BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

54 942
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

MODIFICAÇÕES NO SÍTIO ATIVO DA TRIPTOFANIL tRNA^{TRP} SINTETASE DE *E.coli*.

SANDRO FERNANDES ATAIDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

T
574.19245
A862m

SÃO PAULO
31 de agosto de 2001

Q. 75

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004449

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ataide, Sandro Fernandes
A862m Modificações no sítio ativo da triptofanil tRNA^{TRP} sintetase de
E.coli. / Sandro Fernandes Ataide. -- São Paulo, 2001.
105p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Farah, Shaker Chuck

1. Proteína : Bioquímica 2. Enzima : Escherichia : Bioquímica
3. Enzima : Atividade : Bioquímica 4. Aminoácido : Bioquímica
I. T. II. Farah, Shaker Chuck, orientador.

574.19245 CDD

“Modificações no Sítio Ativo da Triptofanil tRNA^{TRP} Sintetase de *E. coli*”

SANDRO FERNANDES ATAIDE

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área:
Bioquímica.*

Aprovado por:

Prof. Dr. SHAKER CHUCK FARAH
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. SANDRO ROBERTO MARANA
IQ - USP

Profa. Dra. APARECIDA SADAÉ TANAKA
UFSP

SÃO PAULO
31 DE AGOSTO 2001.

“As coisas em si mesmas
não são boas nem más,
é o pensamento que as torna
desse ou daquele jeito.”
(Hamlet, AtoII, cena II: Hamlet;
William Shakespeare)

Dedico esta dissertação
aos meus pais, Maria Helena e Luiz,
meus irmãos, Carolina e Leonardo,
e à Daniele, por estarem sempre ao meu lado.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte deste trabalho de Mestrado.

Ao Chuck, pela orientação deste projeto e oportunidades que sempre me concedeu.

A todos os integrantes do ChuckLab, que foram verdadeiros amigos e profissionais.

À Adriana, que sempre me forneceu os protocolos e mutio divertimento.

À Aurea, que sempre esteve me motivando a continuar.

À Elaine, que sempre me ouviu e discutiu os assuntos mais complexos, sempre com muita amizade.

Ao Eric, que sempre me mostrou novas perspectivas.

Ao Marcos, pelos protocolos e motivação durante todo o projeto.

Ao Luís, pelos projetos, conversas, discussões e motivação para os planos futuros.

À Cássia, pelas conversas e pelos seqüenciamentos.

À Dona Cleusa, pelo carinho, respeito e os lanches.

À Alessandra, pelas compras e por resolver as pendências.

Ao Ronaldo, que sempre teve idéias malucas, mas sempre me motivou a seguir em frente.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química.

A todos do Genoma, Rosana, Ilda, Izaura, pela paciência e jeitinho em resolver os problemas.

A todos do andar superior do Bloco 0, pelo companheirismo.

A todos os meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, mesmo quando não pude estar ao lado deles.

A todos da minha família por sempre entenderem as minhas ausências e me incentivarem.

À Daniele, que com amor e carinho, sempre me deu suporte para a realização dos meus projetos.

A Deus por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho.

ÍNDICE

Abreviações	3
Resumo	4
Introdução	5
Análogos de Triptofano	5
Aminoacil-tRNA sintetases	8
Triptofanil tRNA ^{Trp} sintetase	12
Objetivos	19
Materias e Métodos	20
Construções dos Plasmídeos	20
Clonagens envolvendo o gene que codifica a TrpRS de <i>E.coli</i>	21
Construção de vetores para co-expressão de TnCF29W (induzível) e TrpRS (constitutivo)	25
Construção de vetores para a expressão de TrpRS de <i>Xanthomonas axonopodis pv citri</i>	27
Preparação de DNA em média escala	29
Expressão das proteínas em meio rico	29
Expressão das proteínas recombinantes em meio mínimo na presença de l-metiltryptofano	30
Purificação das Proteínas	31
-TrpRS de <i>E.coli</i>	31
-TnCF29W	32
-TrpRS de <i>Xanthomonas axonopodis pv citri</i>	33
Fluorescência	34
Dicroísmo Circular	34
Ensaio de Atividade Enzimática	35

-Formação de Triptofano-hidroxamato	35
-Intercâmbio de Pirofosfato	36
Resultados e Discussão	37
Mutações pontuais no sítio ativo da triptofanil-tRNA ^{Trp} sintetase de <i>E.coli</i>	37
Construção de vetores de expressão de mutantes de TrpRS	41
Sequenciamento de DNA	46
Expressão das TrpRS em presença de 1MW	49
Purificação da TrpRS e mutantes	51
Dicroísmo Circular	52
Fluorescência das TrpRS	55
Ensaio de Atividade Enzimática <i>in vitro</i>	57
-Formação de Triptofano-hidroxamato	57
-Intercâmbio de Pirofosfato	60
Expressão da Troponina C (F29W) em meio contendo 1-metiltryptofano	71
Co-expressão da TnCF29W (induzível) e TrpRS (constitutiva)	73
Fluorescência da TnCF29W quando expressa na presença dos mutantes de TrpRS	78
TrpRS de <i>Xanthomonas axonopodis pv citri</i>	82
Ensaio de atividade enzimática da TrpRS de <i>Xanthomonas axonopodis pv citri</i>	86
-Formação de Triptofano-hidroxamato	86
-Intercâmbio de Pirofosfato	87
Comparação de TrpRS e TyrRS de <i>Xanthomonas</i> , <i>Xylella</i> e <i>Pseudomonas</i>	90
Conclusões	94
Bibliografia	98
Curriculum Vitae	105

ABREVIACÕES

1MW – 1-metiltriptofano

1M7NW – 1-metil-7-azatriptofano

5OHW – 5-hidroxitriptofano

7NW – 7-azatriptofano

AARS – aminoacil-tRNA sintetase

AMP – adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

BSA – Soroalbumina bovina

dNTP_{MIX} – mistura de adenina, citosina, guanina, timina

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – ácido etilenobis (oxietilenonitrilo) tetracético

HEPES – ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etanosulfônico)

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

PCR – reação de polimerase em cadeia

PMSF – fluoreto de fenilmetanosulfonato

PPi – pirofosfato inorgânico

SDS – dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio

TnC – troponina C

Tris – tris(hidroximetil) aminometano

tRNA^{Trp} – RNA transportador de triptofano

TrpRS – triptofanil-tRNA^{Trp} sintetase

W - triptofano

RESUMO

As aminoacil-tRNA sintetases catalisam fielmente a ligação do aminoácido ao seu tRNA cognato. A triptofanil-tRNA sintetase (TrpRS) catalisa a ligação de triptofano e alguns análogos de triptofano ao tRNA^{Trp}. 1-metiltryptofano (1MW) e 1-metil-7-azatriptofano (1M7NW) não são reconhecidos pela TrpRS, mas possuem características espectroscópicas convenientes para estudos de fluorescência em complexos multiprotéicos. O objetivo deste trabalho é modificar o sítio ativo da TrpRS de *E.coli*, visando promover a catálise da ligação de 1MW e 1M7NW ao tRNA^{Trp} *in vivo* e permitir a incorporação destes em proteínas recombinantes.

Com base numa análise da estrutura da TrpRS:Trp-AMP de *B. Stearothermophilus*, foram produzidos quatro mutantes de TrpRS de *E. coli*, com substituição do Asp 135 por Ala (D135A), Cys (D135C), Ser (D135S) e Thr (D135T). Estas proteínas foram superexpressas nas condições utilizadas para a incorporação de análogos de Trp. Através de ensaio de fluorescência do 1MW, pôde-se observar uma pequena incorporação deste nas TrpRS mutantes. Construiu-se um novo vetor de expressão no qual os TrpRS mutantes seriam expressos de forma constitutiva e uma segunda proteína, troponina C F29W, seria expressa de forma induzível. No entanto, não se observou incorporação do 1MW nestas proteínas. Ensaio de atividade *in vitro*, de formação de triptofano-hidroxamato e de intercâmbio de pirofosfato da TrpRS e mutantes indicaram uma baixa atividade dos mutantes utilizando triptofano como substrato. Os mutantes D135C e D135S apresentaram um considerável aumento (aproximadamente 24 vezes) na especificidade para 1MW em comparação ao Trp.

A anotação do genoma da *Xanthomonas* indicou que a TrpRS deste organismo possui 88 aminoácidos extras na região C-terminal, o que é incomum para procariotos (somente observado em *Xyllela* e *Pseudomonas*). Clonou-se, expressou-se e purificou-se a TrpRS da *Xanthomonas*, com e sem os 88 aminoácidos extras. Observou-se atividade enzimática em ensaios de formação de triptofano-hidroxamato e intercâmbio de pirofosfato nas quais a TrpRS sem os 88 resíduos C-terminais apresentou uma atividade um pouco menor que a enzima tipo selvagem..

INTRODUÇÃO

ANÁLOGOS DE TRIPTOFANO

A fluorescência é uma ferramenta amplamente utilizada para o estudo de estrutura, enovelamento, dinâmica e interações protéicas em solução. Os detalhes moleculares das proteínas, revelados através da fluorescência, ajudam a entender o ambiente no qual a sonda fluorescente se encontra, e que tem seu sinal afetado de diferentes modos. Grupos próximos à sonda podem interagir através de pontes de hidrogênio, transferência de carga, transferência de prótons, formação de complexos excitados e cruzamento intersistema de estado excitado, fornecendo informações a respeito do ambiente ao redor da sonda. A dinâmica molecular durante o estado excitado da sonda também é importante, pois pode indicar uma reorientação do solvente ou grupos próximos à sonda. A fluorescência é detectável em concentrações de nanomolar a milimolar e sua sensibilidade permite o estudo de proteínas em solução, fazendo a ponte entre as informações estruturais, obtidas por RMN ou difração de raio-X, e funcionais que ocorrem em concentrações *in vivo* (Ross et al, 1997).

Fluoróforos podem ser divididos em dois tipos: extrínsecos e intrínsecos, dependendo da maneira pela qual são incorporadas na proteína. Sondas extrínsecas são ligadas covalente ou não-covalentemente à proteína depois de sua tradução, normalmente depois de sua purificação. Estas sondas são utilizadas devido à facilidade em separar o seu espectro daqueles das sondas intrínsecas. As desvantagens das sondas extrínsecas devem-se às modificações estruturais causadas pela sua introdução e sua ligação, que nem sempre é específica ou ocorre na região de interesse (Eftink, 1991).

Fluoróforos intrínsecos são ligados de forma covalente durante a tradução, permitem a observação do sistema sem ou com um mínimo grau de perturbações químicas. A sonda intrínseca mais utilizada em estudo de proteínas é o triptofano (Trp) que ocorre naturalmente nas suas estruturas primárias. Seu espectro de absorção estende-se a comprimentos de onda maiores que os da tirosina e fenilalanina, permitindo a sua excitação de forma seletiva (Beechem et al., 1985; Eftink, 1991). As desvantagens desta sonda ocorrem quando se deseja estudar interações proteína-proteína e proteína-ácido

nucléico. Por exemplo o espectro de absorção de ácidos nucleicos sobrepõe completamente o do Trp na região utilizada para a sua excitação, agindo como um filtro para sua excitação. Segundo, a maioria das proteínas possui Trp na sua sequência primária, dificultando a interpretação do estudo de interações protéicas quando há mais de um Trp no sistema. Nestes casos, o sinal fluorescente observado é uma mistura de sinais de todos os triptofanos presentes. Em alguns casos este problema pode ser contornado pela substituição de um ou mais dos triptofanos por aminoácidos não fluorescentes, através de mutagênese, mas isto requer que todos os componentes estejam disponíveis nas suas formas recombinantes. Uma outra alternativa é produzir a proteína de interesse em condições nas quais, ao invés do Trp, sejam incorporados análogos de Trp que poderiam ser excitados em comprimentos de onda diferentes (Harris et al., 1990; Hutnik et al., 1991; Ross et al, 1997). Bactérias auxotróficas a Trp são capazes de incorporar alguns análogos deste, como o 5-hidroxitriptofano (5OHW) e o 7-azatriptofano (7NW), em proteínas recombinantes, possibilitando o estudo de interações proteína-proteína e proteína-ácido nucleico através da fluorescência destes análogos (Hogue et al, 1993; Soumillion et al., 1995; Steward et al., 1997; Wong et al., 1998; Farah et al., 1999; Das et al., 1999).

Figura 1: Estruturas do triptofano e seus análogos.

Muitos análogos de Trp já foram sintetizados e caracterizados, desta forma já se conhece suas características fluorescentes (Hogue et al., 1992; Rich et al., 1993; Rich et al., 1995; Smirnov et al., 1997) (Figura 1). Devido às características fluorescentes destes análogos de Trp, que permitem sua excitação seletiva, estes podem ser excitados em comprimentos de onda diferente do Trp (Figura 2). Fatores que influenciam na escolha destes compostos são: as faixas de comprimento de onda de emissão e excitação, os tempos de meia-vida de emissão, o rendimento quântico de fluorescência e a sensibilidade ao ambiente (Ross et al., 1997).

Alguns análogos de Trp podem ser incorporados em proteínas recombinantes por bactérias como o 7NW, 5OHW, 5-metiltryptofano, 2-azatriptofano, 4-, 5- e 6-fluorotryptofanos. Outros análogos, como 5-metoxitryptofano, 1-metiltryptofano (1MW) e 1-metil-7-azatriptofano (1M7NW), não são incorporados por bactérias, o que restringe o seu uso a polipeptídeos sintéticos (Rich et al., 1993; Rich et al., 1995; Ross et al., 1997; Sydor et al., 1999).

Figura 2: Espectro de fluorescência de excitação e emissão para o Trp (W) e seus análogos na concentração de 2 μ M. Os espectros de emissão (linhas pontilhadas) foram gerados através da excitação no comprimento de onda de maior absorção para cada espécie. Os espectros de absorção (linhas contínuas) de cada composto estão representados na mesma cor que os de emissão de fluorescência. Sendo W o triptofano, 7NW o 7-azatriptofano, 5OHW o 5-hidroxitriptofano, 1MW o 1-metiltryptofano e 1M7NW o 1-metil-7-azatriptofano.

