figuras 10 e 26).

3.2. Isolamento do fragmento de BrCN do peptídeo N-terminal da subunidade-S

Comparando as Figuras 6 e 7, é evidente que uma faixa sobreposta apareceu no pico 2' como ombro no pico 5. Para isolar o novo fragmento formado (o N-terminal), a subunidade-S foi tratada com BrCN e os peptídeos separados em Sephadex G-25 (Figura 11). Todos os peptídeos maiores que apareceram juntos no pico A foram eliminados. O pico B continha peptídeos SCN2 e SCN2', que pertenciam à porção N-terminal da subunidade-S (ver Tabela V e Figura 26).

4. Sequência do peptídeo-S

4.1. Procedimento para análise sequencial

A clivagem dos três resíduos de metionina com BrCN resultou num grande número de peptídeos (Figura 9) e os fragmentos foram atribuídos à clivagem incompleta na posição das duas ligações de metionil-treonina (ver Figura 26 e Discussão). Dificuldades foram também encontradas no uso de tripsina, que

Tabela V - Composição em aminoácidos dos peptídios PCN2*, SCN2/SCN2'** e SCN2B***

Aminoácido ^a	PCN2	SCN2/SCN2' ^b	SCN2B
Lys	4,9 (5)	2,0 (2)	
His	0,7 (1)		
Arg	2,0 (2)		1,0 (1)
Cys (Cm)	+ (1)		
Asp	6,5 (5)	3,8 (3,4)	
Thr	4,9 (6)	0,7 (0,4)	0,8 (1)
Ser	3,8 (3)		
Glu	6,0 (5)	1,5 (1)	
Pro			
Gly	7,6 (8)	1,1 (1)	
Ala	6,5 (7)		
Val	5,9 (5)	2,9 (2,4)	0,95 (1)
Met	+ (1)		0,83 (1)
Ile	2,7 (3)		
Leu	6,3 (6)	2,4 (2)	
Tyr	0,6 (1)		
Phe			0,94 (1)
Homoserina	0,4 (1)	0,7 (1)	

* PCN2 é o peptídio obtido por clivagem com BrCN de Fru-P₂ase nativa, sobreposto ao peptídio-S com subunidade-S (ver Figura 10).

** SCN2/SCN2' são peptídios obtidos após clivagem da subunidade-S com BrCN.

*** Peptídio obtido na baixa recuperação após clivagem do peptídio-S com BrCN. Este peptídio foi sobreposto ao peptídio T2 com T4.

^a Os números entre parêntesis são arredondados para valores integrais.

^b Os números entre parêntesis referem-se aos valores calculados considerando-se que a mistura continha 40% de SCN2 e 60% de SCN2'

Figura 11 - Separação em Sephadex G-25 do peptídeo N-terminal obtido pela cisão do BrCN a partir da subunidade-S. Amostra de 34,0 mg de subunidade-S isolada como está descrito no texto, foi dissolvida em solução de ácido fórmico a 70% e tratada com solução de BrCN de acordo com o que está descrito em Métodos. O resíduo liofilizado foi dissolvido em 1 ml de solução de CH_3COOH a 30% e cromatografado em coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-25 (fino) previamente equilibrada com o mesmo solvente. A velocidade de fluxo foi de 12 ml por hora, coletando-se frações de 2 ml. Aliquotas de 25 μl foram tomadas para contagem e de 100 μl para análise com fluorescamina; as frações indicadas por A, B, C, D, E foram reunidas e liofilizadas. O pico B representa o fragmento de BrCN da extremidade amino-terminal da subunidade-S.

resultou em muitos outros peptídios além do que se esperava do conteúdo de 4 de lisina e de 3 de arginina. Esse problema foi resolvido pelo bloqueio de amino grupos tanto com cianato como por agentes bloqueadores reversíveis metilacetilimidados. A hidrólise com tripsina resultou em clivagem completa nas ligações arginílicas. Uma vez que o peptídio-S contém 3 resíduos de arginina, 4 peptídios eram esperados. Por outro lado, a presença no peptídio-S de 1 resíduo de histidina, 1 de cisteína, 1 de prolina e 1 de tirosina proporcionou marcas convenientes para o isolamento e localização de peptídios contendo tais resíduos.

4.2. Digestão triptica do peptídio-S carbamylado

Amostra do peptídio-S ($1\ \mu\text{mol}$) foi dissolvida em 0,3 ml de tampão etil-morfolina (ver Métodos) pH 8,0, contendo uréia 8 M e carbamylado com 30 mg de KCNO, segundo Stark (83). A mistura foi dialisada e liofilizada, dissolvida em NH_4HCO_3 0,2 M, pH 8,5 e digerida com tripsina-TPCK (ver Métodos). A solução foi liofilizada e o resíduo dissolvido em 1 ml de ácido acético 30% e aplicado a uma coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-25 (fino), previamente equilibrada com solução de ácido acético a 30%. A Figura 12 e a Tabela VI mostram a separação e a composição em aminoácidos dos 4 peptídios T1, T2, T3 e T4, como era previsto pela presença de 3 resíduos de arginina no peptídio-S.

Figura 12 - Separação em Sephadex G-25 de peptídeos tripticos do peptídeo-S carboximetilado. Amostra de 1 μ mol de peptídeo-S foi dissolvida em 0,3 ml de tampão de etilmorfolina, pH 8,0, contendo uréia em concentração 8 M e carbamylado com 30 mg de KCNO como foi descrito em Métodos. A mistura foi dialisada e liofilizada, dissolvida em 1 ml de solução 0,2 M de NH_4HCO_3 , pH 8,5, e digerida com 0,12 mg de tripsina tratada com TPCK por 4 horas a 37°C. A solução foi liofilizada e o resíduo dissolvido em 1 ml de solução de CH_3COOH a 30% e aplicada a coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-75 previamente equilibrada com a mesma solução de CH_3COOH que tenha sido usada como eluente. Velocidade de fluxo 11 ml/hora. Frações de 2 ml foram coletadas em alíquotas de 10 μ l utilizadas para contagem e de 50 μ l para análise com fluorescamina. As frações indicadas por T1, T2, T3, T4, foram reunidas e liofilizadas.

Tabela VI - Composição em aminoácidos dos peptídios T1, T2, T3 e T4

Aminoácido	Peptídio-S	moles/mol de peptídio			
		T1	T2	T3	T4
Lys*	3,99	2,0	1,04	0,90	
His	1,00			1,00	
Arg	2,95	1,00	1,00		0,91
Cys (Cm)	0,65	0,7			
Asp	3,85	1,20	3,08		
Thr	6,55	3,9	3,01		
Ser	2,85	2,1	1,04		
Glu	4,07	2,1			2,00
Pro	0,99		1,00		
Gly	5,75	3,3		2,20	1,00
Ala	8,69	3,9	2,06	2,93	
Val	2,90	1,9			0,90
Met	2,85	0,9	1,17		0,95
Ile	3,85	1,0	0,95	1,89	
Leu	3,97	2,9		1,00	
Tyr	0,97			0,79	
Phe	1,97		0,99		0,85
Recuperação	100	73	74	72	78

* Soma de homocitrulina e lisina.

4.3. Disposição dos peptídios T1, T2, T3 e T4 na sequência primária

Alíquota (20 nmoles) dos peptídios tripticos carbamilados foi separada por eletroforese a pH 3,5 (ver Métodos). O papel corado com ninidrina revelou três peptídios. Após marcá-los, o papel foi vaporizado com Cl_2 -amido-iodeto, como descrito em Métodos, aparecendo, então, um quarto peptídio. Os três peptídios positivos para ninidrina foram identificados como sendo T1, T3 e T4. O peptídio T2, entretanto, foi identificado como sendo o N-terminal, já que não foi corado pela ninidrina, mas foi visualizado por Cl_2 -amido-iodeto. A ausência de arginina no peptídio T3 identificou-o como sendo C-terminal.

Esse fato foi confirmado pela digestão com carboxipeptidase A do peptídio-S intacto que resultou na seguinte sequência: Ala>Ile>Gly>Tyr e Leu (ver Tabela VIIA). Tendo em conta que resíduos de tirosina e histidina estavam presentes somente no peptídio-S (ver Tabela II), eles deveriam estar localizados próximo à extremidade C-terminal. A disposição de T4, perto de T2, foi baseada no isolamento do peptídio SCN2B (ver Figura 9 e Tabela V) isolado em baixa recuperação, após clivagem com brometo de cianogênio do peptídio-S que ficou superposto a T1 e T4.

Tabela VII - Análise carboxi-terminal dos peptídios-S isolados da Fru-P₂ase após digestão com quantidades variáveis de subtilisina

Preparação do peptídio ^a	Tempo (min.)	Digestão com carboxipeptidase A ^b					
		His	Aminoácidos liberados				
			Leu	Tyr	Gly	Ile	Ala
		mol/mol do peptídio					
A	15	nd ^c	nd	nd	0,016	0,020	<u>0,036</u>
	45	nd	0,022	0,026	0,026	0,053	<u>0,081</u>
	120	0,040	0,043	0,055	0,089	0,122	<u>0,179</u>
	180	0,14	0,22	0,21	0,22	0,34	<u>0,41</u>
B	15	nd	0,05	<u>0,05</u>	nd	0,06	<u>0,08</u>
	45	nd	0,07	<u>0,07</u>	0,02	0,17	<u>0,19</u>
	110	nd	0,15	<u>0,15</u>	0,09	0,37	<u>0,43</u>
	240	0,51	0,65	<u>0,70</u>	0,55	0,75	<u>0,80</u>

^a No experimento A, solução de Fru-P₂ase (2,3 mg) em 1,0 ml de NH₄Ac, pH 6,5, foi digerida com subtilisina numa relação de 500:1 (w/w) por 2 horas a 23°C. No experimento B, solução de Fru-P₂ase (16 mg) em 2,6 ml do mesmo tampão foi digerida com subtilisina numa relação de 150:1 (w/w) por 3 horas a 23°C.

^b Peptídio-S (102 nmoles da preparação A e 82 nmoles da preparação B) foi liofilizada e dissolvido em 0,5 ml de tampão N-etil morfolina 0,2 M, pH 8,3, e digerido a 23°C com carboxipeptidase A numa relação do peptídio para carboxipeptidase de 50:1 (w/w). Aliquotas foram removidas segundo foi indicado para análise de aminoácidos.

^c nd = não detectável.

A disposição dos peptídios T2, T4 e T3 resultou na localização mostrada na Figura 26 para o peptídio T1 e evidenciando que este proveio da região interna.

4.4. Sequência do peptídio tríptico T2 (peptídio N-terminal)

A marcha sistemática para a obtenção e identificação dos vários peptídios resultantes do tratamento de T2 com a série de enzimas proteolíticas está esquematizada (Esquema 2).

Digestão quimotríptica do peptídio T2 produziu 3 peptídios T2-A1, T2-A2 e T2-B, que foram separados por filtração em gel em Sephadex G-25 e cromatografia em Dowex 50-X2.