A utilização do 1M7NW como sonda óptica intrínseca em proteínas é promissora devido às suas características bem diferenciadas do Trp. As suas principais vantagens são o seu alto rendimento quântico (0,53) e o seu longo tempo de vida de fluorescência (21ns) (Rich et al., 1995; Sydor et al., 1999) e os comprimentos de onda de excitação e emissão que se encontram deslocados para comprimentos de onda maiores que os do Trp (Figura 2). Estas características permitem uma excitação e detecção muito seletivas do 1M7NW, mesmo quando presente em uma mistura de proteínas contendo Trp em grande excesso estequiométrico. Em ensaios de tempo de vida de fluorescência em soluções com misturas de Trp e 1M7NW (75:1), somente foi observado o sinal de fluorescência do 1M7NW (Rich et al., 1995). Até o momento, 1M7NW foi utilizado somente em estudos envolvendo peptídeos sintéticos: um domínio de c-Raf1 que liga Ras (Sydor et al., 1999) e o octapeptídeo SIIN(1M7NW)EKL (Rich et al., 1995).

Devido às suas características de fluorescência diferentes do Trp, este último análogo é muito interessante para estudos de dinâmica, estrutura e interação proteína-proteína. Também torna-se muito atraente o desenvolvimento de sistemas capazes de incorporar os análogos metilados na posição N₁ como 1MW e 1M7NW em proteínas recombinantes. Desta forma, é proposto aqui a manipulação do sistema responsável pela incorporação específica do triptofano em proteínas *in vivo*.

AMINOACIL-tRNA SINTETASES

As aminoacil-tRNA sintetases (AARS) são as enzimas responsáveis em grande parte pela especificidade da tradução do código genético. Cada enzima deve reconhecer o seu tRNA cognato, discriminando-o de todos os outros tRNAs e o seu respectivo aminoácido. Através de uma reação de dois passos e com o consumo de uma molécula de ATP, estas enzimas catalisam a ligação do aminoácido ao tRNA (Figura 3) (Carter, 1993; Doublie et al., 1995; Merle et al., 1986; Ibba et al., 2000).

Figura 3: Esquema da reação catalisada pelas aminoacil-tRNA sintetases.

O primeiro passo corresponde à ativação do aminoácido através da formação do aminoacil-adenilato e liberação de um pirofosfato. O segundo passo é a transferência do aminoácido ativado para a ribose terminal (extremidade 3' ou 2') do tRNA cognato (Hogue et al, 1993; Carter, 1993; Kiselev, 1991).

As aminoacil-tRNA-sintetases podem ser divididas em duas classes de 10 enzimas cada, baseadas nas seqüências conservadas e motivos estruturais. Todos os membros da classe I contêm uma alça com a seqüência de assinatura “KMSKS” (designação de uma letra para a seqüência de aminoácidos que compõem a alça) que interage com o grupo de saída do pirofosfato e uma região de homologia com a seqüência “HIGH” que interage com os anéis da ribose e a adenina (Brick et al, 1988; Fersht 1988; Doublie et al., 1995; Ilyin et al., 2000). A seqüência HIGH se encontra em uma das α -hélices do “Rossmann Fold” ou motivo para a ligação de dinucleotídeos sempre encontrado em AARS da classe I. O “Rossmann Fold” consiste em um motivo estrutural composto de duas seqüências β - α - β , na qual a α -hélice posiciona as folhas- β de forma paralela e a conexão entre estas duas seqüências gera uma estrutura de 4 folhas- β paralelas. Este motivo foi encontrado primeiramente em desidrogenases e caracteriza um sítio de ligação de bases purínicas (Rao et al., 1973; Rossmann et al, 1974).

A classe II das sintetases possui uma topologia totalmente diferente baseada num enovelamento de folhas- β anti-paralelas que compõem o sítio de ligação do nucleotídeo com 3 motivos variáveis. O motivo I ocorre ao redor de uma prolina invariável e possui a seqüência +G(F/Y)xx(V/L/I)xxP $\phi\phi$, sendo + um aminoácido com carga positiva, x um aminoácido qualquer, ϕ um aminoácido hidrofóbico, e entre parênteses estão os aminoácidos que devem ocupar a posição indicada. O motivo II contém uma arginina invariável com a seqüência + $\phi\phi$ x ϕ xxxFRxE. O motivo III também contém uma arginina invariável e apresenta a seqüência ϕ G ϕ G ϕ G ϕ ER $\phi\phi\phi\phi$, sendo este o único motivo

presente em todas as AARS da classe II. O motivo II encontra-se ausente somente na GlyRS (Carter, 1993).

A interação entre o tRNA cognato e a sintetase também é diferente para cada classe de aminoacil tRNA sintetase. A classe I aproxima o braço acceptor do tRNA com a extremidade 3' voltada para o solvente, enquanto que a classe II aproxima a extremidade 3' do braço acceptor voltada para a sintetase (Ibba et al, 2000).

O mecanismo através do qual as AARS obtém a sua especificidade em reconhecer o seu aminoácido cognato ainda se encontra pouco caracterizado, com exceção da tirosinil-tRNA sintetase, que possui o seu mecanismo estudado em detalhes. A ligação de Tyr e ATP promovem o fechamento do sítio ativo e a aproximação do fosfato α do ATP com a carboxila α da Tyr para promover a reação de transesterificação e formação do anidrido misto Tyr-AMP com a liberação de um pirofosfato (Fersht, 1987; de Prat Gay et al., 1993). Estudos cinéticos indicam que a Tyr e o ATP podem ligar a TyrRS em qualquer ordem (Fersht et al., 1987). Por outro lado, na estrutura cristalina da TyrRS (Brick et al., 1989), a ligação do ATP bloqueia o acesso ao sítio de ligação do aminoácido, sugerindo que a Tyr deva se ligar primeiro. Uma explicação para este dilema foi sugerido por Ilyin e colaboradores (2000) que determinaram a estrutura da TrpRS, que é semelhante àquela da TyrRS. Na estrutura (sem os substratos) o acesso aos sítios de Trp e ATP não são bloqueados pelo substrato complementar. Logo, se a estrutura da TyrRS é flexível o suficiente em solução para adotar a conformação observada para TrpRS, a ligação aleatória dos seus substratos pode ser racionalizada.

Os sítios-ativos são muito bem estruturados para ligar o aminoácido correto e o ATP, na posição adequada para que haja a formação do estado de transição da reação de transesterificação. Este mecanismo de reconhecimento do aminoácido e ATP se deve a um ajuste induzido da estrutura terciária da enzima, através das interações dos aminoácidos do sítio ativo com os dois substratos. Estas interações provocam mudanças estruturais em algumas regiões ou em toda a enzima para o correto posicionamento dos reagentes, favorecendo a reação (Cusack, 1997; Ibba et al, 2000).

Usualmente, o mecanismo de reconhecimento e ativação do aminoácido cognato tem sido estudado através da mutação de resíduos provavelmente envolvidos na ligação do aminoácido ou na catálise da reação. Para este tipo de mutação, a identificação dos

aminoácidos envolvidos nas duas reações catalisadas pela enzima (Figura 3) baseiam-se na conservação dos aminoácidos em uma mesma AARS de diferentes organismos e através da estrutura tridimensional da enzima com e sem o complexo do aminoácido-AMP (Sever et al., 1996; Fersht, 1987).

Para o reconhecimento do tRNA específico, a AARS interage com uma ou mais bases diferenciadoras, com o braço acceptor (região 3' terminal) e com o anti-códon. Outras interações importantes foram encontradas de forma específica para cada AARS. A maior parte destes estudos baseia-se na mutação de nucleotídeos do tRNA. Uma vez modificado, testa-se a capacidade de aminoacilação deste tRNA *in vitro* e *in vivo* (Saks et al., 1994; Giege et al., 1998; Fusier-Forsyth et al., 1999).

A taxa de erros na aminoacilação do tRNA através da AARS é na faixa de 1 a cada 10000. O baixo índice de erro das AARS é consequência das diferentes formas de seleção do tRNA e do aminoácido cognatos dentre todos os tRNAs e aminoácidos existentes no interior da célula. A seleção do tRNA é muito mais segura devido ao grande número de diferenças entre os tRNAs e diferentes elementos de reconhecimento utilizados pela AARS. No caso do aminoácido, isto se torna um pouco mais complicado, devido à menor complexidade estrutural das moléculas de aminoácido em relação ao tRNA (Ibba et al., 1999).

Para este tipo de seleção, algumas AARS utilizam um segundo sítio para a edição do tRNA aminoacilado. Um caso exemplar desta edição é o da IleRS, que possui dois sítios de reconhecimento do aminoácido. O primeiro permite a entrada somente de Ile e Val (erroneamente) e é onde ocorre a ativação do aminoácido com ATP e a aminoacilação do tRNA^{Ile}. O segundo sítio só permite a entrada da Val ligada ao tRNA^{Ile}, onde ocorre a edição desta ligação com sua hidrólise (Nureki et al., 1998; Silvian et al., 1999). MetRS, IleRS, LeuRS e LysRS apresentam outra forma de edição através da hidrólise da ligação aminoacil-adenilato, de forma independente do tRNA, que ocorre no sítio ativo da enzima (Ibba et al., 2000).

TRIPTOFANIL tRNA^{Trp} SINTETASE

A triptofanil-tRNA^{Trp} sintetase (TrpRS) é responsável pela catálise da reação de ligação do triptofano ao tRNA^{Trp}. A ação desta enzima ocorre através da ligação do Trp ao sítio ativo da enzima, onde ele reagirá com uma molécula de ATP através de uma reação de transesterificação entre o carboxilato α do triptofano e o fosfato α do ATP, liberando um pirofosfato e gerando, então, o anidrido misto triptofanil-adenilato (Trp-AMP). A este complexo da TrpRS(Trp-AMP), liga-se o tRNA^{Trp} e através de uma reação de transesterificação entre a hidroxila 3' da ribose terminal do tRNA^{Trp} e a carboxila α ativada do Trp através da ligação do AMP, são gerados os produtos Trp-tRNA^{Trp} e AMP (Doublié et al., 1995; Merle et al., 1986)(Figura 4).

Figura 4: Reação realizada pela TrpRS com o Trp, ATP e tRNA^{Trp}.

A TrpRS de *E.coli* é uma enzima que se encontra na forma homodimérica, cada monômero contendo 334 resíduos de aminoácidos, sendo esta a menor aminoacil-tRNA sintetase de *E.coli* (Doublié et al., 1995). A única TrpRS cristalizada foi a de *B.stearothermophilus* com resolução de 2,9Å na sua forma complexada com o Trp-AMP (Doublié et al., 1995) e sem o complexo Trp-AMP (Ilyin et al, 2000). A TrpRS de *E. coli* apresenta uma homologia de 73% com a de *B. stearothermophilus*, o que permite utilizar a estrutura resolvida como modelo. A TrpRS apresenta uma alta homologia estrutural com a tirosinil-tRNA^{Tyr} sintetase (TyrRS), sugerindo que estas devam compartilhar a mesma origem evolutiva (Doublié et al., 1995; Praetorius-Ibba et al., 2000).

A triptofanil tRNA sintetase pertence à classe I das AARS e possui seqüências de consenso conhecidas como regiões de assinatura desta classe (TIGN e KMSKS). A seqüência TIGN se encontra na α -hélice do primeiro motivo β - α - β do Rossmann Fold enquanto a seqüência KMSKS se encontra numa alça (“loop”) móvel logo após o

Rossmann Fold (Carter, 1993; Ilyin et al., 2000) (Figura 5). Com o enovelamento para a formação da estrutura terciária, as duas regiões de assinatura ficam próximas espacialmente, embora estejam distantes na estrutura primária (Figura 5) (Ilyin et al., 2000; Doublé et al., 1995).

Além do domínio central da TrpRS denominado pelo “Rossmann Fold”, que contém o sítio de ligação do nucleotídeo (resíduos de 1 a 200), existe um pequeno lóbulo distal, formado por 4 α -hélices empacotadas e três “loops” de ligação que possuem alta mobilidade (resíduos 207-280). Este domínio é provavelmente responsável pelo reconhecimento do anticódon do tRNA^{Trp} (Doublé et al., 1995; Ilyin et al., 2000). Os últimos 62 resíduos da proteína formam uma α -hélice que vai da extremidade distal até o eixo de interface dimérica (Doublé et al., 1995) (Figura 7).

O anticódon e o G₇₃ do tRNA^{Trp} (Figura 6) são os elementos fundamentais para o seu reconhecimento pela TrpRS de *E. coli* (Himeno et al., 1991; Jahn et al., 1991 e Rould et al., 1989). O reconhecimento do anticódon pela TrpRS contribui para a redução da energia durante a reação de aminoacilação do tRNA^{Trp} (Ibba et al., 1999).

O movimento dos domínios da TrpRS é importante para se compreender o mecanismo enzimático. A estrutura cristalina da TrpRS de *B. stearothermophilus* sem o complexo Trp-AMP (Ilyin et al., 2000) mostra que a estrutura do sítio de ligação do ATP e o sítio de reconhecimento do tRNA^{Trp} se abrem e giram ao redor do “Rossmann Fold” (Figuras 5 e 7). Este movimento permite o livre acesso do triptofano ao sítio ativo, que se mantém compacto e com poucas alterações rotacionais e de ligações (Ilyin et al., 2000; Doublé et al., 1995).

Uma vez ligados, o Trp e o ATP provocam mudanças conformacionais na estrutura da enzima, que confirmam a hipótese do ajuste induzido através das interações destes com as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo. Estas interações provocam o “fechamento” do sítio ativo e proporcionam o correto posicionamento do Trp e do ATP, de forma a favorecer a reação de transesterificação (Ilyin et al., 2000). Na TyrRS, nenhum grupo no sítio ativo participa da catálise nucleofílica ou catálise ácido/base. Aparentemente o sítio inteiro participa na aproximação dos centros reativos (Fersht, 1987). As lisinas da sequência KMSKS são importantes para diminuir a energia de

ativação através de interações específicas com o grupo de saída, pirofosfato, somente no estado de transição (Fersht, 1987) (Figura 5).

Figura 5: Esquema da TrpRS de *B. stearothermophilus* com e sem o triptofano e o ATP (A=adenina, R=ribose, P=fosfato) (Ilyin et al., 2000). A região oval cinza corresponde ao centro catalítico do “Rossmann Fold”, sendo a região do “loop” KMSKS em cinza da enzima com o ATP e Trp, em preto corresponde à enzima sem os ligantes. A α -hélice que contém a sequência TIGN em rosa corresponde à enzima com os ligantes e, em vermelho, sem os ligantes. A região oval em verde corresponde à região de reconhecimento do anticódon (Ilyin et al., 2000).

Figura 6: Sequência do tRNA^{Trp} de *E. coli*.

Estas mudanças conformacionais aproximam o lóbulo distal do sítio ativo favorecendo o posicionamento do tRNA^{Trp} para a reação de aminoacilação (Figura 7). A região da interface dimérica entre as duas subunidades também é afetada durante estas mudanças estruturais (Hogue et al., 1996; Xue et al., 1997). A informação da ocupação do sítio ativo de um monômero é transmitida para o outro monômero através destas modificações, uma vez que a enzima atinge a sua velocidade máxima quando apresenta metade dos seus sítios-ativos ocupados (indicando que apenas um dos monômeros pode ser ocupado com o Trp e ATP) (Merle et al., 1986).

Chow e colaboradores (1992) demonstraram que o Trp na posição 92 da TrpRS de *B.subtilis* está ligado diretamente com a atividade da enzima, pois a modificação deste Trp92 para uma Phe resultou na perda total da atividade enzimática. Hogue e colaboradores (1996) demonstraram que o resíduo Trp92, que se encontra na região da interface dimérica, sente a ocupação do sítio ativo por Trp e ATP e transmite a informação para o outro monômero através de mudanças conformacionais que serão importantes para o reconhecimento do tRNA^{Trp}.

Figura 7: Visualização da sobreposição das estruturas cristalinas da TrpRS de *B.stearothermophilus* com (Doublie et al., 1995) e sem (Ilyin et al., 2000) o complexo Trp-AMP. As estruturas em amarelo e vermelho correspondem à TrpRS contendo o complexo Trp-AMP (que aparece em ciano (AMP) e verde (Trp) no interior da enzima). As estruturas em azul claro e azul escuro correspondem à TrpRS sem o complexo. A visualização e sobreposição das estruturas foram feitas utilizando o programa Swiss PDB Viewer v3.5.

Figura 8: Sítio ativo em 3D da TrpRS de *B.stearothermophilus* em complexo com Trp-AMP obtido da estrutura cristalina (Doublié et al., 1995). A figura foi produzida utilizando o programa InsightII e o triptofano está em vermelho e o AMP em marrom.

A Figura 8 mostra os aminoácidos que compõem o sítio ativo da TrpRS em complexo com o Trp-AMP (Doublié et al., 1995). Esta Figura ilustra as interações entre a enzima e o triptofano (vermelho). A Met 129 da TrpRS se posiciona acima do anel indólico do triptofano, atuando através de uma interação de van der Waals entre o enxofre com o anel de 5 membros. A Phe 5 localiza-se abaixo do anel de 6 membros do indol, interagindo por forças de van der Waals. Devido à localização destes resíduos, forma-se um centro apolar na cavidade de ligação do Trp. A Tyr 125 e a Gln 147 localizam-se acima e abaixo do Trp, respectivamente, e interagem através de pontes de hidrogênio com o nitrogênio do grupo α -amino do Trp. Outros resíduos presentes no sítio ativo da enzima são responsáveis pela interação com o AMP (Figura 8) (Doublié et al., 1995).

Na estrutura da TrpRS de *B. Stearothermophilus*, sabe-se que a existência de um Asp na posição 132 (verde na Figura 8) da enzima determina uma ligação por ponte de hidrogênio com o Trp-AMP, uma vez que a distância (2,77Å) entre os oxigênios do carboxilato (Asp) e o nitrogênio 1 do indol do Trp (Doublié et al., 1995) é adequada para que ocorra este tipo de interação. Esta interação enzima-substrato impede a ligação de

alguns análogos do Trp, como os que contém uma metila ligada ao nitrogênio 1 (Doublié et al., 1995).

Muito já se sabe a respeito da cinética da TrpRS e de alguns mutantes obtidos por mutação pontual ou por seleção de mutantes espontâneos (Sever et al., 1996; Chan et al., 1994; Merle et al., 1986; Praetorius-Ibba et al., 2000). Em todos os casos estudados e em todas as seqüências de TrpRS de procariotos encontradas, o resíduo de Asp (135 em *E. coli* e 132 em *B. stearothermophilus*) encontra-se sempre conservado em uma α -hélice no sítio ativo da enzima (conhecida como “hélice de especificidade”) (Figuras 5 e 9).

O alinhamento das seqüências de TrpRS indica uma grande homologia entre os diferentes organismos, principalmente na região central da enzima, que compõe o sítio ativo e regiões de assinatura das AARS da classe I (Praetorius-Ibba et al., 2000). A diferença marcante entre as seqüências é a presença de 88 resíduos a mais na região C-terminal das TrpRS de *Xanthomonas*, *Xylella* e *Pseudomonas*. Até o momento, esta extensão só foi encontrada nestes três procariotos e a busca por regiões de homologia com estes resíduos, usando o programa Blast (Altschul et al., 1997), foi negativo. Este fato novo atraiu a nossa curiosidade para verificar a influência desta seqüência na atividade da TrpRS de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

Pseudomonas	---MTT-RILTGITPTGTPHLGNYAGAIRPAILASRRSDVDSFYFLADYHALIKCDDPAR	56
Xanthomonas	---MTSMTRVLTGITTSPTPHLGNYVGAIQASAGADAESFYFLADLHSLIKAQDPA	59
Xylella	MGHFMSIRVLTGITTSPTPHLGNYVGAIQASAGADAESFYFLADLHSLIKVQDPER	60
E.coli	---MTKPIVFSGAQPSGELTIGNYMGALRQWVNMQD-DYHCIYCVVDQHAITVRQDAQK	55
H.influ	---MAKPIVFSGVQPSGELTIGNYLGALRNWVKMQE-DYECIFCVVDLHAITVRQDPVA	55
Bacillus	-----MKTIFSGIQPSGVITIGNYIGALRQFVELQH-EYNCYFCIVDQHAITVWQDPHE	53
	:::* :.* :*** **:*	.. :.* **: ..
Pseudomonas	IQRSRLEIAATWLAGGLDVERATFYRQSDIPEIPELTWLLTCVSAKGLLNRAHAYKAAVD	116
Xanthomonas	TQRSTLEIAATWLAGGLDPKVFYRQSDVPETELMWLLTCVAGKILNRAHAYKAAVD	119
Xylella	TQRSTLEIAATWLAGGLDPEKVFYRQSDVPEITELMWLLTCVAGKILNRAHAYKAVVD	120
E.coli	LRKATLDTLALYLACGIDPEKSTIFVQSHVPEHAQLGWALNCYTYFGELSRMTQFK---D	112
H.influ	LRKATLDVLALYLACGIDPNKSTIFVQSHVPEHTQLSWVLNCYTYFGEMSRMTQFK---D	112
Bacillus	LRQNIRRLAALYLAVGIDPTQATLFIQSEVFAHAQAAMWLQCIVYIGELERMTQFK---D	111
	:: * : ** * : : : : * : * : * : * : * : *	:
Pseudomonas	RNVEAG-EDPDAGVTMGLYSPVLMADILMFNAHKIPVGRDQVQHVEMARDIGQRFNHL	175
Xanthomonas	RNRADG-EDEDAGVTAGLFMYPVLMADILMFNAHQVPVGRDQIQHIEMARDFQRFNHN	178
Xylella	KNRSEG-GDDDAGITAGLFMYPVLMADILMFNAHQVPVGRDQIQHIEMARDFQRFNHI	179
E.coli	KSARY-----AENINAGLFDYFVLMADILLYQTNLVPVGEDQKQHLELSRDIAQRFNAL	167
H.influ	KSARY-----AENINVGLFDYFVLMADILLYQAKSVPVGDDQKQHLEITRDIAQRFNAL	167
Bacillus	KSAG-----KEAVSAGLLTYPPVLMADILLYNTDIVPVGEDQKQHLEITRDIAQRFNKR	165
	. : * * * * * : : : : * * * * * : * * * * * : * * * * *	
Pseudomonas	FGNGREFFVLPEAVIEENVATLPLGL-DG-RKMSKSYDN---TIPLFSPSRQLKDAAIARIV	230
Xanthomonas	YG--REFFTLPEAVIDEQVSTLPLGL-DG-RKMSKSYGN---TIPLFAPREELRKLVSILQ	231
Xylella	YG--GEYFVLPEAAIDQVATLPLGL-DG-RKMSKSYGN---TMPLFCTREELKKYVFSIV	232
E.coli	YG---EIFKVPEPFIPKSGARVMSLLEPTKKMSKSDNRRNVIGLLEDPKSVVKKIKRAV	224
H.influ	YG---NIFTIPEIFIGKAGARIMSLQDPEKKMSKSDNRRNVVLTLEDPKSVAKKIKRAV	224
Bacillus	YG---ELFTIPEARIPKVGARIMSLVDPPTKKMSKSDPNPKAYITLLDDAKTIEKKIKSAV	222
	: : * : * * * : : : * : : * * * * * * : * : . : : :	
Pseudomonas	TDSRAP-----GEPKDAFDPSSHLFLLYSAFASAEQVAAFRQELLEGLAWGEAKQRLFQLLD	285
Xanthomonas	TDSRAP-----GQAKDATQGSALFQLYQAFATPQESAAFAQAFADGIGWDAKQVFERID	286
Xylella	TDSRAP-----GEPKEAVGSAVFQLYQAFAGVEECMFQAQALAEGLGWGEAKVRLFERID	286
E.coli	TDSDEPPVVRVDVQNKAGVSNLLDILSAVTG-QSIPELEKQF-EGKMYGHLKGEVADAVS	282
H.influ	TDSDEPPVVRVDVQNKAGVSNLLDILSAVTD-KPIADLEKEF-EGKMYGHLKTAVADEVS	282
Bacillus	TDSEG--TIRYDKEAKPGISNLLNIYSTLSG-QSIEELERQY-EGKGYGVFKADLAQVVI	278
	*: . . . * : : : : : . : : : * : * * : :	
Pseudomonas	NELGEARERYQALIAKPDIEDILLAGAAKAR-RIATPFIAELREAVGLRSLREPLKSAE	344
Xanthomonas	QEIAPLRTRYEGLIAEPARIEAILRAGGARLRARYATPLLAELRDVGLRDLSSQAATAA	246
Xylella	AEVAPLRERYEDFMRPADIEAMLCDSAGRLRERDAIPLLARLREAVGLRSLSLCMASAV	247
E.coli	GMLTELQERYHFRNDEAFLLQVQMKDAGAEKAS-AHASRTLKAVYEAGFV-----AKP--	334
H.influ	TLLASLQERFHFQYRNDETLLDNILRQGAEKAR-AKAQETLAKVYEAVGFV-----AAK--	334
Bacillus	ETLRPIQERYHHWMESEE-LDRVLDEGAEKAN-RVASEMVRKMEQAMGLG-----RRR--	329
	: : * : . : : : : . : : * : : : * * :	
Pseudomonas	SGKKKAARKAARLVSFRRDDGSFRFRLDDAAGEQLLSRAFAFGKAAGAVSKRLLAGETAD	404
Xanthomonas	VHASEKIALPVFKQYRESGQFYFKLNDGAGALLQSDGFASPRDAGQVIARLKQAAQAS	406
Xylella	FVPQEKVALFVLKQYREQDGRFYFKLIDGQGAVLVQSRGFASPRDAGQWIALFKQAVSAE	407
E.coli	-----	
H.influ	-----	
Bacillus	-----	
Pseudomonas	LRAEGNAFGLWLDGEAVAQSPAFADAAARDAAIERTREALAPQE	448
Xanthomonas	DLQLPGVHAQVDADVLAAMDALREA-----	432
Xylella	ALVSPMLEPVADPVVLAALRRLREAG-----	434
E.coli	-----	
H.influ	-----	
Bacillus	-----	

Figura 9: Sequência de aminoácidos da TrpRS de *E. coli* alinhados com os do *H.influenzae* (*H.influ*), *B.stearothermophilus* (*Bacillus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas*), *Xylella fastidiosa* (*Xylella*) e *Xanthomonas pv citri* (*Xanthomonas*) usando o programa Clustal W (versão 1.7). Onde “*” significa 100% conservado, “:” significa altamente conservado e “.” significa conservado. O resíduo D135 em *E.coli* encontra-se em azul.

OBJETIVOS

Neste projeto de mestrado, pretendeu-se:

- Através de mutagênese sítio-dirigida no gene da triptofanil-tRNA^{Trp} sintetase (TrpRS) de *Escherichia coli*, obter a enzima com o seu sítio ativo modificado a fim de torná-la capaz de incorporar análogos N₁-metilados de triptofano como o 1-metiltryptofano (1MW) e 1-metil-7-azatriptofano (1M7NW).
- Testar se a modificação da enzima permitiria a expressão de proteínas recombinantes com 1MW incorporado, utilizando cepas auxotróficas para Trp em meio mínimo contendo 1MW.
- Clonar, expressar, purificar e ensaiar a atividade enzimática da TrpRS de *Xanthomonas campestris* pv *citri* e de um mutante com deleção de 88 resíduos de aminoácidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

CONSTRUÇÕES DOS PLAMÍDEOS

Os oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR e sequenciamento neste projeto estão listados na Tabela 1. A Tabela 2 lista todos os plasmídeos construídos.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados no projeto.