T2 foi digerido com quimotripsina, liofilizado e aplicado à coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-25 (fino), em solução a 30% de ácido acético (Figura 13). Dois picos foram separados, T2-A e T2-B. Após eletroforese a pH 3,5, foi evidenciado que o pico T2-A continha dois peptídios, conforme se verificou após vaporização de Cl_2 -amido-iodeto (ver Métodos), mas somente um deles mostrou-se positivo com ninidrina. Esses peptídios foram separados por cromatografia em Dowex 50-X2 da seguinte maneira: as frações liofilizadas do pico T2-A foram reunidas, dissolvidas em 1,0 ml de HCl 0,01 N e aplicadas à coluna (0,9 x 18 cm) de Dowex 50W-X2 (forma H^+), previamente

Esquema 2 - Marcha para a obtenção e identificação de peptídios resultantes do tratamento enzimático de T2 e T3

* Os peptídios indicados nos retângulos foram sequenciados.

** CPA = carboxipeptidase A.

Figura 13 - Separação de peptídios após digestão do peptídio T2 com quimotripsina. As frações liofilizadas contendo o peptídio T2 (ver Fig. 12) foram dissolvidas em 0,4 ml de solução 0,2M de NH_4HCO_3 , pH 8,0, e tratadas com 10 μl de solução de quimotripsina (4 mg/ml) recentemente preparada. Após 3 horas a 37°C , a mistura de reação foi liofilizada, dissolvida em 1,0 ml de solução a 30% de CH_3COOH e cromatografada em Sephadex G-25, como foi descrito na legenda da Fig. 8. Aliquotas de 100 μl foram usadas para análise de fluorescamina.

tratada com HCl 0,5 N e lavada com H₂O até próximo da neutralidade. O peptídeo bloqueado (T2-A1) foi lavado com 70 ml de H₂O. O peptídeo positivo para ninidrina (T2-A2) foi eluído com 70 ml de NH₄OH 1 N e ambas as frações foram reunidas e liofilizadas. O peptídeo T2-A1 foi identificado como sendo N-terminal bloqueado, por não ter sido retido em Dowex 50. Por outro lado, o T2-A1 mostrou-se também negativo à ninidrina em eletroforese de papel mas foi detectado por Cl₂-amido-iodeto.

A composição em aminoácidos dos três peptídeos quimotrípticos é mostrada na Tabela VIII. Verificou-se que o peptídeo T2-B era um dipeptídeo contendo arginina e originou-se da extremidade C-terminal de T₂. Essa informação permitiu concluir pela disposição dos três peptídeos quimotrípticos de T2 (Figura 26).

A fim de identificar os grupos bloqueadores na extremidade N-terminal, o hexapeptídeo T2-A1 foi tratado com carboxipeptidase A (relação 1:1 (w:w)) por 16 horas a 37°C, conforme descrito em Métodos. Análise de uma alíquota revelou fenilalanina como o único aminoácido liberado, que era portanto C-terminal. O pentapeptídeo remanescente, T2-A1-C (Tabela VIII), foi purificado por passagem em coluna de Dowex 50X2. Hidrólise desse pentapeptídeo com HCl 0,03 N a 100°C, por 24 horas, produziu alanina livre e ácido aspártico livre, numa relação de 0,9:1. Outra alíquota (195 nmoles) foi seca em P₂O₅, hidrolisada

Tabela VIII - Análise de aminoácidos dos peptídios T2-A1, T2-A2, T2-B, T2-A1-C e T2-A1-C-H⁺

Aminoácido ^a	T2-A1 ^c	T2-A2 ^c	T2-B ^c	T2-A1-C ^d	T2-A1-C-H ⁺ ^e
	moles/mol de peptídio				
Lys ^b	1,01(1)			1,01(1)	0,99(1)
His					
Arg			1,01(1)		
Cys (Cm)					
Asp	0,96(1)	2,0(2)		1,1(1)	
Thr		1,8(2)	0,86(1)		
Ser		1,0(1)			
Glu					
Pro	1,06(1)			0,94(1)	1,07(1)
Gly					
Ala	2,08(2)			2,0(2)	1,0(1)
Val					
Met		0,6(1)			
Ile		0,78(1)			
Leu					
Tyr					
Phe	1,0(1)				
Recuperação(%) ^f	57	67	62	45	28

^a Os valores entre parêntesis são arredondados para o valor integral mais próximo.

^b Soma de homocitrulina e lisina.

^c Peptídios quimotrípticos obtidos por hidrólise quimitríptica do peptídio T2.

^d Foi isolado após digestão do peptídio T2-A1 com carboxipeptidase A

^e Foi purificado com eletroforese em papel após hidrólise do peptídio T2-A1-C com 0,03 N HCl.

^f Baseada em que peptídio-S = 100%.

com H_2SO_4 6 N e analisada para ácido acético por cromatografia a gás como descrito em Métodos. A recuperação de ácido acético, corrigida para as perdas como indicado em Métodos, foi de 181 nmoles (recuperação de 93%). Os resultados do ácido acético medido por cromatografia a gás são mostrados na Figura 14.

Considerando-se que o peptídeo T2-A1 continha somente um resíduo de ácido aspártico (Tabela VIII), esses resultados mostraram que a estrutura da extremidade N-terminal é Ac-Ala-Asp-. Essa conclusão foi confirmada pelos resultados da hidrólise do peptídeo T2, que produziu 3 equivalentes de ácido aspártico, um de alanina e um de treonina.

O tripeptídeo remanescente (T2-A1-C-H^+) (Tabela VIII), após hidrólise do peptídeo T2-A1-C com HCl 0,03 N, foi isolado por eletroforese em papel a pH 3,5 e submetido a duas etapas da degradação de Edman (Tabela IX, Figura 26). A sequência do peptídeo T2-A2 foi determinada por seis etapas da degradação de Edman (Tabela IX, Figura 26). A sequência e a localização do peptídeo T2-B já era conhecida por sua composição, e uma etapa da degradação de Edman confirmou que ele continha o único resíduo de arginina no peptídeo tríptico T2 (Tabela IX, Figura 26).

Figura 14 - Cromatografia a gás do peptídeo T2-A1-C isolado da extremidade N-terminal da Fru-P₂ase, após hidrólise. A. Controle de ácido acético (45,4 nmoles) mais ácido propiônico (22,6 nmoles) em 10 μ l de éter isopropílico. B. Controle, contendo 22,6 nmoles de ácido propiônico em 10 μ l de éter isopropílico. C. Peptídeo T2-A1-C após hidrólise e extração. Para detalhes ver o texto.

Tabela IX - Análise sequencial dos peptídios isolados a partir do peptídio T2

Degradação de Edman (etapa nº)	Peptídio T2-Al-C-H ⁺ Sequência: Lys-Ala-Pro Análise por diferença			Resíduo identificado	
	Lys	Ala	Pro		
0	0,99	1,00	1,07		
1	<u>0,00</u>	1,0	1,17	Lys	
2	0,00	<u>0,00</u>	1,00	Ala	

Peptídio T2-A2 Sequência: Asp-Thr-Asp-Ile- -Ser-Thr Análise por diferença					
	Asp	Thr	Ser	Met	Ile
0	2,0	1,8	1,05	0,60	0,78
1	<u>1,15</u>	1,96	0,83	0,44	1,00
2	0,99	<u>1,10</u>	0,83	0,78	1,00
3	<u>0,38</u>	1,17	0,83	0,60	1,00
4	0,34	1,00	0,78	0,67	<u>0,29</u>
5	0,33	1,00	<u>0,42</u>	0,72	0,25
6	0,00	<u>0,00</u>	0,00	1,00	0,00

Peptídio T2-B Sequência: Thr-Arg Análise por diferença		
	Thr	Arg
0	0,86	1,0
1	0,00	1,0

4.5. Sequência do peptídeo tríptico T4

A sequência do heptapeptídeo T4 (Tabela VI) foi determinada por 5 etapas da degradação de Edman e digestão com carboxipeptidase B (Tabela X, Figura 26 e Esquema 2).

4.6. Sequência do peptídeo tríptico T1

A marcha sistemática para a obtenção e identificação dos diferentes peptídeos resultantes do tratamento de T1 com série de enzimas proteolíticas está esquematizada (Esquema 3).

Cinco etapas da degradação de Edman levadas a efeito com o peptídeo T1 deram resultados positivos (Tabela XI, Figura 26).

A fim de proceder à análise sequencial do peptídeo T1, 1 μ mole do mesmo foi dissolvido em 1,0 ml de Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, e incubado com termolisina, de acordo com o descrito em Métodos. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético glacial e a seguir aplicado em coluna de Sephadex G-25 resultando em quatro picos (Figura 15), um dos quais (Fração 1) continha o decapeptídeo T1-Th I, junto a aproximadamente 30% de um undecapeptídeo contendo resíduo de leucina carboxi-terminal adicional (Tabela XII). Essa mistura foi então submetida a sete etapas da degradação de Edman e à digestão com carboxipeptidase A (Tabela XIII, Figura 26). Thr e Gln foram analisados por análise de aminoácidos.

Tabela X - Análise sequencial do peptídio T4

Sequência: Phe-Val-Met-Glu- Glu-Gly-Arg								
Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por diferença							Hidrólise anilino - tiazolinona
	Arg	Glu	Gly	Val	Met	Phe	Ser	
0	0,91	2,0	1,0	0,9	0,95	0,85	0,15	
1	1,0	2,0	1,02	1,04	0,70	<u>0,00</u>	0,39	Phe
2	0,9	2,0	1,18	<u>0,00</u>	1,14	0,00	0,29	Val
3	0,9	2,0	1,09	0,00	<u>0,00</u>	0,00	0,12	Met
4	1,0	<u>0,95</u>	1,3	0,00	0,00	0,00	0,2	Glu
5 ^a								Glu

Carboxipeptidase B^b: Arg = 0,7

^a Amostra perdida

^b Peptídio T-4 (55 nmoles) em 60 µl de tampão acetato de N-etilmorfina 0,2 M, pH 8,5 foi digerido a 37°C por 120 min. com 28 µg de carboxipeptidase B.

Esquema 3 - Marcha da identificação dos peptídios resultantes do tratamento de T1 por uma série de enzimas proteolíticas

* Os peptídios indicados nos retângulos foram sequenciados.

Tabela XI - Análise sequencial do peptídeo T1

Sequência: Lys-Ala-Gly-Gly-Thr-Gly-Glu-Met-Thr-Gln-Leu-Leu-Asn-Ser-Leu-Cys-Thr-Ala-Val-Lys-Ala-Ile-Ser-Thr-Ala-Val-Arg													
-Ala-Ile-Ser-Thr-Ala-Val-Arg													
Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença										Hidrólise de anilino-tiazol		
	Lys	Arg	CM-Cys	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Met	Ile	Leu
0	1,7	1,0	0,6	1,2	3,8	1,9	2,0	3,3	4,0	1,6	1,0	1,0	2,8
1	<u>1,0</u>	0,8	0,7	1,1	3,7	1,9	2,0	3,0	3,9	1,6	1,0	1,0	2,7
2	1,2	0,9	0,9	1,2	3,8	1,9	2,0	3,0	<u>2,9</u>	1,6	0,9	1,1	2,6
3	0,9	0,9	0,7	1,1	3,5	1,8	2,0	<u>2,0</u>	2,9	1,4	1,0	1,0	2,6
4	0,9	0,7	0,7	1,2	3,6	1,6	2,0	<u>1,6</u>	2,9	1,4	0,9	1,0	2,8
5	0,9	0,7	0,7	1,1	<u>3,0</u>	1,6	2,0	1,3	2,9	1,4	0,9	1,0	2,6
													Thr

Tabela XII- Composição em aminoácidos dos peptídios Tl-ThI, Tl-ThIII-1, Tl-ThIII-3 e Tl-ThIII-2c

Aminoácido	Peptídio (moles de aminoácido/moles de peptídio)			
	Tl-ThI	Tl-ThIII-1	Tl-ThIII-3	Tl-ThIII-2c
Lys	1,1			1,0
Arg			1,0	
CM-Cys		1,0		
Thr	2,1	0,8		
Glu	2,0			
Gly	3,0			
Ala	1,0	1,0		
Val			1,0	1,0
Met	0,8			
Leu	0,3	0,7		
Recuperação(%) *	46	35	10	19

* Baseada em que peptídio-S = 100%.

Tabela XIII - Análise sequencial do peptídio T1 (peptídio T1-Th1)

Sequência: Lys-Ala-Gly-Gly-Thr-Gly-Glu-Met-Thr-Gln(Leu)

Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença							Hidrólise de anilino- <u>tiazol</u> inona
	Lys	Thr	Glu	Gly	Ala	Met	Leu	
0	1,1	2,1	2,0	3,0	1,0	0,8	0,3	
1	<u>0,0</u>	1,8	2,0	3,0	0,9	1,2	0,2	Lys
2	0,1	1,6	2,0	2,8	<u>0,3</u>	0,9	0,2	Ala
3	0,1	1,8	2,0	<u>2,2</u>	0,2	0,7	0,2	Gly
4 ^a	0,1	1,7	2,0	<u>1,5</u>	0,1	1,0	0,2	Gly ^a
5 ^a	0,0	<u>1,4</u>	2,0	1,5	0,1	0,8	0,2	Thr ^a
6 ^a	0,0	1,2	2,0	1,2	0,0	0,8	0,2	Gly ^a
7 ^a	0,0	1,0	1,2	1,0	0,0	0,7	0,2	Glu ^a

Carboxipeptidase A^b: 10 min: Leu 0,25, Gln 0,86, Thr 0,18
 20 min: Leu 0,25, Gln 0,83, Thr 0,40
 120 min: Leu 0,25, Gln 0,81, Thr 0,97, Met 0,19
 5 h: Leu 0,23, Gln 0,80, Thr 0,90, Met 0,32
 Sequência terminal: Met-Thr-Gln-Leu

^a Os resíduos removidos nessas etapas foram identificados por hidrólise de anilino-tiazolinona. Somente os resíduos indicados foram encontrados no hidrolisado.

^b Ver Métodos para condições de digestão.

Figura 15 - Separação em Sephadex G-25 de peptídios obtidos por ação de termolisina a partir do peptídio triptico T1 carbamila-
do. Um μ mole de peptídio T1 foi dissolvido em 1,0 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 e incubado com 2%, por peso, de termoli-
sina em relação ao peso do peptídio, por quatro horas a 37°C. A
reação foi interrompida pela adição de 0,5 volume de ácido acé-
tico glacial e aplicado a uma coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex
G-25 (fino) previamente equilibrada com solução de CH₃COOH a
30%. As condições para a cromatografia foram as mesmas da
Fig. 8. Aliquotas de 20 μ l foram tomadas para as contagens e
de 50 μ l para análise com fluorescamina. As frações I, II, III
e IV foram reunidas e liofilizadas.

Os peptídios presentes no pico III (Figura 15), incluindo o peptídio radioativo contendo carboximetilcisteína, foram separados por eletroforese de papel a pH 6,5, revelando 3 manchas positivas, duas das quais foram consideradas peptídios puros Tl-Th III-1 e Tl-ThIII-3. A mancha intermediária, número 2, contendo vários peptídios, foi posteriormente separada por cromatografia em Dowex 50-X2, da seguinte maneira: após eletroforese a pH 6,5 do pico III, a mancha nº 2 foi eluída com NH_4OH 1 N e a solução liofilizada. O resíduo foi dissolvido em 1,5 ml de acetato de piridina 0,2 M, pH 3,1 e aplicado à coluna de Dowex 50-X2 (0,9 x 55 cm), equilibrado com o mesmo tampão e eluído conforme descrito na Figura 16. A fração C foi considerada peptídio puro Tl-ThIII-2c (Tabela XII). O peptídio Tl-ThIII-I foi submetido à degradação de Edman (Tabela XIV, Figura 26). O peptídio Tl-ThIII-3 era um dipeptídio contendo valina e arginina, correspondentes aos resíduos 48 e 49. O tripeptídio Tl-ThIII-2C, da coluna de Dowex 50, foi submetido a duas etapas da degradação de Edman (Tabela XIV, Figura 26).

O peptídio Tl foi também digerido com quimotripsina, e o peptídio contendo cisteína isolado por cromatografia em Sephadex G-25 (Figura 17). As frações contendo cisteína carboximetilada foram reunidas e liofilizadas. Eletroforese de alta voltagem em papel a pH 3,5 (ver Métodos) produziu duas

Figura 16 - Isolamento do peptídeo TlThIII-2c por cromatografia em Dowex 50 x 2. A fração do meio (mancha 2) obtida por eletroforese a pH 6,5 foi eluída com solução N de NH_4OH e a solução liofilizada (ver texto). O resíduo foi dissolvido em 1,5 ml de solução 0,2 M de acetato de piridina, pH 3,1, e aplicada a uma coluna de Dowex 50 x 2 (0,9 x 55 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi procedida em 30 ml da mesma solução de acetato de piridina e depois em um gradiente linear de tampão de acetato de piridina de 0,2 M até 2,0 M pH 5,1, em volume total de 500 ml. Velocidade de fluxo, 12 ml/hora em frações coletadas de 2 ml. Aliquotas de 0,5 ml foram tomadas para análise com fluorescamina. As frações A, B e C foram reunidas e liofilizadas.

Figura 17 - Separação em Sephadex G-25 de peptídios obtidos por digestão quimotriptica do peptídio T1. Amostra de T1, 1 μ mol, contendo 2,6 mg foi dissolvida em 0,5 ml de solução 0,2 M de NH_4HCO_3 , pH 8,0 e tratada com quimotripsina (ver Métodos). As indicações para a cromatografia são as mesmas da Fig. 8. Aliquotas de 20 μ l foram tomadas para análise com fluorescamina e também para contagem. As frações indicadas pelo segmento de reta horizontal foram reunidas e liofilizadas.

Tabela XIV - Análise sequencial do peptídio T1

Peptídio T1-ThIII-1									
Sequência: Leu-Cys-Thr-Ala									
Degradação de Edman (etapa nº)		Análise por diferença			Hidrólise de anilino de tiazolinona		Degradação de Edman (etapa nº)		
		Thr	Ala	Cys	Leu		Análise por Diferença		Hidrólise de anilino de tiazolinona
0	0,8	1,0	1,0	1,0	0,7		0	1,0	0,9
1	1,0	1,0	+	0,2	Leu		1	1,0	0,0
2	0,8	1,0	---	0,2	Cys ^a		2	1,0	0,0
3	0,0	1,0	---	0,0	Thr				

^a Identificado por radioatividade.

manchas, uma das quais continha o octapeptídeo radioativo T1-CT-5 (Tabela XV), que foi submetido a 3 etapas de degradação de Edman (Tabela XV, Figura 26).

Para obter os peptídeos trípticos clivados nas ligações lisílicas o agente reversível metil acetimidato foi usado. O peptídeo-S carboximetilado foi acetimidado (ver Métodos) e hidrolisado com tripsina, e os peptídeos isolados por cromatografia em Sephadex G-25 (Figura 18). O maior peptídeo (AT1), que apresentava a mesma composição do peptídeo T1 (Tabela XVI, Figura 12), foi desacetimidado (ver Métodos) e hidrolisado com tripsina. Cromatografia em Sephadex G-25 produziu um heptapeptídeo AT1-T2 (Figura 19) contendo a porção carboxi-terminal do peptídeo AT1 (Tabela XVI). Esse peptídeo foi submetido a 6 etapas da degradação de Edman (Tabela XVI, Figura 26).

As superposições que determinaram a sequência no peptídeo T1 são apresentadas na Figura 26. A presença de arginina no peptídeo AT1-T2 evidencia que esse peptídeo corresponde à extremidade carboxi-terminal de T1.

Para localizar os dois resíduos de leucina nas posições 33 e 34, o peptídeo PCN2-T1-A2, contendo os resíduos 24-34 (Tabela XVII, Figura 26), foi isolado do peptídeo PCN2 com brometo de cianogênio, seguido por digestão com tripsina e quimotripsina e purificação por eletroforese em papel a

Figura 18 - Separação em Sephadex G-25 de peptídeo oriundo de digestão triptica de peptídeo-S acetimidado. Amostra de 0,95 μ mol 6,0 mg de peptídeo-S foi dissolvida e tratada com metilacetimidato e com tripsina (ver Métodos). As condições para cromatografia são as mesmas da Fig. 12. Aliquotas de 10 μ l foram utilizadas para contagem e de 25 μ l para análise com fluorescamina. As frações marcadas com AT1 foram reunidas e liofilizadas.

Figura 19 - Separação em Sephadex G-25 dos peptídeos tripticos da fração deacetimidada, AT1. Fração AT1, (0,9 mg) foi dissolvida em 0,5 ml de solução 0,2 M de NH_4HCO_3 e tratada com tripsina (ver Métodos). As condições para cromatografia foram as mesmas da Fig. 8. Aliquotas de 25 μl foram utilizadas para contagem e de 100 μl para análise com fluorescamina. As frações indicadas por AT1-T2 foram reunidas e liofilizadas.

Tabela XV - Composição de aminoácidos e análise sequencial do peptídio T1-CT-5

Análise de Aminoácidos

Aminoácido moles de aminoácido/moles de peptídio

Lys	0,9
Cys	+
Asp	0,9
Thr	1,1
Ser	1,2
Ala	1,1
Val	1,0
Leu	1,0

Análise Sequencial

Sequência: Asn-Ser-Leu-

Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença								Hidrólise de anilinothiazolinas
	Lys	Cys ^a	Asp	Thr	Ser	Ala	Val	Leu	
0	0,9	+	0,9	1,1	1,2	1,1	1,0	1,0	
1	1,1	+	<u>0,4</u>	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1	Asp
2	1,1	+	0,2	1,1	<u>0,5</u>	1,1	1,0	0,8	Ser
3	0,8	+	0,2	1,0	0,3	1,0	1,0	0,4	Leu

^a Radioatividade.