Oligonucleotídeo	Seqüência
TRPRS+	5'TTGTTGAAGCTTCGGCCGGGCTTAACCTACGGATATAACTACGGC3'
TRPRS-	5'AAGAACCGGCCGAAGCTTTTAACGCTTCGCCACAAAACC3'
Primer1	5'AATCGACATATGACTAAGCCCATCGTT3'
RSALA135+	5'CTGATGGCAGCGGCCATCCTGCTGTATC3'
RSALA135-	5'GATACAGCAGGATGGCGCTGCCATCAG3'
RSCYS135+	5'CTGATGGCAGCGTGCATCCTGCTGTATC3'
RSCYS135-	5'GATACAGCAGGATGCACGCTGCCATCAG3'
RSSER135+	5'CTGATGGCAGCGTCTATCCTGCTGTATC3'
RSSER135-	5'GATACAGCAGGATAGACGCTGCCATCAG3'
RSTHR135+	5'CTGATGGCAGCGACTATCCTGCTGTATC3'
RSTHR135-	5'GATACAGCAGGATAGTCGCTGCCATCAG3'
RSVAL135+	5'CTGATGGCAGCGGTTATCCTGCTGTATC3'
RSVAL135-	5'GATACAGCAGGATAACCGCTGCCATCAG3'
EcoRI-	5'CATTAACTATAAAAATAGGCG3'
RSSEQ180-	5'TTACGCGCGCGCCAGATTTTCGG3'
TRPRSB+	5'TTGTTGGGATCCCCGGCCGGGCTTAACCTACGGATATAACTACGGC3'
RSX+	5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAGGAGATAGAACCATG ACGTCGATGACCACCCGT3'
RSXΔ88-	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGGACAGGTGCGCAGG CC3'
RSX-	5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACGCCTCGCGCAAGGC3'

Os códons mutados se encontram discriminados em azul (fita anti-sense) amarelo (fita sense).

Tabela 2: Plasmídeos construídos durante o projeto.

Plasmídeo	Controle de expressão	Sítios de clonagem	Vetor Inserido
pTrpRS-wt-Hind	Promotor da TrpRS (Pi)	TrpRS - HindIII	pET-3a
pTrpRS-wt	Promotor da T7 RNA Polimerase	TrpRS - NdeI-HindIII	pET-3a
pTrpRSD135A	Promotor da T7 RNA Polimerase	TrpRS - NdeI-HindIII	pET-3a
pTrpRSD135C	Promotor da T7 RNA Polimerase	TrpRS - NdeI-HindIII	pET-3a
pTrpRSD135S	Promotor da T7 RNA Polimerase	TrpRS - NdeI-HindIII	pET-3a
pTrpRSD135T	Promotor da T7 RNA Polimerase	TrpRS - NdeI-HindIII	pET-3a
pTrpRSD135V	Promotor da T7 RNA Polimerase	TrpRS - NdeI-HindIII	pET-3a
pTnCF29W-TrpRS-wt	TnC- promotor da T7 RNA Polimerase TrpRS – próprio promotor (Pi)	TnC – NdeI-BamHI TrpRS- BamHI-HindIII	pET-3a
pTnCF29W-TrpRSD135A	TnC- promotor da T7 RNA Polimerase TrpRS – próprio promotor (Pi)	TnC – NdeI-BamHI TrpRS- BamHI-HindIII	pET-3a
pTnCF29W-TrpRSD135C	TnC- promotor da T7 RNA Polimerase TrpRS – próprio promotor (Pi)	TnC – NdeI-BamHI TrpRS- BamHI-HindIII	pET-3a
pTnCF29W-TrpRSD135S	TnC- promotor da T7 RNA Polimerase TrpRS – próprio promotor (Pi)	TnC – NdeI-BamHI TrpRS- BamHI-HindIII	pET-3a
pTnCF29W-TrpRSD135T	TnC- promotor da T7 RNA Polimerase TrpRS – próprio promotor (Pi)	TnC – NdeI-BamHI TrpRS- BamHI-HindIII	pET-3a
pTrpRSX	Promotor da T7 RNA Polimerase	Sítio de recombinação attB do bacteriófago λ	pDEST14
pTrpRSX Δ 88	Promotor da T7 RNA Polimerase	Sítio de recombinação attB do bacteriófago λ	pDEST14

Clonagens envolvendo o gene que codifica a TrpRS de *E.coli*

Para a construção do plasmídeo pTrpRS-Hind, utilizaram-se os oligonucleotídeos TRRPRS+ e TRPRS- (Tabela 1) e o DNA genômico da cepa BL21(DE3)pLysS (Studier et al. 1990) de *E.coli*, extraído segundo Sambrook et al.(1989). A reação foi feita da

seguinte forma: 10 µL de ThermoPol Buffer (10x concentrado, New England BioLabs); 2 unidades de Deep Vent DNA Polymerase (New England BioLabs); 200 µM de dNTP_{mix}; 10 pmol de solução de oligonucleotídeo; 4 ng de DNA genômico de *E. coli* cepa BL21(DE3)pLysS; água milli-Q para volume final de 100 µL.

Utilizando-se o termociclador da Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, foram ajustadas as seguintes temperaturas e os tempos de reação: 95°C por 5 minutos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 46°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos (7 ciclos); 94°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos (25 ciclos); 72°C por 7 minutos.

O produto desta reação de PCR foi purificado através de eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). Após a purificação do produto de PCR, o gene da TrpRS contendo o promotor interno foi digerido com HindIII durante 6 horas e purificado através da precipitação deste DNA (Sambrook et al., 1989). O plasmídeo pET-3a foi digerido com HindIII e purificado da mesma forma que o produto de PCR. Após a sua purificação, este plasmídeo foi desfosforilado incubando-o por 30 minutos com “Phosphatase Alkaline” (New England BioLabs) e novamente precipitado para a purificação do plasmídeo.

Depois de purificados o produto de PCR, o plasmídeo digerido e desfosforilado, fez-se uma reação de ligação de DNA utilizando DNA Ligase (New England BioLabs) e, após 16 horas de reação a 16°C, precipitou-se o DNA para uma rápida purificação (Sambrook et al., 1989).

Este novo plasmídeo contendo a construção de interesse foi então utilizado para transformar células da cepa DH5α pelo método de CaCl₂ (Sambrook et al., 1989). As colônias obtidas com a transformação foram inoculadas em meio 2xTY contendo 200µg/mL de carbenicilina. Estas culturas foram utilizadas para purificar os plasmídeos em pequena escala (Sambrook et al., 1989).

A confirmação da construção pTrpRS-Hind (vide Figura 16) foi feita através da digestão do plasmídeo com EagI por 6 horas, pois os óligos TRPRS- e TRPRS+ apresentam um sítio de restrição para EagI antes e depois do sítio para HindIII, respectivamente. Através da análise do gel de agarose, pode-se confirmar a construção correta que apresentou uma banda de ~2300 pb (pares de base) como esperado. Se o

produto de PCR estivesse na orientação invertida, o gel deveria apresentar uma banda de ~1180 pb e se não tivesse ligado nenhum produto, o gel não deveria apresentar nenhuma banda além da banda do plasmídeo linearizado de ~4636 pb.

O sequenciamento deste plasmídeo foi feito utilizando-se os óligos EcoR1- e RSSEQ180- (Tabela 1). A reação para o sequenciamento baseado no método de Sanger (Sanger et al., 1977) foi feita no termociclador da Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, utilizando-se o kit “Ready Reaction” ABI (Applied Biosystems) seguindo o protocolo: 3 ng de DNA de mini-preparação ou de média-preparação; 3 pmol do oligo (uma reação para cada um dos dois oligos descritos acima); 6,0 µL de Tampão (200 mM de Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM de MgCl₂); 2,0 µL do Big Dye Terminator e água Milli-Q para completar 20µL.

Para as reações de sequenciamento, utilizaram-se as seguintes temperaturas e tempos: 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos, 60° C por 4 minutos (40 ciclos). Terminada a reação o DNA foi então precipitado com isopropanol 75% e sequenciado utilizando-se o sequenciador automático ABI 377 da Perkin-Elmer Applied Biosystems.

A construção do plasmídeo pTrpRS-wt foi feita utilizando-se os óligos Primer 1 e TRPRS- (Tabela 1) e o plasmídeo pTrpRS-Hind como DNA molde. As concentrações dos reagentes para a reação de PCR foram as mesmas descritas acima com as alterações dos óligos e do DNA molde, codificador do gene. Os ciclos de PCR foram: 95° C por 5 minutos; 95° C por 30 segundos, 58° C por 40 segundos, 72° C por 40 segundos (30ciclos); 72° C por 10 minutos. O produto deste PCR e o plasmídeo pET-3a foram digeridos com NdeI e HindIII por 6 horas. O produto de PCR foi purificado através da precipitação de DNA (Sambrook et al., 1989) e o plasmídeo foi purificado através de eletroforese em gel de agarose (Sambrook et al., 1989), para evitar a contaminação da sequência do plasmídeo que foi retirada. O produto de PCR e o plasmídeo, após a digestão e purificação, foram ligados como descrito acima e utilizados na transformação da cepa DH5α para a preparação de DNA em pequena escala, como descrito acima.

A confirmação da construção do plasmídeo pTrpRS-wt (Tabela 2) foi feita através de 3 digestões diferentes (vide Figura 17):

1- Fez-se uma digestão utilizando-se a enzima de restrição BglII, pois existe um sítio de restrição no gene da TrpRS e um no pET-3a. Desta forma, somente os plasmídeos que apresentaram uma banda com 610 pb e outra com 4513 pb foram utilizadas para as novas digestões.

2- A segunda digestão feita foi utilizando-se as enzimas EcoRV, para a qual existe um sítio de restrição no gene da TrpRS, e EagI, para a qual há um sítio no vetor. As construções corretas possuíam dois fragmentos, sendo um com 1407 pb e outro com 3716 pb.

3- A última digestão feita para se confirmar as construções dos plasmídeos, foram utilizadas NdeI e EcoRV, para as quais havia sítios de restrição na união do plasmídeo com o gene da TrpRS e no gene da TrpRS, respectivamente. As construções corretas deveriam apresentar um fragmento com 704 pb e outro com 4419 pb.

A fim de confirmar a sequência e verificar se não havia mutações no gene da TrpRS a construção correta foi sequenciada como descrito para o plasmídeo pTrpRS-Hind.

Para a construção dos plasmídeos pTrpRSD135A, pTrpRSD135C, pTrpRSD135S, pTrpRSD135T e pTrpRSD135V, fizeram-se 3 reações de PCR foram feitas, sendo duas para a inserção da mutação no códon 135 e a terceira para unir os dois fragmentos do gene da TrpRS (vide Figura 18).

O óligo Primer1 hibridiza no início do gene da TrpRS e insere um sítio de restrição para NdeI, tendo sido utilizado sempre com um dos óligos RSALA135-, RSCYS135-, RSSER135-, RSTHR135- ou RSVAL135-, para produzir o fragmento da parte inicial do gene contendo a mutação desejada. Já o óligo TRPRS- hibridiza com o plasmídeo antes do códon de terminação do gene inserindo um sítio de restrição de HindIII após o códon de terminação, tendo sido utilizado sempre com um dos óligos RSALA135+, RSCYS135+, RSSER135+, RSTHR135+ ou RSVAL135+, para inserir a mutação desejada e produzir o fragmento da parte final do gene da TrpRS (todos os óligos estão descritos na Tabela 1).

A reação de PCR foi feita com as concentrações descritas para a preparação do pTrpRS-Hind, com a alteração de usar sempre os pares de óligos descritos e o plasmídeo pTrpRS-wt como fita molde do gene da TrpRS.

Utilizando-se o Termociclador da Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400, foram feitos os seguintes ajustes para as temperaturas e os tempos de reação: 95° C por 5 minutos (1ciclo); 95° C por 30 segundos, 50° C por 40 segundos, 72° C por 40 segundos (8ciclos); 95° C por 30 segundos, 54° C por 40 segundos, 72° C por 40 segundos (25ciclos); 72° C por 10 minutos.

Purificaram-se os produtos deste PCR através de gel de agarose. Com os dois fragmentos de DNA para cada mutação fez-se uma segunda reação de amplificação por PCR utilizando os fragmentos obtidos como fita molde (vide Figura 18). Para este segundo PCR utilizaram-se os dois fragmentos produzidos nas reações anteriores, sendo um correspondente à parte inicial do gene e o outro à parte final do gene. Utilizou-se o Primer 1 e o TRPRS-, que hibridizaram com o início e término do gene da TrpRS, respectivamente, mas só foram adicionados a reação após o primeiro ciclo de reação. As concentrações dos reagentes foram as mesmas descritas para o pTrpRS-Hind. Utilizou-se as seguintes temperaturas e tempos de reação: 95° C por 5 minutos, 25° C por 5 minutos, 72° C por 5 minutos (1ciclo); adicionam-se os óligos; 95° C por 30 segundos, 58° C por 40 segundos, 72° C por 40 segundos (30ciclos); 72° C por 10 minutos.

Estes produtos de PCR foram digeridos, purificados, clonados no pET-3a e foi feita a preparação de DNA em mini escala dos plasmídeos como descrito para o pTrpRS-wt. A confirmação dos plasmídeos foi realizada com as 3 digestões descritas para o pTrpRS-wt e as construções corretas foram sequenciadas como descritas para o pTrpRS-Hind.

Construção de vetores para co-expressão de TnCF29W (induzível) e TrpRS (constitutivo)

Para a construção do plasmídeo pTnCF29W-TrpRS-wt foi feito uma reação de PCR usando o plasmídeo pTrpRS-Hind como fita molde, para mudar o sítio de HindIII localizado na extremidade 5' do gene antes do promotor da TrpRS, para um sítio de BamHI. Para o PCR utilizou-se óligos TRPRSB+ e TRPRS- (Tabela 1) e as concentrações descritas para o pTrpRS-Hind.

As temperaturas de reação no termociclador foram: 95°C por 5 minutos (1 ciclo); 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (6 ciclos); 94°C por 30 segundos, 66°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto (25 ciclos); 72°C por 10 minutos (1 ciclo). Purificou-se o produto deste PCR (1120pb) através de gel de agarose (Sambrook et al., 1989).