Tabela XVI - Análise de aminoácidos de AT1 e AT1-T2 e análise sequencial de AT1-T2

Análise de aminoácidos de AT1 e AT1-T2		
Aminoácidos	AT1 (moles aminoácido/ moles peptídio)	AT1-T2 (moles aminoácido/ moles peptídio)
Lys	1,7	
Arg	1,0	1,0
CM-Cys	0,6	
Asp	1,2	
Thr	3,8	0,9
Ser	1,9	1,8
Glu	2,0	
Gly	3,3	
Ala	4,0	1,8
Val	1,9	0,9
Met	1,0	
Ile	1,0	0,8
Leu	2,8	
Recuperação(%) *	41	23

* Baseado em que peptídio-S = 100%.

continua

Tabela XVI - continuação

Análise sequencial do peptídeo T1

Peptídeo AT1-T2

Sequência: Ala-Ile-Ser-Thr-Ala-Val-Arg

Degradação de Edman (etapa nº)	Arg	Thr	Ser	Ala	Val	Ile	Hidrólise de anilino-tiazol- inona
0	1,0	0,9	0,8	1,8	0,9	0,8	
1	1,0	1,1	0,9	1,2	0,9	1,0	Ala
2	1,0	1,2	1,0	1,2	0,7	0,0	Ile
3	1,0	1,0	0,3	0,9	0,7	0,0	Ser
4	1,0	0,4	0,3	1,0	0,9	0,0	Thr
5	1,0	0,4	0,4	0,5	0,8	0,0	Ala
6	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Val

Tabela XVII - Análise de aminoácidos do peptídeo PCN2-T1-A2

Aminoácido	Peptídeo (moles aminoácido/moles peptídeo)
Thr	1,7
Glu	2,1
Gly	2,6
Ala	1,0
Met	+
Leu	1,7

pH 3,5. Digestão de PCN2-T1-A2 com carboxipeptidase A produziu 2,0 ml de leucina, 0,88 ml de glutamina e 0,83 ml de treonina por mole do peptídeo.

4.7. Sequência do peptídeo triptico T3

O peptídeo T3 (Figura 12 e Tabela VI) foi tratado com quimotripsina e 2 peptídios foram separados por cromatografia em Sephadex G-25, (Figura 20). Esses peptídios, T3-CT1 e T3-CT2 (Tabela XVIII), foram submetidos à degradação de Edman (Tabela XVIII, Figura 26). O peptídeo T3-CT2 foi identificado como o carboxi-terminal do peptídeo T3, já que não contém o resíduo de tirosina, com base nos resultados obtidos pelo tratamento com carboxipeptidase A do peptídeo-S (Tabela VII A).

5. Sequência do peptídeo de superposição

5.1. Peptídios tripticos de PCN2

A marcha seguida para o isolamento dos peptídios resultantes do tratamento de PCN2 estão apresentados no Esquema 4.

O peptídeo de superposição (PCN2) na ordem de 11,2 mg isolado de acordo com a metodologia descrita em 3.1, foi dissolvido em 2,0 ml de NH_4HCO_3 0,2 M, pH 8,5, e tratado com 20 μl de solução de tripsina tratada com TPCK (5 mg/ml).

Esquema 4 - Marcha de identificação dos peptídios resultantes do tratamento de PCN2 por diversos agentes

* Os peptídios colocados em retângulos foram sequenciados

Figura 20 - Separação em Sephadex G-25 de peptídios purificados após digestão quimotriptica da fração T3. Uma alíquota contendo 0,49 μ moles de peptídio T3 foi dissolvida em solução 0,2 M de NH_4HCO_3 , pH 8,0, e digerida com quimotripsina(ver Métodos). As condições para cromatografia são as mesmas da Fig. 8. Alíquotas de 300 μ l foram tomadas para análise em fluorescamina. As frações indicadas como T3-CT1 e T3-CT2 foram reunidas e liofilizadas.

Tabela XVIII - Análise de aminoácidos e análise sequencial dos peptídeos T3-CTL e T2-CT2

Análise de aminoácidos dos peptídeos T3-CTL e T3-CT2		
Aminoácido	T3-CTL	T3-CT2
Lys	1,0	
His	1,0	
Gly	1,0	1,0
Ala	2,1	1,0
Ile	1,0	1,0
Leu	1,0	
Tyr	0,8	
Recuperação (%) *	52	40

* Baseada em que peptídio-S = 100%.

continua

Tabela XVIII - continuação

Análise sequencial dos peptídios T3-CT1 e T2-CT2												
Peptídio T3-CT1							Peptídio T2-CT2					
Sequência: Lys-Ala-Gly-Ile-Ala-His-Leu-Tyr							Sequência: Gly-Ile-Ala					
Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença						Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença			Hidrólise de anilino-tiazol	
	Lys	His	Gly	Ala	Ile	Leu		Gly	Ile	Ala	linona	linona
0	1,0	1,0	1,0	2,1	1,0	1,0	0	1,0	1,0	1,0		
1	0,0	1,0	1,1	1,8	0,8	0,8	1	0,0	1,0	1,0		Gly
2	0,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,1	2	0,0	0,0	1,0		Ile
3	0,0	1,0	0,2	1,0	1,0	1,1						
4	0,0	1,0	0,1	1,0	0,1	1,0						
5	0,0	1,0	0,1	0,7	0,1	1,0						
6	0,0	0,3	0,2	0,3	0,1	1,0						
7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						

^a Amostra perdida.

Após 4 horas a 37°C, a mistura de reação foi acidificada com ácido acético 30% e aplicada à coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-50. Fração T3 (Figura 21) foi purificada por eletroforese, que resultou em peptídios identificados como provenientes de sequências conhecidas 19-23 (peptídio T3-d) e 34-49 (peptídio T3-c) (ver Figura 26, Tabela XIX). Outra purificação das frações T1 e T2 com Dowex 50-X2 (ver Figuras 22 e 23) separou peptídios T1-c, T1-e e T2-d (Tabela XIX).

5.2. Peptídios quimotrípticos de T1-c

Digestão de T1-c com quimotripsina produziu dois peptídios (ver Figura 24), um dos quais, o peptídio T1c-CT2, continha a sequência conhecida 51-57 (ver Figura 26). O maior peptídio T1c-CT1 foi submetido a oito etapas da degradação de Edman (Tabela XX, Figura 26). O peptídio T2-d foi submetido a seis etapas da degradação de Edman (Tabela XX, Figura 26).

6. Sequência dos peptídios amino-terminais produzidos pela cisão da subunidade-S com CNBr

Os peptídios amino-terminais da subunidade-S, SCN2 e SCN2' (Tabela XXI e Esquema 5) isolados conforme foi descrito em 3.2 foram digeridos com tripsina. Cromatografia da digestão triptica com Sephadex G-25 produziu três peptídios puros, SCN2-T1,

Esquema 5 - Marcha sistemática de isolamento e identificação dos peptídios resultantes da subunidade-S tratada com CNBr

* Os peptídios indicados nos retângulos foram sequenciados.

Figura 21 - Separação em Sephadex G-50 dos produtos da digestão triptica do peptídeo PCN2. Aliquota de 1,2 μ mol do peptídeo PCN2 foi dissolvida em 20 ml de solução 0,2 M de NH_4HCO_3 , pH 8,5, e tratada com TPCK-tripsina, como foi descrito em Métodos. Os peptídeos obtidos por digestão foram primeiramente liofilizados e depois dissolvidos em solução de ácido acético a 30% e cromatografados em coluna (1,5 x 195 cm) de Sephadex G-50 previamente equilibrada com solução de ácido 30% que foi também utilizada como eluente. A velocidade de fluxo foi de 10 ml por hora e frações de 2 ml foram coletadas. Aliquotas de 25 μ l foram tomadas para contagem e também para análise com fluorescamina. As frações T1, T2, T3, T4 foram reunidas e liofilizadas.

Figura 22 - Purificação em Dowex 50-2 de peptídios de digestão triptica da fração T1. A fração T1 resultante da cromatografia em Sephadex G-50 (ver Fig. 21) foi dissolvida em 1 ml de solução de piridina-acetato 0,2 M, pH 3,1 e cromatografada em coluna (0,9 x 50 cm) de Dowex 50-2 com um gradiente de piridina-acetato de 0,2 M, pH 3,1 a 2,0 M, pH 5,1, em volume total de 1400 ml. A velocidade de fluxo foi de 12 ml por hora e frações de 2 ml foram coletadas. Aliquotas de 25 μ l foram coletadas para contagens e de 50 μ l para análise com fluorescamina. As frações a₁, a₂, b₁, b₂, c, d, e foram reunidas e liofilizadas.

Figura 23 - Purificação em Dowex 50 x 2 de peptídeos triptícos de fração T2. Fração T2 da cromatografia em Sephadex G-50 (ver Fig. 21) foi liofilizada e dissolvida em 1 ml de solução de piridina-acetato, 0,2 M, pH 3,1, e cromatografada em coluna (0,9 x 50 cm) de Dowex 50 x 2 com gradiente de piridina-acetato de 0,2 M, pH 3,1, a 2,0 M, pH 5,1 em total de 200 ml. A velocidade de fluxo foi de 12 ml por hora e frações de 1,6 ml foram coletadas. Aliquotas de 50 μ l foram tomadas para contagens e de 100 μ l para análise com fluorescamina. As frações do pico foram reunidas e utilizadas para a degradação de Edman.

Figura 24 - Separação em Sephadex G-25 da digestão quimotríptica do peptídeo T1-c. Peptídeo PCN2-T1-c da separação procedida em Dowex 50 x 2 (Fig. 22) foi liofilizado e dissolvido em 0,5 ml de solução 0,2 M de NH_4HCO_3 , pH 8,0. A essa solução adicionou-se 10 μl de solução de quimotripsina (1,5 mg/ml) incubando-se o sistema por 3 horas a 37°C . O material foi então liofilizado, dissolvido em 1,0 ml de solução CH_3COOH a 30% e cromatografado em Sephadex G-25 (1,5 x 195 cm). A velocidade de fluxo foi de 12 ml e frações de 2 ml foram coletadas. Aliquotas de 200 μl foram tomadas para análise com fluorescamina e a fração CT-1 utilizada para degradação de Edman.