O produto de PCR e o plasmídeo pTnCF29W (Pearlstone et al. 1992) (vide Figura 34) foram digeridos com BamHI e HindIII por 6 horas à 37°C. Purificou-se o fragmento maior do plasmídeo através de gel de agarose, para eliminar a possibilidade de obter a reconstrução do plasmídeo original, o produto da reação de PCR foi purificado através da precipitação com etanol. Foi feita a ligação do produto do PCR e do plasmídeo pTnCF29W como descrito para o pTrpRS-Hind.

O produto de ligação foi utilizado para transformar células da cepa DH10B de *E.coli* através de eletroporação. Utilizando-se 2 µL da solução de ligação purificada, 40 µL de células competentes da cepa DH10B, eletroporou-se as células em celas de 2 mm de distância, 100Ω de resistência, 50 µF de capacitância e 2,5 kV de tensão. Após a eletroporação as células foram ressuspensas em meio SOC (Sambrook et al., 1989) e incubadas a 37°C por 40 minutos e então plaqueadas em meio TYE com 200µg/mL de carbenicilina e incubadas a 37°C por 16 horas (Sambrook et al., 1989).

As colônias presentes após a transformação foram inoculadas em meio 2xTY e 200µg/mL de carbenicilina e então foi feita uma mini-preparação de DNA (Sambrook et al., 1989). Para se confirmar a construção fez-se três digestões (vide Figura 34):

1- Digestão do plasmídeo com BglII e somente aqueles plasmídeos que apresentaram um fragmento de ~1500pb foram utilizados em outras digestões.

2- Digestão do plasmídeo com NdeI e HindIII e os plasmídeos que apresentaram um fragmento de ~2000pb foram considerados corretos.

3- Digestão do plasmídeo com BamHI e HindIII e os que apresentaram um fragmento de ~1100pb foram considerados corretos.

O plasmídeo pTnCF29W-TrpRS-wt foi sequenciado como descrito para o pTrpRS-Hind, utilizando os oligos EcoRI-, RSSEQ180- e RSALA135+ (Tabela 1) para confirmar a sequência do gene inteiro e da região promotora.

Para inserir as mutações no gene da TrpRS do plasmídeo pTnCF29W-TrpRS-wt digeriu-se o plasmídeo pTnCF29W-TrpRS-wt e os plasmídeos pTrpRSD135A, pTrpRSD135C, pTrpRSD135S e pTrpRSD135T com a enzima de restrição Bsu36I e depois com HindIII por 6 horas à 37°C para cada enzima. Purificou-se o fragmento maior do plasmídeo da pTnCF29W-TrpRS-wt através de gel de agarose (Sambrook et al, 1989), para eliminar a possibilidade de obter a reconstrução do plasmídeo original. O fragmento menor dos plasmídeos pTrpRS mutantes foram purificados através de gel de agarose, que correspondia ao fragmento do gene contendo a mutação desejada que seria inserido na TnCF29W-TrpRS.

Após a purificação do plasmídeo e do fragmento do gene das TrpRS com as mutações no códon 135, fez-se uma reação de ligação como descrita para pTrpRS-Hind. O produto de ligação foi utilizado para transformar células da cepa DH10B através de eletroporação como descrito para pTnCF29W-TrpRS-wt. As colônias presentes após a transformação foram inoculadas em meio 2xTY e 200µg/mL de carbenicilina, e então foi feita uma mini-preparação de DNA (Sambrook et al., 1989).

Os plasmídeos foram sequenciados utilizando os oligos EcoRI-, RSSEQ180- e RSALA135+ afim de sequenciar todo o gene e a região do promotor da TrpRS. Desta forma confirmou-se a inserção da mutação pontual na construção pTnCF29W-TrpRSD135A, pTnCF29W-TrpRSD135C, pTnCF29W-TrpRSD135S e pTnCF29W-TrpRSD135T (Tabela 2).

Construção de vetores para expressão de TrpRS de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

A clonagem da TrpRS da *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* foi feita utilizando o sistema de clonagem Gateway™ Cloning Technology da Life Technologies. Este sistema utiliza o sítio de recombinação attB do bacteriófago λ para a clonagem do gene no vetor de expressão. O cosmídeo OSA04 do projeto GENOMA da *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* possui o gene TrpS que codifica a TrpRS, e foi utilizado como fita molde para as reações de PCR. O oligo RSX+ hibridiza com o início do gene e foi utilizado para clonagem das duas construções. O RSXΔ88- hibridiza na região do aminoácido 334 e

insere um stop códon após este aminoácido. O RSX- hibridiza no fim do gene TrpS, permitindo a amplificação do gene inteiro. Logo, a reação de PCR foi feita com as concentrações previamente descritas para o pTrpRS-Hind, usando o cosmídeo OSA04 como fita molde e os oligos RSX+ e RSX- para amplificar o gene inteiro (TrpRSX) e RSX+ e RSXΔ88- para amplificar o gene com a deleção dos 88 resíduos C-terminal (TrpRSXΔ88).

As temperaturas e tempos de reação de PCR para os oligos RSX+ e RSXΔ88- foram: 95°C por 5 minutos (1ciclo); 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos (7ciclos); 95°C por 30 segundos, 69°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos (25ciclos); 72°C por 10 minutos.

Para os oligos RSX+ e RSX- as temperaturas foram: 95°C por 5 minutos (1ciclo); 95°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos (7ciclos); 95°C por 30 segundos, 69°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos (25ciclos); 72°C por 10 minutos.

Os produtos destes PCR foram purificados através de gel de agarose (Sambrook et al, 1989), sendo que o primeiro fragmento (codificando a TrpRSXΔ88) continha 1017pb e o gene todo (TrpRSX) continha 1299pb.

Utilizou-se então o kit de clonagem GATEWAY™ para a reação de recombinação para inserir os genes no vetor de seqüenciamento pDONR21. Em um tubo adicionou-se 4 µL de BP Reaction Buffer, 2µL de pDONR201 (plasmídeo de seqüenciamento), 8 µL de solução TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), 4 µL de BP Clonase Enzyme Mix e 8 µL de solução de produto de PCR (TrpRSX ou TrpRSXΔ88). Incubou a reação por 60 minutos a 25°C e inativou a enzima adicionando 2 µL de proteinase K e incubando 10 minutos a 37°C. Utilizou-se 1 µL desta solução para transformar células DH10B através de eletroporação (como descrito para o pTnCF29W-TrpRS-wt). Depois de uma mini preparação de DNA (Sambrook et al., 1989), confirmou-se as construções através de digestão com a enzima de restrição SfiI por 6 horas a 60°C. Os plasmídeos que apresentaram uma banda de ~510pb foram considerados corretos para o TrpRSXΔ88 (pP2) e os que apresentaram uma banda de ~510 pb e outra de ~615pb foram considerados corretos para o TrpRSX (pP3).

Os plasmídeos considerados corretos foram sequenciados como descrito para o pTrpRS-Hind utilizando os oligos RSX+, RSX- e RSXΔ88-.

O plasmídeo que continha a sequência correta foi transferido para o vetor de expressão pDEST14 utilizando o kit GATEWAY™. Em um tubo adicionou-se 4 µL de LR Reaction Buffer, 2µL de pDEST14 (plasmídeo de expressão usando o promotor ϕ 10 do fago T7), 6 µL de solução TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0), 4 µL de LR Clonase Enzyme Mix e 4 µL de solução do plasmídeo pP2 ou pP3. Incubou-se a reação por 60 minutos a 25°C e inativou-se a enzima adicionando 2 µL de proteinase K e incubando 10 minutos a 37°C. Utilizou-se 1 µL desta solução para transformar células DH10B através de eletroporação. Fez-se uma mini preparação de DNA com uma colônia da célula transformada (como descrito para pTrpRS-Hind) para os plasmídeos pTrpRSX e pTrpRSXΔ88.

PREPARAÇÃO DE DNA EM MÉDIA ESCALA

Transformou-se células da cepa DH5α com todos os plasmídeos da Tabela 2, que apresentaram a sequência correta, através do método de CaCl₂ (Sambrook et al., 1989). Inoculou-se uma colônia em 200 mL de meio 2xTY e 200 µg/mL de carbenicilina e seguiu-se a preparação e purificação utilizando-se o sistema Concert™ High Purity Plasmid Purification Systems (Life Technologies) para a preparação de DNA em média escala.

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS EM MEIO RICO

Células da cepa BL21(DE3)pLysS (Studier et al., 1990) foram transformadas com os plasmídeos pTrpRS-wt, D135A, D135C, D135S, D135T, D135V, pTnCF29W, pTnCF29W-TrpRS-wt, pTnCF29W-TrpRSD135A, pTnCF29W-TrpRSD135C, pTnCF29W-TrpRSD135S, pTnCF29W-TrpRSD135T, pTrpRSX e pTrpRSXΔ88 através do método de CaCl₂ (Sambrook et al., 1989). Uma colônia de cada clone foi utilizada

para inocular (um erlenmeyer de 2L contendo) 500mL de meio 2xTY, carbenicilina (200µg/mL) e cloranfenicol (200µg/mL) a 37°C. Quando a densidade óptica se encontrava entre 0,8 e 1,0 adicionou-se 250µL de IPTG (800 mM). Após 3 horas de indução centrifugou-se o meio de cultura a 5000rpm e 4°C por 20minutos. Congelou-se a fração celular para a posterior purificação das proteínas.

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM MEIO MÍNIMO NA PRESENÇA DE 1-METILTRIPTOFANO

Testou-se alguns protocolos de expressão protéica em meio mínimo contendo 1MW. Células da cepa CY(DE3)pLysS, que é auxotrófica a triptofano (Drapeau et al., 1968; Quaggio não publicado; Farah et al., 1999), foram transformados com os plasmídeos que continham o cDNA da TrpRS tipo selvagem (pTrpRS-wt) ou mutante: pTrpRSD135A, pTrpRSD135C, pTrpRSD135S, pTrpRSD135T e pTrpRSD135V sobre o controle do promotor da T7 RNA Polimerase do pET-3a (Studier et al., 1990). Três protocolos de expressão foram testados:

1) Transformantes de cada mutante foram inoculadas em 500mL de meio mínimo contendo triptofano (0,05mg/mL) à 37°C e agitação de 250 rpm. Quando a densidade óptica do meio se encontrava entre 0,8 e 1,0 centrifugou-se o meio e ressuspendeu-se as bactérias em novo meio mínimo e adicionou-se IPTG ao meio. Após 15 minutos de incubação à 37°C e agitação de 250 rpm, adicionou-se 1MW (0,075mg/mL) ao meio. Após 3 horas de indução, centrifugou-se o meio à 5000rpm, 4°C e congelou-se a fração bacteriana. Aplicou-se as mostras induzidas e não induzidas em um gel de SDS-PAGE. Observou-se a indução da TrpRS.

2) Transformantes de cada plasmídeo foram inoculadas em 500mL de meio mínimo contendo triptofano (0,05mg/mL) à 37°C e agitação de 250 rpm. Quando a densidade óptica do meio se encontrava entre 0,6 e 0,7 centrifugou-se o meio e ressuspendeu-se as bactérias em novo meio mínimo contendo 1MW (0,075mg/mL). Quando a densidade óptica do meio se encontrava entre 0,8 e 1,0 adicionou-se IPTG ao meio. Após 3 horas de indução centrifugou-se o meio à 5000rpm, 4°C e congelou-se a

fração bacteriana. Aplicou-se as amostras induzidas e não induzidas em um gel de SDS-PAGE. Não se observou nenhuma indução nestas condições.

3) Transformantes de cada mutante foram inoculados em 500mL de meio mínimo contendo triptofano (0,05mg/mL) à 37°C e agitação de 250 rpm. Quando a densidade óptica do meio se encontrava entre 0,8 e 1,0 centrifugou-se o meio e ressuspendeu-se as bactérias em novo meio mínimo contendo 1MW (0,075mg/mL). Após 30 minutos de incubação à 37°C e agitação de 250 rpm, adicionou-se IPTG ao meio. Após 3 horas de indução centrifugou-se o meio a 5000rpm, 4°C e congelou-se o pellet. Aplicou-se as amostras induzidas e não induzidas em um gel de SDS-PAGE. Observou-se uma melhor indução da TrpRS em comparação com o protocolo 1 descrito acima.

Também transformou-se células da cepa CY(DE3)pLysS com os plasmídeos pTnCF29W, pTnCF29W-TrpRS-wt, pTnCF29W-TrpRSD135A, pTnCF29W-TrpRSD135C, pTnCF29W-TrpRSD135S e pTnCF29W-TrpRSD135T. Sendo que a TnCF29W (Pearlstone et al., 1992) se encontrava sobre o controle do promotor da T7 RNA Polimerase do pET-3a (Studier et al., 1990) e a TrpRS se encontrava sobre o controle do seu promotor interno (Hall et al, 1982). Testou-se a incorporação de 1MW na TnCF29W induzida utilizando o protocolo 3 descrito acima.

PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

TrpRS de *E.coli*

O seguinte protocolo de purificação foi utilizado para a TrpRS-wt e mutantes depois de expressas em meios contendo 1MW ou Trp.

Para cada “pellet” oriundo de 500 mL de meio de cultura, as células bacterianas foram ressuspendidas em 20 mL de solução de Lise (25% de sacarose, 40 mM de Tris-HCl pH8,0, 10 mM de EDTA pH8,0, 100 mM de PMSF, 14 mM de β -mercaptoetanol). A lise bacteriana foi efetuada passando-se a suspensão no “French Press”, utilizando uma pressão de 1000 psi, por 4 vezes.

A solução foi então centrifugada à 15000rpm, 4°C por 1 hora. O sobrenadante foi então aplicado em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow pré equilibrada com tampão A (20mM K₂HPO₄, 50mM KCl pH6,8) à 4°C. Utilizando-se este mesmo tampão eluiu-se a proteína após 100mL de lavagem, utilizando-se um fluxo de 50mL/hora.

A concentração de K₂HPO₄ na fração contendo a TrpRS foi ajustada para 100mM e aplicou-se em uma coluna empacotada com HA-Ultrogel (hidroxiapatita da Biosepra), equilibrada com solução 100mM de K₂HPO₄ (pH 6,8) (solução de equilíbrio) a 4°C com fluxo de 50mL/hora. Após a amostra aplicada, lavou-se a coluna com a solução de equilíbrio até a absorbância do eluato chegasse a zero (aproximadamente 200mL). Trocou-se então o tampão para 500mM K₂HPO₄ (pH 6,8) e coletou-se frações de 5mL.