Tabela XIX - Análise de aminoácidos dos peptídeos tripticos obtidos PCN2 após cli
vagem com tripsina

Amino- ácidos	Tl-al	Tl-a2	Tl-c	Tl-e	Tlc-CT1	Tlc-CT2	T2-d	T3-c	T3-d
Lyz	2,0(2)	1,0(1)	1,1(1)	1,7(2)	1,2(1)		0,7(1)		1,1(1)
His			1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)			
Arg								1,0(1)	1,0(1)
CM-Cys	+(1)	+(1)							
Asp	1,0(1)	1,3(1)	2,3(2)	2,1(2)	1,9(2)		2,0(2)		
Thr	2,5(3)	2,7(3)	2,0(2)	1,8(2)	1,8(2)			1,0(1)	
Ser	1,1(1)	1,2(1)	1,2(1)	1,4(1)	1,0(1)			1,3(1)	
Glu	2,2(2)	2,5(2)	1,3(1)	1,4(1)	1,1(1)				1,9(2)
Gly	2,9(3)	3,2(3)	4,7(4)	4,6(4)	3,0(3)	1,2(1)			2,1(1)
Ala	1,6(2)	1,8(2)	3,0(3)	3,4(3)	1,3(1)	1,6(2)		1,8(2)	
Val	1,0(1)	0,8(1)	1,8(2)	1,9(2)	1,8(2)		1,2(1)	1,0(1)	
Met	+(1)	+(1)							
Ile			2,0(2)	1,9(2)	1,0(1)	0,9(1)		1,2(1)	
Leu	2,7(3)	2,6(3)	1,1(1)	1,0(1)		1,2(1)	1,8(2)		
Tyr			1,1(1)	0,8(1)		0,8(1)			
Homoserina							0,8(1)		
Recupera- ção (%) *	4	10	23	14	11	15	65	25	9

* Baseado em que peptídeo PCN2 = 100%

Tabela XX - Análise sequencial do peptídeo PCN2

Peptídeo Tlc-CTL				Peptídeo T2-d			
Sequência: Gly-Ile-Ala-Gly-Ser-Thr-Asn-Val				Sequência: Lys-Leu-Asp-Val-Leu-Asp-Met			
Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença Lys Asx Thr Ser Glx Gly Ala Val Ile	Hidrólise de anilino de tiazolinona		Degradação de Edman (etapa nº)	Análise por Diferença Lys Met Asp Ser Val Leu	Hidrólise de anilino de tiazolinona	
0	1,2 1,9 1,8 1,0 1,0 3,0 1,3 1,8 1,0			0	0,7 0,8 2,0 0,6 1,2 1,8		
3 ^a	1,0 1,6 1,8 0,8 1,0 1,9 0,5 1,6 0,3			1	0,2 0,8 2,0 0,7 1,2 1,7	Lys	
4	1,1 1,6 1,8 0,7 1,0 1,5 0,4 1,7 0,2	Gly		2	0,2 0,9 2,0 0,6 1,2 1,3	Leu	
5	1,0 1,6 1,6 0,3 1,0 1,4 0,4 1,7 0,2	Ser		3	0,2 0,8 1,4 0,6 1,1 1,2	Asp	
6	0,9 1,6 1,0 0,2 1,0 1,2 0,2 1,6 0,2	Thr		4	0,1 0,6 1,0 0,5 0,5 1,1	Val	
7	1,0 1,2 1,1 0,2 1,0 1,2 0,2 1,6 0,1	Asn		5	0,1 0,6 1,0 0,4 0,4 0,6	Leu	
8	0,9 1,2 1,1 0,2 1,0 1,2 0,2 1,1 0,1	Val		6	0,0 1,0 0,0 0,0 0,0 0,0	Asp	
						Met	

-104-

^a Nas primeiras três etapas, os aminoácidos foram identificados qualitativamente por dansil-cloro. Essa sequência já havia sido determinada, portanto a análise por diferença foi iniciada após a terceira cisão.

SCN2-T2 e SCN2'-T3 (Figura 25, Tabela XXI). O peptídeo SCN2-T1 foi considerado idêntico ao peptídeo T2-d relativo à composição de aminoácidos (Tabela XIX, Figura 26).

O peptídeo SCN2-T2 era um octapeptídeo contendo um resíduo de lisina, que provavelmente era o carboxi-terminal. Quatro etapas da degradação de Edman, seguidas por hidrólise ácida suave do peptídeo residual produziram a sequência indicada na Tabela XXII, Figura 26. Esse peptídeo, originado da extremidade amino-terminal da subunidade-S, continha os resíduos 64-71 do peptídeo sobreposto PCN2 de brometo de cianogênio.

O peptídeo SCN2'-T3 era um pentapeptídeo que provavelmente continha a sequência carboxi-terminal do peptídeo SCN2-T2. Três etapas da degradação de Edman produziram glicina, ácido aspártico e uma pequena quantidade de ácido glutâmico (Tabela XXII, Figura 26). Degradação de Edman posterior não foi bem sucedida, mas os peptídeos residuais tinham a composição Glu, Val, Lys. É provável que a conversão da extremidade de glutamina para α -oxo prolina seja responsável pela interrupção da degradação de Edman nessa etapa. Os resultados (Figura 26) sugeriram que a subunidade-S era mistura dos dois polipeptídeos, um dos quais continha um tripeptídeo adicional na extremidade N-terminal. Esse fato foi confirmado pelos resultados de uma etapa da degradação de Edman da própria subunidade-S, seguido da hidrólise de anilinothiazolinonas resultantes; subsequente análise de aminoácidos resultou na relação ácido aspártico-glicina de 1/1,5.

Figura 25 - Separação em Sephadex G-25 da digestão triptica de SCN2 e SCN2⁺. A fração B (Fig. 11) contendo o peptídeo N-terminal da subunidade-S foi repurificada por cromatografia na mesma coluna. A fração B purificada (aproximadamente 290 nmoles) foi dissolvida em 0,2 ml de solução 0,2 M de NH₄HCO₃, tratada com tripsina por 4 horas a 37°C, liofilizada, dissolvida em 1 ml de solução a 30% de CH₃COOH e cromatografada como na Fig. 8. Aliquotas de 0,3 ml foram tomadas para análise com fluorescamina. As frações T1, T2 e T3 foram reunidas, liofilizadas e utilizadas para a degradação de Edman.

Figura 26 - Sequência primária dos primeiros 78 aminoácidos da região N-terminal da subunidade de Fru-P₂ase.

——> = Degradação de Edman;

——> = Hidrólise ácida suave;

——> = Carboxipeptidase A ou B.

Figura 26

Tabela XXI - Análise de aminoácidos dos peptídios SCN2, SCN2-T1, SCN2-T2 e SCN2'-T3

Aminoáci- dos ^a	SCN2/ SCN2', ^b	SCN2-T1	SCN2-T2	SCN2'-T3
Lys	2,0(2)	0,8(1)	1,4(1)	1,0(1)
Asp	3,8(3,4)	2,0(2)	2,0(2)	0,8(1)
Thr	0,7(0,4)		1,0(1)	
Glu	1,5(1,0)		1,0(1)	1,0(1)
Gly	1,1(1,0)		1,0(1)	1,2(1)
Val	2,9(2,4)	1,2(1)	1,8(2)	0,8(1)
Leu	2,4(2,0)	1,7(2)		
Homoserina	0,7(1,0)	0,6(1)		
Recupera- ção (%) ^c	72	74	19	29

^a Os números entre parêntesis são arredondados para os valores integrais mais próximos.

^b Os números entre parêntesis referem-se aos valores calculados, considerando que a mistura contém 40% de SCN2 e 60% de SCN2'.

^c O peptídio PCN2 representa 100%.

Tabela XXII - Análise sequencial do peptídio SCN2

Peptídio T2										Peptídio T3									
Sequência: Asn-Val-Thr-Gly-Asx										Sequência: Gly-Asx-Glu									
Degradação de Edman					Análise por Diferenças					Degradação de Edman					Hidrólise de anilino-tiazol				
(etapa nº)	Lys	Asp	Thr	Glu	Gly	Val	Linona			(etapa nº)	Lys	Asp	Glu	Gly	Val	Linona			
0	1,4	2,0	1,0	1,1	1,1	1,1	1,8			0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,1				
1	1,1	1,1	1,0	1,0	0,9	1,5	Asp			1	1,0	0,9	1,0	0,3	0,8	Gly			
2	1,2	1,3	0,7	1,0	0,9	1,3	Val			2	1,0	0,3	1,0	0,0	0,7	Asp			
3	1,0	1,3	0,3	1,0	0,8	1,2	Thr			3						Glu ^b			
4	1,1	1,1	0,0	1,0	0,5	1,0	Gly												
5							Asp ^a												

^a Identificado por hidrólise ácida suave (HCl 0,03 N) do peptídio residual após 4 etapas da degradação de Edman.

^b Recuperação muito baixa de Glu foi obtida nessa etapa, possivelmente em virtude da conversão do resíduo terminal de glutamina para 2-oxoprolina. Degradação de Edman posterior não obtve bons resultados.

7. Heterogeneidade do peptídio-S

Quando a digestão com subtilisina foi levada a efeito sob as condições descritas na Figura 1, isto é, com uma relação de subtilisina para Fru-P₂ase de 1/500, o peptídio-S isolado continha uma única sequência carboxi-terminal como foi revelado pela digestão com carboxipeptidase A (ver Tabela VIIA). Quando se empregou a relação de subtilisina para Fru-P₂ase da ordem de 1/50, verificou-se a presença de aproximadamente 15% de um peptídio com a sequência His-Leu-Tyr (ver Tabela VIIB). Estes resultados sugerem que subtilisina também cinde na ligação peptídica 57-58 (Tyr-Gly), porém menos eficientemente.

8. Estimativa da estrutura secundária

Muitas tentativas de determinação da estrutura secundária de proteínas a partir da sequência dos aminoácidos que a compõem têm sido relatadas por Lewis e Sheraga (98), Wu e Kabat (99) e Nagano (100). Mais recentemente, Chou e Fassman (101, 102) apresentaram um modelo para representar a estrutura secundária de proteínas globulares (α -hélice, "folha β " e na volta B) que aparentemente é mais expressivo do que os modelos previamente propostos. Além disso, o modelo apresentado é simples no sentido de que os cálculos podem ser efetuados sem o uso de computadores. Assim, foram indicados os parâmetros conformacionais das α -hélices (P_{α}) para os 20 aminoácidos, baseando-se na frequência do aparecimento de cada resíduo de

de aminoácido nas diversas conformações de 15 proteínas cuja estrutura era conhecida por cristalografia por raios-X.

Os autores (102) propuseram um mecanismo para o enovelamento de proteínas em região com parâmetros de valores elevados para ($P \alpha$) ou ($P \beta$) tanto na região α ou β , propagando-se em ambas as direções, até que as sequências de aminoácidos, que atuam no sentido de cindir com intensidade as estruturas helicoidais e as folhas β , interrompem o crescimento nas extremidades.

Usando-se os parâmetros $P \alpha$ e $P \beta$, foram formuladas regras empíricas de estimativa dos pontos de início e término das regiões de α -hélice e na folha β de proteínas.

Além disso, Chou e Fassman (102) estabeleceram a frequência das primeira, segunda, terceira e quarta posições das voltas β de 12 proteínas, baseadas na probabilidade de ocorrência de um dado tetrapeptídio. As estimativas das sequências encontradas neste trabalho estão apresentadas nas Figuras 27 e Tabela XXIII.

Tabela XXIII- Estimativa da conformação dos 78 resíduos de aminoácidos na região terminal de Fru-P₂ase de fígado de coelho

Valores estimados *	< P α >	< P β >
1-6c	1,11	0,89
7-11c	0,914	1,042
12-18 β	1,013	1,380
19-28c	1,16	0,88
29-34 α	1,23	1,13
35-36c	0,76	0,69
37-41 β	1,104	1,27
43-51 α	1,106	1,08
53-56 α	1,25	1,13
57-68c	0,827	1,04
69-78	1,18	1,07

α = α -hélice

C = região irregular

β = folha β

* Os números referem-se a sequência.