Através de um gel de SDS-PAGE 15% determinou-se quais frações continham a TrpRS purificada. Uma parte da proteína foi utilizada para os ensaios de fluorescência. O restante foi redividido em duas partes, uma parte foi dialisada (8 horas de diálise) contra o tampão para os ensaios de CD (50mM de K₂HPO₄, 100mM de KCl em pH 6,8) e a outra foi dialisada (8 horas de diálise) contra tampão de 100mM K₂HPO₄, 10mMKCl, 5mM de MgCl₂, 1mM DTT e 20% glicerol em pH 6,8 e foram estocadas a -80°C para ensaios de atividade enzimática.

TnCF29W

Para a purificação da TnCF29W utilizou-se o seguinte protocolo (Quaggio et al., 1994). Ressuspendeu-se o pellet de 500mL de meio de cultura em 20mL de solução de Lise (25% de sacarose, 40 mM de Tris-HCl pH8,0, 10mM de EDTA pH8,0, 100 mM de PMSF, 14 mM de β-mercaptoetanol). Passou-se esta solução 4 vezes no “French Press” à 1000psi. Centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 30 minutos à 4°C. Completou-se o volume da solução com água milli-Q até 35 mL. Adicionou-se 1,75 mL de ácido tricloroacético, lentamente sob agitação.

Centrifugou-se a solução a 10000 rpm por 10 minutos. Ressuspendeu-se o “pellet” em 14 mL de solução de 25 mM de Tris-HCl pH8,0 e 1 mM de MgCl₂. Dialisou-

se 2 vezes (8 horas de diálise cada vez) contra este mesmo tampão. Centrifugou-se a 10000 rpm por 30 minutos adicionou-se uréia sólida até a concentração de 8 M.

Aplicou-se esta solução em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow pré-equilibrada com: 25mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM de $MgCl_2$ e 8 M de uréia. Lavou-se a coluna com 150mL deste mesmo tampão contendo 60 mM de NaCl. Aplicou-se então um gradiente de 60 – 250 mM de NaCl (500 mL).

As frações que apresentavam a TnCF29W observada através de gel de SDS-PAGE 15% foram então dialisadas 4 vezes (8 horas de diálise cada vez) contra 25 mM de Tris-HCl (pH 8,0) e 1 mM EDTA. Armazenou-se as amostras purificadas a $-20^{\circ}C$.

TrpRS de *Xanthomonas axonopodis pv citri*

Para a purificação da TrpRS tipo selvagem de *Xanthomonas axonopodis pv citri* (TrpRSX) e a mutante de deleção de 88 resíduos C-terminal (TrpRSX Δ 88) seguiu-se o seguinte protocolo. Para cada 500 mL de meio de cultura, o pellet bacteriano foi ressuspensionado em 20mL de solução de Lise (25% de sacarose, 40 mM de Tris-HCl pH8,0, 10 mM de EDTA pH8,0, 100 mM de PMSF, 14 mM de β -mercaptoetanol). A lise bacteriana foi efetuada passando-se a solução no “French Press”, utilizando uma pressão de 1000 psi, por 4 vezes.

A solução foi centrifugada à 45000 rpm, $4^{\circ}C$ por 1 hora e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de DEAE Sepharose Fast Flow pré equilibrada com tampão A (20mM K_2HPO_4 , pH6,8) à $4^{\circ}C$. Lavou-se a coluna com 250 mL deste mesmo tampão, utilizando-se um fluxo de 150mL/hora. Aplicou-se um gradiente de KCl de 0 a 300mM em tampão A. Através de análise do gel de SDS-PAGE 15% coletou-se as frações que continham a proteína. Depois de duas dialises (8 horas de diálise cada vez) contra tampão de K_2HPO_4 100 mM (pH 6,8) foram aplicadas em uma coluna empacotada com HA-Ultrogel (hidroxiapatita da Biosepra), equilibrada com solução 100mM de K_2HPO_4 (pH 6,8) a $4^{\circ}C$ com fluxo de 100mL/hora. As proteínas TrpRSX e TrpRSX Δ 88 não foram retidas pela matriz da coluna.

Esta solução foi dialisada (8 horas de diálise cada vez) contra 50 mM de Tris-HCl, 4 mM DTT (pH6,8) duas vezes e aplicada em uma coluna de CM Sepharose Fast Flow equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi lavada com 250mL deste tampão a 4°C com fluxo de 150mL/hora. Através de gel de SDS-Page 15% observou-se que as proteínas não ligaram na coluna.

Precipitou-se as proteínas com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até atingir a saturação de 45% em banho de gelo e agitação. Manteve-se a solução em agitação por 2 horas e centrifugou a 15000rpm, 4°C por 1h. O pellet foi ressuspendido em tampão de 100mM K_2HPO_4 , 10mM KCl, 5mM MgCl_2 , 1mM DTT e 20% glicerol em pH 6,8 a solução foi dialisada três vezes (8 horas de diálise cada vez) contra o mesmo tampão para retirar todo o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As proteínas foram estocadas a -80°C para ensaios de atividade enzimática.

FLUORESCÊNCIA

Os espectros de fluorescência foram monitorados a 25°C, utilizando-se um Spectrofluorometer Hitachi F-4500. Para a TrpRS-wt e mutantes D135A, D135C, D135S e D135T, utilizamos um tampão de 500 mM K_2HPO_4 e 8 M Uréia. Para a TnCF29W expressa em meio com Trp e com 1MW, os espectros foram obtidos em tampão 25mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM KCl e 1mM CaCl_2 ou 1mM EGTA.

DICROÍSMO CIRCULAR

Antes de obter o espectro de CD foi necessário dialisar 2 vezes (8 horas de diálise cada vez) as proteínas purificadas em tampão de 100mM KCl, 50mM K_2HPO_4 e pH 6,8. Depois de dialisadas as proteínas foram então dosadas 2 vezes através do método de Hartree (1972) utilizando BSA como padrão.

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos utilizando um Espectropolarímetro Jasco 720 com as seguintes condições: início em 260nm; término em 190nm; resolução de 0,5nm; velocidade de 100nm/minuto; 8 acumulações de

espectro; resposta de 0,5 segundos; fenda de 0,2 nm e sensibilidade de 100 mdgs e 10 μ M de proteína.

Os espectros foram obtidos em uma cela de 0,1 mm a 25°C. Os valores de elipticidade foram convertidos para elipticidade residual segundo a fórmula:

$$[\theta]_{\text{residual}} = (\theta_{\text{medido}} - \theta_{\text{branco}}) / ([\text{TrpRS}] \times [\text{n}^{\circ} \text{ de ligações peptídicas}])$$

Sendo a [TrpRS] medida em 10^{-6} M e o [n° de ligações peptídicas] utilizado foi o número de aminoácidos de um monômero de TrpRS –1, e este valor foi multiplicado por 2, já que a proteína é um homodímero, sendo o valor utilizado 666.

ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Formação de Triptofano-hidroxamato

Para a aminoacilação do tRNA^{Trp} a TrpRS realiza duas reações (Figura 3), a primeira reação está relacionada com a capacidade da enzima em acomodar o Trp e o ATP em seu sítio ativo e promover a reação de transesterificação. Utilizou-se o ensaio de formação do composto triptofano-hidroxamato (Davie, 1964) para se testar a atividade enzimática da TrpRS-wt e mutantes de *E.coli*, TrpRSX-wt e TrpRSX Δ 88 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* da formação de triptofanil-AMP (Trp-AMP).

O ensaio de formação de Trp-hidroxamato foi feito misturando-se os seguintes reagentes em um tubo de ensaio: 10 mM de ATP (pH 7,8), 10 mM de MgCl₂, 1 M de NH₂OH (pH 7,8), 100 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 2 unidades de Pirofosfatase (New England Biolabs), 10 mM de L-triptofano ou 1 MW e água milli-Q para completar 2,0 mL de volume reacional. Dois controles negativos foram feitos: um sem triptofano e um sem ATP.

Incubou-se a solução sem a TrpRS por 5 minutos à 37°C e ao adicionar-se a enzima (3 μ M) a reação foi incubada à 37°C e após 0, 7 e 15 minutos retirou-se alíquotas de 500 μ L da reação e adicionou a 1,15 mL de solução de cloreto férrico (370 mM), ácido

tricloroacético (310mM) e HCl (650mM) e agitou-se imediatamente. Mediu-se a absorção a 460nm utilizando-se como branco 1,15mL de solução de cloreto férrico e 500µL de água milli-Q. Antes de medir a absorção, esperava-se 20 minutos e clarificou-se a solução por centrifugação.

Intercâmbio de Pirofosfato

O ensaio de intercâmbio de pirofosfato foi realizado afim de averiguar a atividade enzimática na primeira etapa da reação catalizada pela TrpRS. O ensaio foi realizado com as TrpRS-wt e mutantes de *E.coli* e TrpRSX-wt e TrpRSXΔ88 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*.

O ensaio foi feito utilizando o seguinte protocolo: misturou-se 50 mM de HEPES (pH 7,0), 0,05% de BSA, 10 mM de Mg(OAc)₂, 10 mM de KF, 4 mM de DTT, 10 mM de pirofosfato de sódio (10 cpm/pmol de ³²P), 2 mM de ATP (pH7,0), 2mM de Trp, sendo estas concentrações de ATP e Trp saturantes, 100 nM de TrpRS e água Milli-Q para completar 200 µL de volume reacional. Para se determinar o K_m a concentração de ATP variou de 26,4 até 6600 µM e Trp variou de 3,64 até 910 µM.

O meio reacional sem a enzima foi equilibrado por 1 minuto à 37°C e então foi adicionada a enzima. Após 1 minuto de reação adicionou-se 200 µL de solução contendo 10% ácido tricloroacético, 0,3 M de pirofosfato de sódio e 1% de carvão ativo à 4°C. A mistura reacional inativada foi diluída a 2 mL com água Milli-Q e filtrada em filtros GF/C ou GF/A Whatmann (4,7 cm de diâmetro) e lavada com 40 mL de solução 10 mM de pirofosfato de sódio (4°C) e 10 mL de etanol (90%). Passou-se ar pelos filtros por 1 minuto e deixou-os secar a temperatura ambiente por 10 minutos e então adicionou-se 3 mL de solução de cintilação miscível e mediu-se a radioatividade no Contador de Cintilação Líquida Beckman LS1801.

O experimento realizado com 1MW foi feito da mesma forma como descrito acima, trocando apenas a solução de Trp por 1MW para as TrpRS-wt e mutantes de *E.coli*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

MUTAÇÕES PONTUAIS NO SÍTIO ATIVO DA TRIPTOFANIL-TRNA^{TRP} SINTETASE DE *E. COLI*

Realizou-se mutações pontuais que visaram modificar o resíduo do ácido aspártico (Asp) na posição 135 para Ala, Cys, Ser, Thr e Val. O Asp 135 se localiza no sítio ativo e é conservado em quase todas as TrpRS (Sever et al., 1996; Doublié et al., 1995). O grupo carboxilato deste Asp faz uma ponte de hidrogênio com o grupo NH do anel indólico do triptofano (Figura 8). Como deseja-se incorporar um análogo que apresenta uma metila nesta posição procurou-se mutações que proporcionaram uma cavidade para a acomodação deste grupo, que é apolar (Figura 11).

Utilizando-se o programa Swiss-PDB Viewer v3.5 modificou-se o resíduo D132 (nesta etapa sem minimização de energia) da estrutura cristalina da TrpRS da *B. stearothermophilus* (Doublié et al., 1995) para A132, C132, S132, T132 e V132. Observa-se na Figura 11 um aumento da distância entre o N₁ do triptofano e a cadeia lateral do resíduo na posição 132, que pode levar a uma acomodação do análogo metilado no sítio ativo da TrpRS.

Utilizando o programa InsightII (Molecular Simulations Inc.) construiu-se um modelo de homologia da TrpRS de *E.coli* baseado na estrutura da proteína de *B.stearothermophilus*. Esta modelagem consiste de três etapas principais realizadas utilizando a ferramenta Homology do programa. Primeiramente foi feito o alinhamento das seqüências da TrpRS de *B.stearothermophilus* e *E.coli*, que identifica os trechos homólogos entre as seqüências. Foi feita então a troca das cadeias laterais do *B.stearothermophilus* para as de *E.coli* nestes trechos. As regiões que não são homólogas correspondem as alças de tamanho variável cujas estruturas foram estimadas através de minimização de energia. As regiões que diferiram entre as estruturas estão localizadas em 3 loops externos e nas regiões N- e C-terminal. Todas as demais partes da TrpRS de *E.coli* obteve uma boa sobreposição com a estrutura molde (*B.stearothermophilus*).

Figura 11: Estrutura 3D do sítio ativo da TrpRS do *B. stearothermophilus* com as mutações feitas nas nossas construções no resíduo 132 (resíduos em verde claro), ala (a), cys (b), ser (c), thr (d), val (e) e sem mutação asp (f). Em rosa se encontra o triptofano, em marrom o AMP e em verde escuro os demais resíduos que compõem o sítio (Doublié et al., 1995). A linha pontilhada indica a distância em angstroms entre os átomos pesados da cadeia lateral dos aminoácidos na posição 132 e o N₁ do anel indólico. As modificações foram feitas no arquivo pdb (Doublié et al., 1995) utilizando o programa Swiss-PDB Viewer v3.5 sem posterior minimização de energia. O sítio ativo da proteína tipo selvagem (f) está inserido para a comparação com as mutações.

Figura 12: Representação da sobreposição das estruturas da TrpRS de *E.coli* (azul) e *B.stearothermophilus* (amarelo) incluindo o triptofano (vermelho) e o AMP (verde).