1	(Ala)	Asp	Lys	Ala	Pro	(Phe)	Asp	(Thr)	Asp	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	H	i	I	H	B	h	i	i	i	i	Ile	Ser	Thr	Thr	Thr	Arg	(Phe)	(Val)	(Met)	(Glu)	(Glu)
	I	i	b	I	b	h	i	h	i	i	H	b	[h]	H	h	i	h	H	[h]	H	B
21	Gly	Arg	Lys	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	(Glu)	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
	B	i	I	H	B	B	i	B	[H]	B	(Met)	Thr	(Gln)	(Leu)	(Leu)	Asn	Ser	(Leu)	Cys	Thr	(Ala)
	i	i	b	I	i	i	h	i	B	H	h	H	h	h	h	b	i	[h]	i	h	I
41	(Val)	Lys	(Ala)	Ile	Ser	Thr	(Ala)	(Val)	Arg	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	h	I	[H]	I	i	i	H	h	i	i	Lys	(Ala)	Gly	Ile	Ala	(His)	(Leu)	Tyr	Gly	Ile	(Ala)
	[H]	b	I	H	b	h	I	H	i	i	I	H	B	[I]	H	h	h	b	B	I	H
61	Gly	Ser	Thr	Asn	(Val)	Thr	Gly	Asx	(Glx)	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78		
	B	i	i	b	h	i	B	b	H	h	H	Lys	Lys	(Leu)	Asp	(Val)	(Leu)	Asp	(Met)		
	i	b	h	b	H	h	i	b	h	h	H	I	I	h	i	H	h	i	h		

Figura 27 - Análise estimativa das regiões helicoidais e "folha" β nos primeiros 78 resíduos de aminoácidos da Fru-P2ase de fígado. A indicação na primeira linha sob cada resíduo de aminoácido refere-se ao potencial helicoidal (α) e da segunda linha ao potencial (β) como definido por Chou e Fassman (102). Os resíduos formadores de hélices estão incluídos em parêntesis, enquanto que os formadores de folha estão grifados. Alguns resíduos são potenciais formadores de hélices e também de folha e nesse caso estão entre parêntesis e também grifados. As regiões helicoidais e as que estão em forma de folhas estão incluídas em colchetes.

IV. DISCUSSÃO

O estudo da estrutura da região amino-terminal da Fru-P₂ase é de primordial interesse porque esta região da cadeia peptídica é sujeita à modificação proteolítica tanto "in vitro" como "in vivo". A Fru-P₂ase tinha sido considerada como enzima com atividade máxima em pH alcalino e com atividade reduzida ou nula em condições de pH ácido ou neutro. Esses fatos têm sido relatados desde o isolamento da enzima de fígado e rim de coelho por Gomori (1). Entretanto, há indicação de que a forma alcalina da enzima é uma forma modificada resultante da ação de enzimas proteolíticas endógenas (17).

Os estudos efetuados no presente trabalho, empregando subtilisina, podem conduzir ao esclarecimento desse problema, tendo em conta que a ação proteolítica da enzima é limitada sob situação controlada.

Nas condições empregadas nos experimentos apresentados, a subtilisina mostrou-se capaz de aumentar 6 vezes a atividade da Fru-P₂ase em pH 9,2, assim como de reduzir a inibição alostérica em pH neutro causada pelo AMP. Esta mudança considerável das propriedades foi correlacionada com o aparecimento de uma subunidade menor (unidade leve, ou unidade 29.000). A conversão se completa após 180 minutos

de ação, conforme se evidencia por eletroforese em poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio. Em eletroforese do tipo "disc" evidencia-se o peptídio-S, de peso molecular 6.300, que se forma por ação da subtilisina resultando em consequência a mudança da subunidade de peso molecular 36.000 para 29.000. Assim, poder-se-ia esperar que o peso molecular da enzima modificada fosse reduzido de 144.000 para valor em torno de 120.000. Entretanto, as experiências em gradiente de sacarose mostram que a enzima digerida apresentou o mesmo peso molecular da forma nativa. Evidentemente, os fragmentos peptídicos formados pela ação da subtilisina permaneceram associados na estrutura tetramérica da enzima, que assim se conserva.

Para demonstrar este fato, a Figura 4 mostra a ausência dos peptídios-S por filtração em gel de Sephadex G-75 em pH neutro. Entretanto, na análise do perfil da enzima alcalina refiltrada em ácido fórmico 9% (Figura 5), o peptídio-S apareceu na posição esperada. Destes resultados, é válida a conclusão de que a mudança das propriedades catalíticas e alostéricas da enzima se deve a uma cisão da cadeia peptídica sem que o peptídio-S se dissociasse da molécula, o que, de fato, mostrou-se não ser condição necessária para causar as modificações nas propriedades de Fru-P₂ase acima mencionadas. (117).

Resultados similares foram relatados por Richards (103) com ribonuclease e por Anfinsen e seus colaboradores (104) empregando nuclease de estafilococo.

Foi observado que após digestão proteolítica apareceram fragmentos peptídicos que se mantinham unidos às moléculas das respectivas enzimas por meio de ligações não covalentes sem que esse fato causasse alteração da atividade catalítica daquelas enzimas.

As experiências aqui relatadas empregando subtilisina apresentam dois aspectos interessantes e inusitados. Um deles é o fato de que a Fru-P₂ase é uma proteína tetramérica em que as subunidades constituintes são maiores que as encontradas em ribonuclease ou nuclease de estafilococo. O segundo fato de relevância é que a atividade catalítica medida a pH 9,2 foi consideravelmente aumentada e ainda a sensibilidade a AMP assim como a inibição alostérica foram praticamente abolidas. As alterações observadas parecem ser devidas à presença de conformação relaxada ou aberta resultante da cisão de regiões específicas da cadeia polipeptídica.

A estrutura primária do peptídio-S assim como os locais de cisão pela ação da subtilisina foram avaliados na presente tese, numa tentativa de estabelecer a função do peptídio-S na regulação alostérica. Intentou-se, também, estabelecer informação quanto o significado da conformação

dos sítios de clivagem atingidos por ação da subtilisina (118,119).

A análise sequencial do peptídio-S por cisão dos resíduos de metionina com brometo de cianogênio resultou em diversos fragmentos peptídicos que podem ser atribuídos à clivagem incompleta em duas ligações metionil-treonina (13-14; 30-31). Há citações (105, 106) de que ligações metionil-treonina e metionil-serina não são facilmente clivadas pelo procedimento mencionado. No presente trabalho, observou-se clivagem em nível bastante baixo (peptídio SCN2B), mas de forma geral o peptídio foi isolado intacto (peptídio SCN2).

Da mesma forma, resultados inesperados foram observados pelo emprego de tripsina, que levou à formação de número maior de peptídios em relação ao esperado, baseado no conteúdo de arginina e lisina. A hidrólise foi incompleta nas ligações lisil após os resíduos 3, 23 e 50; nas ligações arginil após resíduos 22 e 49. A resistência da ligação Asp-Lys-Ala à tripsina é atribuída à presença de carga negativa na cadeia lateral do resíduo de ácido aspártico. Entretanto, pelo bloqueio de amino-grupos com cianato ou metil acetimida, foi possível obter quatro peptídios por hidrólise total das ligações arginil. Por outro lado, a presença de resíduos de histidina, cisteína, prolina e tirosina constituíram-se em marcadores convenientes para localizar a sequência dos peptídios após a cisão do peptídio-S. A Fru-P₂ase de fígado de coelho é

uma proteína dentre as que compõem a série, cada vez maior, de proteínas conhecidas por conter resíduo amino terminal acetilado. As observações de Jornvall (107) efetuadas em 40 cadeias polipeptídicas com grupo amínico acetilado revelam, entre outras propriedades, que a acetilação em serina ou alanina ocorre em cerca de três quartos dos casos estudados. Na Fru-P₂ase o resíduo amino-terminal acetilado foi determinado como sendo alanina. A importância que foi atribuída ao amino-grupo terminal acetilado na iniciação da síntese de proteínas (108) parece não justificar (109, 110) assim como não há indicação da funcionalidade do resíduo acetilado na síntese proteica ou no dobramento da cadeia peptídica.

As proteínas de uma maneira geral são mais sensíveis a enzimas proteolíticas em certas regiões expostas. Algumas proteases extracelulares (aminopeptidases) são específicas para certos resíduos N-terminais.

O efeito protetor da acetilação poderia ser compatível com a ocorrência em proteínas acetiladas de algum resíduo terminal em regiões expostas.

A histidina encontrada na posição 55 provavelmente desempenha papel importante na modificação nas propriedades da enzima em relação ao seu pH ótimo. Na realidade, o resíduo de histidina 55 se encontra próximo do ponto de clivagem de enzima, apenas separado deste por cinco resíduos

(Leu-Lys-Gly-Ileu-Ala) de aminoácidos que a ela se seguem.

Da mesma forma, o resíduo de tirosina da posição 57 e histidina da posição 55 poderiam contribuir para a ligação do AMP. É interessante notar que a mudança na conformação não é seguida por digestão posterior de peptídio-S. Isto sugere a existência de uma interação forte entre o peptídio-S e outras partes da molécula, necessárias para manter a estrutura tridimensional do peptídio.

Em condições experimentais controladas, isto é, relação protease/enzima baixa, a subtilisina catalisa a cisão das ligações peptídicas 60-61 (Ala-Gly) e 63-64 (Thr-Asn) podendo ocorrer, ainda, clivagem adicional na ligação peptídica 66-67 (Thr-Gly). Este procedimento resultou num peptídio-S contendo os 60 primeiros resíduos de aminoácidos. Quando se empregou relação subtilisina/Fru-P₂ase maior, houve cisão da ligação peptídica entre 57-58 (Tyr-Gly), embora esta ligação seja aparentemente mais resistente. Os resultados encontrados estão em concordância com aqueles relatados para ribonuclease (103) tratada em condições tais que hidrolisam resíduos entre 20-21 (Ala-Ser) assim como os dados obtidos com ovalbumina em que a ligação Ala-Ser é cindida.

Riordan e Livingston (111) relataram que a proteólise limitada da carboxipeptidase A por subtilisina com

rompimento de duas ligações peptídicas resultava num aumento de atividade proteolítica. Os sítios de clivagem foram identificados como sendo as ligações peptídicas 154-155 (Ala-Gly) e 157-158 (Ser-Ser) (112). É interessante observar que tanto na carboxipeptidase como na Fru-P₂ase as ligações susceptíveis à subtilisina distam de 3 resíduos. Embora Lee e Riordam (112) tenham verificado que o peptídeo Gly-Ala-Ser permanece ligado à proteína digerida, nossos resultados não demonstraram a formação de uma ligação semelhante com relação ao peptídeo Gly-Ser-Thr (entre 62-63), formado durante a digestão de Fru-P₂ase com subtilisina, e além do fato de que não foi possível isolar tal peptídeo.

A subtilisina mostra preferência para ligação tirosil ou leucil (113) quando se empregam substratos sintéticos. Entretanto, com proteínas nativas parece haver preferência para estruturas não organizadas, sendo mais susceptíveis as regiões contendo serina, treonina, glicina e alanina.

Desde que as evidências experimentais têm mostrado que a conformação da proteína é determinada predominantemente por sua sequência de aminoácidos (114), o mecanismo pelo qual a proteína se dobra na sua configuração característica dotada de atividade biológica tem sido a meta desde há algum tempo.