Figura 13: Representação do sítio ativo da TrpRS de *E.coli* obtida através do programa InsightII utilizando a estrutura da TrpRS do *B.stearothermophilus* como modelo. Em verde escuro está representado o resíduo asp135, em verde claro os demais resíduos que compõe o sítio, sendo que em azul escuro o único resíduo que difere entre os dois organismos no sítio ativo. Em azul claro estão representados os resíduos que poderiam fazer contato com o asp 135. A linha pontilhada indica a distância em Å entre o O da carboxila do asp e o H do metil ligado ao N₁ do anel indólico do 1-metiltryptofano (vermelho).

Todos os resíduos que compõem o sítio ativo das TrpRS dos dois organismos são os mesmos, com exceção da Val 186 de *E.coli* que é substituída por Ile 183 em *B.stearothermophilus* (Figura 13). Os resíduos que podem interagir com a cadeia lateral do Asp 135 devido a aproximação espacial são Gln 82, His 88, Leu 131 e Val 42. A troca deste resíduo por um menos polar deveria afetar as interações com estes resíduos. Evitou-se introduzir cadeias laterais estericamente maiores do que o Asp para evitar interações repulsivas de alta energia que podem resultar em grandes rearranjos estruturais.

A substituição do H do N₁ do anel indólico do triptofano por um grupo metila também foi feita no modelo para prever a distância entre estes grupo e os resíduos na posição 135 (vermelho nas Figuras 13 e 14). Na Figura estão indicadas as distâncias entre um H do grupo metil-N₁ e o átomo pesado mais próximo da cadeia lateral na posição 135. As distâncias variam de 1 Å para o Asp (na proteína selvagem) até 2,5Å para a Ala. Os outros resíduos na posição 135 apresentam uma distância mínima ao redor de 2Å entre os átomos pesados da cadeia lateral e o carbono do grupo metil do 1-metiltryptofano. As distâncias entre a cadeia lateral do aminoácido na posição 135 e o H do grupo metil do 1-metiltryptofano podem ser ampliadas através da rotação da cadeia lateral. Escolheu-se a posição em que se obteria uma menor distância entre os resíduos e tentando reproduzir o posicionamento da Asp presente originalmente.

A previsão para a distância apropriada para que haja interações de van der Waals é sempre maior que 2Å e através dos modelos moleculares, os mutantes apresentariam a distância mínima necessária para acomodar o grupo N₁-metil, enquanto que a tipo selvagem não apresenta espaço suficiente para acomodá-lo. O raio de van der Waals para o hidrogênio é de 1-1,5Å, para o oxigênio é 1,4Å e para o enxofre é 1,8Å. A distância mínima para um contato de van der Waals é de 0,3-0,5Å a mais que a soma dos raios dos grupos. Logo, é esperado então uma boa interação de van der Waals entre 2,0–3,0Å (Creighton, 1996). Note que a rotação do ângulo de torção da ligação C_α-C_β do resíduo 135 na Figura 14 pode aumentar ou diminuir a distância apresentada na Figura 14.

Figura 14: Estrutura 3D do sítio ativo da TrpRS da *E.coli* com as mutações feitas nas nossas construções no resíduo 135 (resíduos em verde escuro), ala (a), cys (b), ser (c) e thr (d). Em vermelho se encontra o 1-metiltryptofano, em amarelo o AMP e em verde claro os demais resíduos que compõem o sítio ativo, em azul está representado o resíduo que difere entre *E.coli* e *B.stearothermophilus* (Doublé et al., 1995). A linha pontilhada indica a distância (Å) entre os átomos pesados da cadeia lateral dos aminoácidos na posição 135 e o H do metil ligado ao N₁ do anel indólico. As modificações foram feitas no arquivo pdb (Doublé et al., 1995) utilizando o programa InsightII.

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO DE MUTANTES DE TRPRS

Inicialmente clonou-se o gene da TrpRS de *E.coli*, a partir do DNA genômico extraído da cepa BL21(DE3)pLysS. Para a clonagem deste gene, partiu-se da sequência publicada por Hall et al. (1982), na qual está descrito a sequência do promotor do gene da TrpRS (Figura 15). Desenhou-se os oligos TRPRS+ e TRPRS- (Tabela 1) e seguindo o protocolo descrito em materiais e métodos construiu-se o plasmídeo inicial pTrpRS-Hind como indicado na Figura 16.


```

1  ggcttaacct  acggatataa  ctacggcgag  gctatcgatc  tcagccagcc  tgatgtaatt
61  tatcagtcct  taaatgacct  tctgcccgca  ttagggcttc  cgcatagcga  aaatcaggaa
121  tcgaaaaatg  actaagccca  tcgtttttag  tggcgcacag  ccctcagggtg  aattgaccat
181  tggtaactac  atgggtgctg  tgcgtcagtg  ggtaaagatg  caggatgact  accattgcat
241  ttactgtatc  gttgaccaac  acgcgatcac  cgtgcgccag  gatgcacaga  agctgcgtaa
301  agcgacgctg  gatacgctgg  ccttgatatc  ggcttggtgt  atcgatcctg  agaaaagcac
361  catttttggt  cagtccacg  tgccggaaca  tgcacagtta  ggctgggcac  taaactgcta
421  tacctacttc  ggcgaactga  gtcgcatgac  gcagtttaaa  gataaatctg  cgcgttatgc
481  cgagaacatc  aacgctggtc  tgtttgacta  tccggtgctg  atggcagcgg  acatcctgct
541  gtatcaaact  aatctggtac  cgggtgggtga  agaccagaaa  cagcacctcg  aactgagccg
601  cgatattgcc  cagcgtttca  acgcgctgta  tggcgagatc  ttttaagggtg  cggagccggt
661  tattccgaaa  tctggcgctg  gcgtaatgtc  gctgctggag  ccgaccaaga  agatgtccaa
721  gtctgacgat  aatcgcaata  acgtgatcgg  cctgctggaa  gatccgaaat  cggtagtgaa
781  gaaaatcaaa  cgtgcggtga  ctgactccga  cgagccgccg  gtagttcgct  acgatgtgca
841  gaacaaagcg  ggcgtttcaa  acctgttgga  tatectttca  gcggtaacgg  gccagagcat
901  cccagaactg  gaaaaacagt  tcgaaggcaa  gatgtatggg  catctgaaag  gtgaagtggc
961  tgatgccgtt  tccggtatgc  tgactgaatt  gcaggaacgc  tatcacggtt  tccgcaacga
1021  tgaagccttc  ctgcaacagg  tgatgaaaga  tggcgcgga  aaagccagcg  cgcacgcttc
1081  ccgtacgcta  aaagccgtgt  accaagcgat  tggttttgtg  gcgaagcggt  aa

```

Figura 15: Sequência do gene da TrpRS de *E.coli* publicado por Hall et al. (1982) contendo a região promotora da TrpRS. Em verde estão indicados as regiões promotoras do gene, em vermelho encontra-se a região de ligação do ribossomo (RBS) e em azul está indicado o códon de iniciação do gene da TrpRS.

A construção foi feita a partir do DNA genômico da *E.coli* e clonado no sítio de HindIII do vetor pET-3a (Figura 16). Esta construção foi sequenciada e então utilizada como fita molde para a construção do plasmídeo pTrpRS-wt (Figura 17). Utilizando os oligos Primer 1 e TRPRS- (Tabela 1) e o plasmídeo pTrpRS-Hind, amplificou-se o gene (sem a sua região promotora) e inseriu-se um sítio de NdeI antes do codon de iniciação do gene e um sítio de HindIII após o códon de terminação do gene. Desta forma pode-se clonar a TrpRS entre os sítios de NdeI e HindIII no pET-3a (Studier et al, 1989) como descrito em materiais e métodos e representado na Figura 17. O plasmídeo foi sequenciado para verificar a integridade do gene.

Figura 16: Esquema da construção do plasmídeo pTrpPRS-Hind e o seu mapa de restrição

Para se inserir uma mutação pontual no resíduo 135 do gene da TrpRS de *E.coli*, foi necessário preparar dois fragmentos do gene e uní-los posteriormente. Para a preparação dos dois fragmentos que compõem o gene da TrpRS com a mutação pontual e sítios de NdeI e HindIII antes e depois do gene, fez-se duas reações de PCR produzindo os fragmentos A e B como indicado na Figura 18, utilizando a construção pTrpRS-wt como fita molde. Após a etapa de purificação destes primeiros fragmentos, realizou-se a segunda reação de PCR para unir os dois fragmentos e obter o gene inteiro da TrpRS com a mutação desejada.

Figura 18: Esquema da reação das etapas de PCR para a inserção da mutação pontual no códon 135 da TrpRS de *E.coli*.

Clonou-se os produtos de PCR codificando mutantes da TrpRS no pET-3a como descrito em materiais e métodos, exemplificado na Figura 17. O mapa de restrição para os mutantes é o mesmo que o do pTrpRS-wt. Para cada um dos cinco mutantes construídos (D135A, D135C, D135S, D135T e D135V) foram feitas três digestões para confirmar a construção correta, como descrito em materiais e métodos. Somente aqueles

que apresentaram resultado positivo foram utilizados para os testes de expressão protéica para averiguar se a construção expressava a TrpRS mutante. Somente aqueles que apresentaram uma expressão de proteínas em grande quantidade foram seqüenciados (Figura 20), pois algumas construções que apresentaram resultado positivo nas digestões não foram capazes de induzir uma grande quantidade da TrpRS.

SEQÜENCIAMENTO DE DNA

Inicialmente seqüenciamos a TrpRS que foi clonada no pET-3a entre os sítios de HindIII (plasmídeo pTrpRS-Hind da Figura 16) e serviu de fita molde para todas as clonagens posteriores do projeto. Como para esta clonagem utilizou-se como fita molde para o desenho dos oligos, a seqüência de TrpRS de *E. coli* de Hall et al. (1982) fez-se necessário a confirmação da seqüência. A seqüência obtida (Figura 19), para a TrpRS do plasmídeo pTrpRS-Hind, possui 100% de homologia com a seqüência publicada por Server et al. (1996) para TrpRS de *E.coli*, (gi:1055284). Os resultados obtidos também indicam uma homologia de 99% com relação as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do gene da TrpRS de *E.coli* publicado por Blattner e colaboradores (1997) (gi:1789783) a única diferença é a troca da prolina C-terminal para arginina. A seqüência de Hall e colaboradores (1982) (gi:463199) apresenta algumas diferenças na seqüência de nucleotídeos (998 idênticos em 1005 totais) e aminoácidos (332 idênticos em 334 totais). Todas as seqüências comparadas são da *Escherichia coli* mas pertencentes a diferentes cepas que foram seqüenciadas.

```

1  M T K  P I V F  S G A  Q P S  G E L T  I G N
1  ATGACTAAGC CCATCGTTTT TAGTGGCGCA CAGCCCTCAG GTGAATTGAC CATTGGTAAC

21  Y M G  A L R Q  W V N  M Q D  D Y H C  I Y C
61  TACATGGGTG CGTGCGTCA GTGGGTAAAC ATGCAGGATG ACTACCATTG CATTTACTGT

41  I V D  Q H A I  T V R  Q D A  Q K L R  K A T
121 ATCGTTGACC AACACGCGAT CACCGTGCGC CAGGATGCAC AGAAGCTGCG TAAAGCGACG

61  L D T  L A L Y  L A C  G I D  P E K S  T I F
181 CTGGATACGC TGGCCTTGTA TCTGGCTTGT GGTATCGATC CTGAGAAAAG CACCATTTTT

81  V Q S  H V P E  H A Q  L G W  A L N C  Y T Y
241 GTTCAGTCCC ACGTGCCGGA ACATGCACAG TTAGGCTGGG CACTGAAGTG CTATACCTAC

101 F G E  L S R M  T Q F  K D K  S A R Y  A E N
301 TTCGGCGAAC TGAGTCGCAT GACGCAGTTT AAAGATAAAT CTGCGCGTTA TGCCGAGAAC

121 I N A  G L F D  Y P V  L M A  A D I L  L Y Q
361 ATCAACGCTG GTCTGTTTGA CTATCCGGTG CTGATGGCAG CGGACATCCT GCTGTATCAA

141 T N L  V P V G  E D Q  K Q H  L E L S  R D I
421 ACTAATCTGG TACCGGTGGG TGAAGACCAG AAACAGCACC TCGAACTGAG CCGCGATATT

161 A Q R  F N A L  Y G E  I F K  V P E P  F I P
481 GCCCAGCGTT TCAACGCGCT GTATGGCGAG ATCTTTAAGG TGCCGGAGCC GTTTATTCCG

181 K S G  A R V M  S L L  E P T  K K M S  K S D
541 AAATCTGGCG CGCGCGTAAT GTCGCTGCTG GAGCCGACCA AGAAGATGTC CAAGTCTGAC

201 D N R  N N V I  G L L  E D P  K S V V  K K I
601 GATAATCGCA ATAACGTTAT CGGCCTGCTG GAAGATCCGA AATCGGTAGT GAAGAAAATC

221 K R A  V T D S  D E P  P V V  R Y D V  Q N K
661 AAACGTGCGG TCACTGACTC CGACGAGCCG CCGGTAGTTC GCTACGATGT GCAGAACAA

241 A G V  S N L L  D I L  S A V  T G Q S  I P E
721 GCGGGCGTTT CCAACCTGTT GGATATCCTT TCAGCGGTAA CGGGCCAGAG CATCCCAGAA

261 L E K  Q F E G  K M Y  G H L  K G E V  A D A
781 CTGGAAAAAC AGTTCGAAGG CAAGATGTAT GGTCACTCTGA AAGGTGAAGT GGCTGATGCC

281 V S G  M L T E  L Q E  R Y H  R F R N  D E A
841 GTTTCCGGTA TGCTGACTGA ATTGCAGGAA CGCTATCACC GTTTCCGCAA CGATGAAGCC

301 F L Q  Q V M K  D G A  E K A  S A H A  S R T
901 TTCCTGCAAC AGGTGATGAA AGATGGCGCG GAAAAAGCCA GCGCGCACGC TTCCCGTACG

321 L K A  V Y E A  I G F  V A K  R #
961 CTAAGAGCGG TGTACGAAGC GATTGGTTTT GTGGCGAAGC GTTAA

```

Figura 19: Sequência do gene da TrpRS clonado (preto) e a sequência de aminoácidos codificada (azul).