Alguns aspectos estruturais são importantes na configuração de proteínas particularmente a α -hélice e a fita β .

Enquanto que tais formações possam ocorrer em muitas sequências de aminoácidos, alguns resíduos ou sequências podem facilitar ou inibir a sua formação.

No presente trabalho, a previsão da estrutura secundária baseando-se na estrutura primária foi condizida utilizando o processo descrito por Chow e Fossman (101,102) (Figura 27 e Tabela XXIII) permitindo localizar as regiões α e β .

Pode se observar que as regiões α são compreendidas entre 29-34, 43-51 e 53-56 e a folha β entre 12-18 e 37-41.

Um aspecto que merece ser considerado, no que diz respeito à conformação das subunidades de Fru-P₂ase é o significado da região compreendida pelos resíduos de aminoácidos de 57 a 68.

A conformação dessa região não satisfaz nem à da β -folha e nem tampouco a da α -hélice. Muito provavelmente essa região é dobrada, mas de modo irregular, podendo talvez assumir a forma de uma alça. É justamente esta a porção da molécula susceptível à ação da subtilisina o que, de fato, serve também como um modo indireto de ajuizar de sua forma, já que a subtilisina age sobre regiões da moléculas de proteína nativa que apresentam irregularidades de conformação. Isso permite, então, admitir que a Fru-P₂ase foi programada para agir sob um tipo de controle vinculado à clivagem de ligação peptídica do tipo que pode ser demonstrado com a subtilisina.

Essa observação pode conduzir, então, à conclusão de que a Fru-P₂ase é uma enzima programada para sofrer cisão proteolítica nessa região.

Um possível parâmetro para estudar o mecanismo de regulação de Fru-P₂ase e, ainda, da importância que deve representar a região amino-terminal (de 1 a 78) sequenciada, se encontra (115) em estudos da estrutura da região que funciona na ligação de nicotinamida adenina-dinucleotídeo tem sido verificada em várias enzimas.

Uma região estrutural comum, i.é. um domínio, cuja função é ligar NAD à proteína enzimática, foi localizada na desidrogenase do fosfato, na desidrogenase alcoólica, na gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, na desidrogenase do malato e também na flavodoxina, no processo de ligação do FMN.

Foi demonstrado que a região do domínio do nucleotídeo é constituída por 6 β -folhas paralelas (β A, β B, β C, β D, β E, β F) ligadas por hélices ou alças. Hélices α G ligam folhas β A com β B e hélices α C ligam folhas β B com β C. A sequência β A, α B, β B, α C e β C formam o primeiro fragmento do domínio estrutural para a ligação da adenina do nucleotídeo.

Analisando a precisão da estrutura secundária dos primeiros 78 resíduos de aminoácidos sequenciados na região N-terminal das subunidades de Fru-P₂ase que é mostrado nas

Figuras 27 e 28, com seus respectivos cálculos (Tabela XXIII) é possível estabelecer analogia entre conformação dessa região de Fru-P₂ase com o que se demonstra existir na molécula de diferentes desidrogenases e, também, de flavodoxinas. Fru-P₂ase e essas enzimas apresentam em comum o fato de se ligarem a nucleotídeos. No caso da Fru-P₂ase, o nucleotídeo em questão é o AMP, na realidade seu modulador alostérico.

No caso da região amino terminal de Fru-P₂ase (Figura 28) pode-se prever a existência de duas β -folhas ligadas entre si por duas α -hélices, de modo que, para completar o quadro geral de um possível domínio para ligações da adenina do AMP, resta ainda sequenciar a região que se segue ao resíduo 78 que, muito provavelmente, deve ser uma β -folha já que a análise procedida com os resíduos 69-78 já indicam tratar-se de α -hélice ou β -folha e não uma região irregular.

Assim, a clivagem procedida por subtilisina na região de 57 a 68 deve ocasionar mudança de conformação a ponto de diminuir a capacidade de ligação do AMP com a enzima.

Aliás, em experimentos de Horecker e seus colaboradores (116) foi verificado que protease ligada à membrana de lisossoma de tecido hepático cinde a molécula de Fru-P₂ase alterando a sua estrutura e as suas propriedades catalíticas bem como sua afinidade para AMP, de modo similar ao que ocorre em consequência da ação da subtilisina.

Figura 28 - Representação esquemática das regiões de α -hélice, β -folhas e região irregular previstas para os primeiros 78 aminoácidos da região amino-terminal da Fru-P₂ase.

Deve-se notar que no presente esquema, cada alça de hélice representa um único resíduo de hélice e não uma volta composta de 3,6 resíduos. A região pontilhada representa possível β -folha que se segue à região irregular onde se exerce a ação catalítica da subtilisina.

= região irregular.
= β -folha
= α -hélice

É necessário salientar que a clivagem de Fru-P₂ase com protease de lisossoma, sob condição gliconeogênica, pode representar um papel saliente nos processos de regulação a que esse mecanismo está submetido. Entretanto, até o presente momento não se obteve ainda preparações de Fru-P₂ase obtidas de animais submetidos a condição de glicogênese, que não mostra inibição em presença de AMP.

V. CONCLUSÕES

- 5.1. A Fru-P₂ase é uma enzima alostérica, sujeita a modulação pelo AMP.
- 5.2. A inibição pelo AMP pode ser liberada pelo tratamento da enzima pela subtilisina.
- 5.3. A mudança das propriedades alostéricas em relação à AMP é resultante da clivagem da enzima entre os resíduos 57-58 (Tyr-Gly) 60-61 (Ala-Gly), 63-64 (Thr-Asn) e 66-67 (Thr-Gly).
- 5.4. A porção da molécula susceptível à ação da subtilisina é uma região irregular conforme a estrutura secundária prevista.
- 5.5. Os primeiros 78 aminoácidos da porção aminoterminal da Fru-P₂ase serviram para estimativa da estrutura secundária da região amino-terminal.
- 5.6. A estrutura secundária prevista mostra semelhança estrutural com uma região definida de certas proteínas capazes de se ligar à nucleotídeos.
- 5.7. Dados experimentais demonstraram que as proteínas da membrana como lisossomas hepáticos cinde a molécula de Fru-P₂ase na mesma região de clivagem resultante da ação da subtilisina.

- 5.8. A modificação da sensibilidade da Fru-P₂ase a ação do AMP sugere a importância da Fru-P₂ase na regulação da gliconeogênese.
- 5.9. A análise sequencial efetuada abrangeu 25% dos aminoácidos totais da cadeia polipeptídica.

VI - RESUMO

A Fru-P₂ase, enzima alostérica de significativa importância na gliconeogênese, foi estudada sob os aspectos funcional e estrutural. A digestão da Fru-P₂ase com subtilisina levou a modificações nas propriedades catalíticas e alostéricas da enzima, sendo este fato relacionado diretamente com clivagem da molécula da enzima em sítios específicos. Os primeiros 78 aminoácidos da porção aminoterminal da Fru-P₂ase contendo os sítios de clivagem foram sequenciados. O peptídeo-S resultante da ação proteolítica continua associada com a proteína, permanecendo inalterada a estrutura tetramérica e o peso molecular originais. No entanto, a ação da subtilisina levou a modificações nas propriedades catalíticas e alostéricas da enzima.

A estrutura secundária, prevista a partir da análise sequencial, permite supor a existência de semelhança entre a estrutura secundária da região NH₂-terminal da Fru-P₂ase com a estrutura de enzimas capazes de estabelecer ligações com nucleotídeos.

SUMMARY

Digestion of rabbit liver fructose-1,6-bisphosphatase with subtilisina results in changes in catalytic and allosteric properties of the enzyme. Sequence analysis of the 78 first amino-acid residues of the NH_2 -terminal portion containing the subtilisin cleavage sites shows that four peptide bonds in a limited region of the native molecule are susceptible to subtilisin. The S-peptide remains associated with the protein, and the tetrameric structure as well as the original molecular weight are preserved. Thus, the nicking of the peptide chain by subtilisin causes a conformation change that alters the catalytic and allosteric properties of the enzyme.

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomori, G., J. Biol. Chem., 148, 139-149 (1943).
2. Mokrasch, L.C., Davidson, W.D. & McGilvery, R.W., J. Biol. Chem., 222, 179-184 (1956).
3. McGilvery, R.W., in:Fructose 1,6-Diphosphatase and its Role in Gluconeogenesis (McGilvery, R.W. & Pogell, B.M., eds.). pp. 3-13, American Institute of Biological Science, Washington, D.C.
4. Taketa, K. & Pogell, B.M., Biochi. Biophys. Res. Comm., 12, 229-235 (1963).
5. Newsholme, E.A., Biochem. J., 89, 38P (1963).
6. Mendicino, J. & Vasarhely, F., J. Biol. Chem., 238, 3528-3534 (1963).
7. Atkinson, D., Ann. Rev. Biochem., 35, 85-124 (1966).
8. Fraenkel, D.G. & Horecker, B.L., J. Bacteriol., 90, 837-842 (1965).
9. Hüllsmann, W.C. & Fernandes, J., Pediatric Research, 5, 633-637 (1971).
10. Pogell, B.M. & McGilvery, R.W., J. Biol. Chem., 208, 149-157 (1954).
11. Mokrasch, L.C. & McGilvery, R.W., J. Biol. Chem., 221, 909-917 (1956).
12. Pontremoli, S., Luppis, B., Wood, W.A., Traniello, S. & Horecker, B.L., J. Biol. Chem., 240, 3464-3468 (1965).

13. Racher, E. & Schroeder, E.A.R., Arch. Biochem. Biophys., 74, 326-344 (1958).
14. Rosen, O.M., Rosen, S.M. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 112, 411-420 (1965).
15. Hers, H.G. & Kusaka, T., Biochem. Biophys. Acta, 11, 427-437 (1953).
16. Byrne, W.L., Rjagopalan, G.T., Griffin, L.D., Ellis, E.H., Harris, T.M., Hochachka, P., Reid, L. & Geller, A.M., Arch. Biochem. Biophys., 146, 118-133 (1971).
17. Traniello, S., Pontremoli, S., Tashima, Y. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 146, 161-166 (1971).
18. Carlson, C.W., Baxter, R.C., Ulm, E.H. & Pogell, B.M., J. Biol. Chem., 248, 5555-5561 (1973).
19. Pogell, B.M. & McGilvery, R.W., J. Biol. Chem., 197, 293-302 (1952).
20. Byrne, W.L., in: Fructose-1,6-Diphosphatase and its Role in Gluconeogenesis, R.W. McGilvery & B.M. Pogell, eds., American Institute of Biological Sciences, Washington D.C., 1961, p. 89-100.
21. Nakashima, K. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 146, 153-160 (1971).
22. Pontremoli, S., Traniello, S., Luppis, B. & Wood, W.A., J. Biol. Chem., 240, 3459-3463 (1965).
23. Pogell, B.M., Biochem. Biophys. Res. Communn., 7, 225-230 (1962).

24. Traniello, S., Melloni, E., Pontremoli, S., Sia, C.L. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 149, 222-231 (1972).
25. Nimmo, H.G. & Tipton, K.F., Biochem. J., 145, 323-334 (1975).
26. Chang, Y.K.Y., Thompson, E.O.P. & Zalitis, J., Proc. Aust. Biochem. Soc., 7, 5 Abs. (1974).
27. Traniello, S., Biochem. Biophys. Acta, 341, 129-137 (1974).
28. Tejwani, G.A., Pedrosa, F.O., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 177, 253-264 (1976).
29. Olson, J.P. & Marquardt, R.R., Biochem. Biophys. Acta, 284, 543-467 (1972).
30. Han, P.F., Murthy, V.V. & Johnson, J., Jr., Arch. Biochem. Biophys., 173, 293-300 (1976).
31. Tashima, Y., Thaley, G., Drummond, G., Berttrand, H., Rosenberg, J.S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 149, 118-126 (1972).
32. Marcus, F., Arch. Biochem. Biophys., 122, 393-399 (1967).
33. Sia, C.L., Traniello, S., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 132, 325-330 (1969).
34. Marcus, F., Arch. Biochem. Biophys., 122, 393-399 (1967).
35. Mendicino, J. & Kratowich, N., J. Biol. Chem., 247, 6643-6650 (1972).

36. Abrams, B., Sasaki, T., Datta, A., Melloni, E., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 169, 116-125 (1975).
37. Pontremoli, S., Melloni, E., De Flora, A. & Horecker, B.L., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 661-664 (1973).
38. Rosenberg, J.S., Tashima, Y., Horecker, B.L. & Pontremoli, S., Arch. Biochem. Biophys., 154, 283-291 (1973).
39. Underwood, A.H. & Newsholme, E.A., Biochem. J., 104, 300-305 (1967).
40. Rosen, O.M., Rosen, S.M. & Horecker B.L., Arch. Biochem. Biophys., 112, 411-420 (1965).
41. Geller, A.M., Rajagopalan, G.T., Ellis, E.H. & Byrne, W.L., Arch. Biochem. Biophys., 146, 134-143 (1971).
42. Tejwani, G.A., Pedrosa, F.O., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 2692-2695 (1976).
43. Pogell, B.M., Tanaka, A. & Siddons, R.C., J. Biol. Chem., 243, 1356-1367 (1968).
44. Allen, M.B. & Blair, J.M., Biochem. J., 130, 1167-1169 (1972).
45. Hers, H.G. & Eggermont, E., in: Fructose 1,6-Diphosphatase and its Role in Gluconeogenesis (McGilvery, R.W. & Pogell, B.M., eds.) pp. 4-19, American Institute of Biological Science, Washington, D.C. (1961).
46. Pontremoli, S., Melloni, E., De Flora, A. & Horecker, B.L., Proc. Nat. Acad. Sci., 71, 2166-12168 (1974).

47. Fu, J. & Kemp, R.G., J. Biol. Chem., 248, 1124-1125 (1973).
48. Datta, A.G., Abrams, B., Sassaki, T., Van den Berg, J.W.O., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 165, 641-645 (1974).
49. Pontremoli, S., Luppis, B., Wood, W.A., Traniello, S & Horecker, B.L., J. Biol. Chem., 240, 3464-3468 (1965).
50. Nimmo, H.G. & Tipton, K.F., Eur. J. Biochem., 58, 567-574 (1975).
51. Marquardt, R.R. & Osion, J.P., Can. J. Biochem., 53, 1214-1219 (1975).
52. Rosen, O.M., Arch. Biochem. Biophys., 114, 31-37 (1966).
53. Newsholme, E.A., Crabtree, B., Higgins, S.J., Thornton, S.D. & Start, C., Biochem. J., 128, 89-97 (1972).
54. Taketa, K. & Pogell, B.M., J. Biol. Chem., 240, 651-662 (1965).
55. Underwood, A.H. & Newsholme, E.A., Biochem. J., 95, 767-774 (1965).
56. Nimmo, H.G. & Tipton, K.F., Eur. J. Biochem., 58, 575-585 (1975).
57. Pontremoli, S., Melloni, E., De Flora, A. & Horecker, B.L., Proc. Nat. Acad. Sci., 147, 762-766 (1971).
58. Pontremoli, S., Melloni, E., Balestrero, F., De Flora, A. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 156, 255-260 (1973).

59. Pontremoli, S., Melloni, E., De Flora, A. & Horecker, B.L.,
Arch. Biochem. Biophys., 163, 435-411 (1974).
60. Pontremoli, S., Accorsi, A., Melloni, E., Schiavo, E.,
De Flora, A. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys.,
164, 716-721 (1974).
61. Nakashima, K. & Ogino, K., Japan J. Biochem., 75, 355-365
(1974).
62. Ogino, K. & Nakashima, K., Japan J. Biochem., 75, 723-730
(1974).
63. Pontremoli, S., Mellini, E., Accorsi, A., De Flora, A.,
Salamino, F. & Horecker, B.L., Biochem. Biophys. Res.
Comm., 60, 474-481 (1974).
64. Pontremoli, S., Melloni, E., Balestrero, F., Franzi, A.T.,
De Flora, A. & Horecker, B.L., Proc. Nat. Acad. Sci., 70,
303-305 (1973).
65. Horecker, B.L., Pontremoli, S., Rosen, O. & Rosen, R.,
Fed. Proc., 25, 1521-1528 (1966).
66. Start, C. & Newsholme, E.A., Biochem. J., 107, 411-415
(1968).
67. Start, C. & Newsholme, E.A., FEBS Letters, 6, 171-173
(1970).
68. Salas, M., Vinuela, E., Salas, J. & Sols, A., Biochem.
Biophys. Res. Comm., 17, 150-155 (1964).
69. Krebs, H.A. & Woodford, M., Biochem. J., 94, 436-445
(1965).

70. Schroeder, W.A., Meth. Enzymol XI, p. 351
71. Woods, K.R. & Wang, K.T. Biochim. Biophys. Acta, 133, 369 (1967).
72. Crowshaw, J., Jessup, S.J. & Ranwell, P.W., Biochem. J., 103, 79 (1967).
73. Katz, A.M., Dreyer, W.J. & Anfinsen, C.B., J. Biol. Chem., 234, 2897. (1959).
74. Offord, M.F., Nature, 211, 591 (1966).
75. Laemmli, U.K., Nature, 227, 680 (1970).
76. Ward, D.N., Coffey, J.A., Durwood, B.R. & Lamkin, W.M., Anal. Biochem., 14, 243-252 (1966).
77. Nakai, N., Lai, C.Y. & Horecker, B.L., Anal. Biochem., 58, 563-570 (1974).
78. Undenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leingruber, W. & Weigle, M., Science, 178, 871-872 (1972).
79. Mendez, E. & Lai, C.Y., Anal. Biochem., 65, 281-292 (1975).
80. Rydon, H.N. & Smith, P.W.G., Nature (London), 169, 922-923 (1952).
81. Lai, C.Y., Gussin, A., Smith, J.D. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 150, 38-43.
82. Crestfield, A.M., Moore, S. & Stein, W.H., J. Biol. Chem., 238, 622-627 (1963).

83. Stark, G.R. & Smith, D.G., J. Biol. Chem., 238, 214-226 (1963).
84. Hunter, M.J. & Ludwing, M., J. Am. Chem. Soc., 84, 3491-3504 (1962).
85. Reynolds, J.H., Biochem., 7, 3131-3135 (1968).
86. Garner, W.H. & Gurd, F.R.N., Biochem. Biophys. Res. Comm., 63, 262-268 (1975).
87. Gross, E. & Witkop, B., J. Biol. Chem., 237, 1856-1860 (1962).
88. Lai, C.Y., Arch. Biochem. Biophys., 128, 202-211 (1968).
89. Spackman, D.H., Stein, W.H. & Moore, S., Anal. Chem., 30, 1190-1206 (1958).
90. Liu, T.Y. & Chang, Y.H., J. Biol. Chem., 246, 2842 (1971).
91. Hartley, B.J., Biochem. J., 119, 805-822 (1970).
92. Blombäck, B., Blombäck, M., Edman, P. & Hessel, B., Biochem. Biophys. Acta, 115, 371-396 (1966).
93. Edman, P. & Begg, G., Eur. J. Biochem., 1, 80-91 (1967).
94. Niall, H.D., Keutman, H.T., Capp, D.H. & Potto, J.T., Jr., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 64, 771-778 (1969).
95. Lai, C.Y., Arch. Biochem. Biophys., 166, 330-338 (1975).
96. Mendez, E. & Lai, C.Y., Anal. Biochem., 68, 47-53 (1975).
97. Martin, R.G. & Ames, B.N., J. Biol. Chem., 236, 1372-1379 (1961).
98. Lewis, P.N. & Sheraga, H.A., Arch. Biochem. Biophys., 144-576 (1971).

99. Wu, T.T. & Kabat, E.A., J. Mol. Biol., 75, 13 (1973).
100. Nagano, K., J. Mol. Biol., 75, 401 (1973).
101. Chou, P.Y. & Fassman, G.D., Biochemistry, 13, 211-222 (1974).
102. Chou, P.Y. & Fassman, G.D., Biochemistry, 13, 222-245 (1974).
103. Richards, F.M., Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 162-166 (1958).
104. Anfinsen, C.B., Cuatrecasas, P. & Taninchi, H., in: The Enzyme, Paul D. Boyer, ed., vol. IV, pp. 177-204 (1971).
105. Schroeder, W.A., Shelton, J.B. & Shelton, J.R., Arch. Biochem. Biophys., 130, 551-556 (1969).
106. Langley, T.J. & Smith, E.L., J. Biol. Chem., 246, 3789-3801 (1971).
107. Jornvall, H., J. Theor. Biol., 55, 1-12 (1975).
108. Haselkorn, R. & Rothman-Denes, L.B., A. Rev. Biochem., 42, 397 (1973).
109. Narita, K., Sato, N. & Ogata, K., J. Biochem., Tokyo, 57, 176 (1965).
110. Marchis-Mouren, G. & Lipman; F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 53, 1147 (1965).
111. Riordan, J.F. & Livingston, D.M., Biochem. Biophys. Res. Comm., 44, 695-701 (1971).

112. Lee, H.M. & Riordan, J.F., Fed. Proc., 35, 1706 (1976).
113. Markland, F.S., Jr. & Smith, E.L., in: The Enzyme, Paul D. Boyer, ed., vol. III, pp. 561-608, Academic Press, N.Y. (1971).
114. Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. & White, F.J., Jr., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 47, 1309 (1961).
115. Rossman, M.G., Moras, D. & Oslen, K., Nature, 250, 194-199 (1974).
116. Horecker, B.L. (Comunicação pessoal).
117. Dzugaj, A., Chu, D.L., El-Dorry, H.A. & Horecker, B.L., Biochem. Biophys. Res. Comm., 70, 638-646 (1976).
118. El-Dorry, H.A., Chu, D.K., Dzugaj, A., Tsolas, O., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., 178: 200-207 (1977).
119. El-Dorry, H.A., Chu, K.D., Dzugaj, A., Botelho, L., Pontremoli, S. & Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys., Agos, 1977.