A Figura 20 apresenta o cromatograma do seqüenciamento das mutações pontuais.

Figura 20: Sequências que mostram a mutação pontual de cada mutante. O códon modificado está indicado entre barras pretas sendo o códon original GTC. Como o seqüenciamento foi feito utilizando oligos que amplificam a fita “reverse” as seqüências aparecem sempre como a complementar do gene.

EXPRESSÃO DAS TRPRS EM PRESENÇA DE 1MW

Utilizando a cepa de *E.coli* CY(DE3)pLysS (Quaggio, não publicado; Drapeau et al., 1968) que é auxotrófica a triptofano, pode-se expressar uma proteína introduzindo triptofano ou um análogo de triptofano na sua sequência. Com as TrpRS mutantes clonadas sob o controle do promotor $\phi 10$ do fago T7 (Tabela 2) (Studier et al., 1990) pode-se induzir a expressão através da adição de IPTG, a uma cepa que tem o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor lac UV5. Desta forma realizamos testes de incorporação de 1MW nas TrpRS mutantes e tipo selvagem para verificar se elas eram capazes de aminoacilar o tRNA^{Trp} *in vivo* promovendo incorporação do 1MW na TrpRS que estava sendo super expressa.

Como o 1MW (Aldrich) possui 3% de contaminante que pode ser em parte triptofano, e a célula de *E.coli* possui uma reserva interna de Trp, decidiu-se testar vários protocolos de incorporação do 1MW. Estes protocolos visaram levar a célula a consumir quase todo o Trp, de sua reserva e do meio para que no momento da indução da TrpRS heteróloga, ocorra a síntese de proteínas com o análogo e não com o Trp. Um fator importante é que a RNA Polimerase do T7 possui triptofanos na sua sequência e a incorporação de análogo pode impedir sua capacidade de induzir a transcrição e posterior tradução da TrpRS após a indução por IPTG. Outro fator é que a TrpRS de *E.coli* também apresenta dois triptofanos na sua sequência e não se sabe como a substituição por l-metiltriptofano afetaria a sua atividade. Chow e colaboradores (1992) e Hogue e colaboradores (1996) demonstraram que a mutação do triptofano na posição 92 para Phe praticamente inibe a atividade enzimática da TrpRS do *B.subtilis* e a mutação para Tyr reduz drasticamente a atividade da enzima.

No primeiro teste, centrifugou-se as células quando a densidade óptica se encontrava entre 0,6 e 0,7 e ressuspendeu-se o pellet em um novo meio mínimo contendo o 1MW. Incubou a 37°C e agitação de 250rpm até a densidade óptica do meio se aproximar de 0,8, levando cerca de 45 minutos, e então adicionou-se o IPTG ao meio e incubou as células por mais 3 horas. A análise do conteúdo protéico das células através de SDS-PAGE mostrou que não houve nenhuma indução de TrpRS (dados não mostrados). Uma possível explicação para este resultado negativo é que este protocolo

havia levado a célula ao consumo quase total do Trp de sua reserva e do meio e no momento da indução não havia Trp suficiente para a síntese da RNA Polimerase do T7 ativa. Em adição, a síntese de uma pequena quantidade da TrpRS mutante contendo Trp provavelmente pode ser necessária para promover a incorporação do 1MW nas próximas TrpRS sintetizadas.

Para se obter a indução desejada, com uma quantidade mínima de Trp na célula no momento da indução, modificou-se o protocolo da seguinte maneira: quando o meio apresentava a densidade óptica entre 0,8 e 1,0, transferiu-se as bactérias para meio sem triptofano, contendo 1MW (0,075mg/mL) e após 30 minutos (ao invés de 45 minutos) de incubação a 37°C adicionou-se o IPTG e incubou-se por mais 3 horas. Analisando o gel de SDS-PAGE (Figura 21), observou-se uma boa indução da TrpRS e mutantes.

Figura 21: Gel da indução da TrpRS e mutantes em meio mínimo contendo 1MW. Sendo NI as células antes da adição de IPTG e I células após a adição de IPTG. Quando o meio apresentava a densidade óptica entre 0,8 e 1,0, transferiu-se as bactérias para meio sem triptofano, contendo 1MW (0,075mg/mL) e após 30 minutos (em vez de 45 minutos) de incubação a 37°C adicionou-se o IPTG e incubou-se por mais 3 horas.

As TrpRS induzidas foram identificadas ao se comparar as pistas contendo as proteínas da lise celular antes (NI) e depois (I) da indução com IPTG. Sabendo-se que o peso molecular do monômero de TrpRS é de 36 kDa pode-se observar uma boa indução

da TrpRS e seus mutantes (Figura 21). O deslocamento das mutantes, para baixo no gel em relação ao tipo selvagem, é provavelmente devido a retirada de uma carga pontual da proteína ao se substituir o Asp 135 por aminoácidos sem carga.

PURIFICAÇÃO DA TRPRS E MUTANTES

As proteínas expressas na Figura 21 foram purificadas segundo o protocolo descrito no materiais e métodos. Neste protocolo utilizou-se uma coluna de hidroxiapatita que garante uma maior pureza e menor perda de material (Chow et al., 1992).

Figura 22: Gel de SDS-PAGE 15% da purificação da TrpRS D135T que foi expressa em meio mínimo na presença de 1MW. Em A marcador de peso molecular, B lise celular antes da indução, C lise celular após indução, D sobrenadante após a lise por pressão, E coletado após coluna de DEAE Sepharose Fast Flow, F coletado após coluna de Hidroxiapatita HA ultrogel.

Na Figura 22 pode-se observar, na pista C o extrato total das células após indução, observa-se uma forte banda com 36 kDa referente a TrpRSD135T induzida. A pista D corresponde ao sobrenadante após a lise celular por “French Press” e esta fração foi aplicada na coluna de DEAE Sepharose Fast Flow e o coletado desta coluna está na pista E. A fração da pista E foi aplicada na coluna de HA Hultrogel (hidroxiapatita) após o ajuste da concentração de fosfato para 100mM e as frações eluidas se encontram na pista F

Como controle expressou-se a TrpRS e mutantes em meio rico (2xTY, Sambrook et al., 1989), que contém Trp. As etapas de purificação foram as mesmas e o perfil da purificação se repetiu como na Figura 22.

Enquanto as quatro mutantes (TrpRSD135A, TrpRSD135C, TrpRSD135S e TrpRSD135T) foram purificadas utilizando este protocolo, a mutante TrpRS D135V não foi purificada pois após a sua expressão em meio contendo Trp ou 1MW, ela fica toda na fração insolúvel depois da lise celular por “French Press”. Este resultado despertou a dúvida sobre o correto enovelamento da proteína, pois como o resíduo mutado se encontra em uma α -hélice com sequência conservada (chamada de hélice de especificidade), uma vez perdida esta estrutura, perderia-se a atividade da enzima.

Para averiguar a estrutura secundária das enzimas purificadas contendo Trp e devidamente dosadas (Hartree, 1972) utilizamos a técnica de dicroísmo circular.

DICROÍSMO CIRCULAR

Utilizando as condições descritas em materiais e métodos, obteve-se os espectros de dicroísmo circular da TrpRS e os mutantes purificados após a expressão em meio de cultura contendo triptofano (Figura 23). Utilizando os programas K2D (Andrade et al., 1993) e CONTIN (Venyaninov et al., 1991; Provencher et al., 1981) pode-se obter predições para os valores percentuais das estruturas secundárias para a TrpRS wt e cada um dos mutantes (Tabela 3).

O K2D é um programa baseado em uma rede neuronal que pode detectar padrões e correlações entre os dados de elipticidade da proteína e o banco de dados do programa que é constituído por valores de elipticidade de 18 proteínas, que possuem a sua estrutura resolvida. Estes dados são utilizados como padrão para “treinar” a rede neuronal para desconvoluir os espectros de CD (Andrade et al., 1993; Greenfield, 1996). Os valores de elipticidade molar da amostra correspondem aos valores de entrada no programa e as porcentagens das diferentes estruturas adotadas pela proteína (Tabela 3) correspondem aos diferentes terminais de saída (Greenfield, 1996).

O CONTIN é um programa que utiliza uma variação do método de mínimos quadrados para resolver um espectro de CD através de uma combinação linear de um banco de dados de espectros de CD de proteínas com a estrutura caracterizada (Greenfield, 1996; Provencher et al., 1981). Este banco de dados pode ser modificado para uma melhor adequação dos resultados, como por exemplo a inserção de espectros de proteínas desnaturadas (Provencher et al., 1981; Venyaminov et al., 1991; Venyaminov et al., 1993). Para a análise utilizou-se como referência o banco de dado padrão que inclui somente 16 proteínas com estruturas nativas resolvidas (Provencher et al., 1981).

Figura 23: Espectro de CD da TrpRS e mutantes em 100mM KCl e 50mM K_2HPO_4 pH 6,8, a 25°C.

Tabela 3: Valores preditos para as estruturas secundárias, através dos espectros de dicroísmo circular da TrpRS e mutantes.

proteína	K2D*			CONTIN@			
	α -hélice	β -sheet	random	α -hélice	β -sheet	β -turn	random
Wt	0.38	0.17	0.45	0.36	0.22	0.16	0.26
A	0.44	0.17	0.39	0.43	0.18	0.15	0.25
C	0.34	0.17	0.49	0.37	0.21	0.15	0.27
S	0.40	0.20	0.40	0.35	0.19	0.15	0.31
T	0.36	0.19	0.45	0.37	0.20	0.15	0.27

* - O programa utilizado se encontra disponível no site <http://kal-el.ugr.es/k2d/spectra.html>, e corresponde a versão que contém um banco de dados com 18 proteínas. Os valores de elipticidade molar utilizados devem ser multiplicados por 0,001 (Andrade et al., 1993).

@ - O banco de dados utilizado para este programa foi o Prov_4.GRP que contém 16 proteínas como referência, mas não contém espectro de proteínas desnaturadas.

Os valores de α -hélice preditos pelo K2D para a TrpRS wt corresponde a 38% e os mutantes variam de 34-44%. Já para o CONTIN a TrpRS wt possui 36% de α -hélice e os mutantes variam entre 35 – 43%. Para a predição de β -sheet os valores se apresentaram menos variáveis no K2D para a TrpRS wt (17%) e mutantes (17-20%); o CONTIN também apresentou uma constância um pouco maior para os valores de β -sheet da TrpRS wt (22%) e mutantes (18-21%).

As estruturas classificadas como “random-coil” pelo K2D também apresentam valores próximos similares da TrpRS wt (45%) e mutantes (39-45%), já o CONTIN divide as estruturas não α -hélice ou folha- β em “random-coil” e β -turn. O valor de β -turn da TrpRS-wt (16%) é praticamente idêntico ao das mutantes (15%) e a variação observada se encontra nas estruturas random que a TrpRS wt apresentou 26% e as mutantes apresentam valores entre 26-31%.

Os valores de α -hélice para a TrpRS e mutantes se encontram dentro da faixa de erro de 10-20% que está englobado nas técnicas de dosagem de proteína e sensibilidade da técnica. Outra fonte de erro está na desconvolução feita pelos programas, que nunca consegue uma equação que descreva 100% o espectro analisado, já que o programa se baseia em comparações de um número limitado de estruturas pré-determinadas.

Através da análise da estrutura cristalizada por Doublé e colaboradores (1995) e da modelagem molecular que foi realizada, para a construção do nosso modelo da TrpRS de *E.coli* pode-se determinar que a quantidade de α -hélice é de 61,7%, folhas- β é de 12,6% e estrutura randômica é de 25,7%. A principal diferença entre os valores obtidos através do dicroísmo circular e a estrutura atual é que a quantidade de α -hélice é subestimada pelos programas de desconvolução dos espectros de dicroísmo circular. Pode-se concluir que a nossa análise de dicroísmo circular não fornece os valores quantitativos quanto a estrutura secundária da TrpRS mas serve somente como uma ferramenta qualitativa e comparativa. Com estes resultados considerou-se que as proteínas mutantes não haviam sofrido grandes mudanças na sua estrutura secundária devido a mutação pontual quando comparadas com a estrutura da TrpRS tipo selvagem. A possibilidade de ter havido pequenas mudanças na sua estrutura, porém, não pode ser descartada.

FLUORESCÊNCIA DAS TRPRS

Para averiguar a incorporação de 1MW na TrpRS e mutantes expressas em meio mínimo na presença do análogo foi utilizado os seus espectros de excitação de fluorescência. O 1-metiltryptofano apresenta o seu espectro de excitação deslocado para o vermelho em relação ao do tryptofano (Figuras 2 e 24) e desta forma pode-se determinar se a proteína apresenta o análogo incorporado em sua estrutura primária através da comparação dos espectros das proteínas expressa em meio rico contendo Trp e meio mínimo contendo 1MW.

Os espectros foram obtidos em 8M uréia, para que pudesse ser observado apenas o sinal do 1MW e não se observar um deslocamento espectral causado pela mudança do ambiente ao redor do aminoácido, resultante de uma pequena mudança na estrutura terciária. Se toda a proteína se encontra denaturada e os tryptofanos expostos a um mesmo ambiente esta alteração não será observada (Schmid, 1997).

Através dos espectros de excitação de fluorescência (Figura 24), pode-se verificar que a incorporação do 1MW aconteceu somente em uma pequena fração das moléculas das TrpRS superexpressas. Os deslocamentos observado são somente uma pequena fração do que seria esperado se 100% dos tryptofanos fossem trocados por 1MW (comparando o espectro de excitação do 1MW da Figura 24A). Estes níveis de incorporação não são os melhores para a expressão de proteínas com incorporação de análogos de Trp.

Como observado na Figura 24B, todos os mutantes apresentaram uma pequena incorporação de 1MW na sua sequência quando comparados com o mesmo mutante obtida após expressão apenas com Trp. Os mutantes D135S, D135T e D135 C apresentaram uma maior variação no espectro, indicando que a incorporação nestes mutantes deve ter sido maior que no caso do mutante D135A, que apresentou pouca incorporação do análogo de Trp.

A TrpRS-wt também apresentou uma pequena incorporação de 1MW na sua estrutura, indicando que a simples super expressão da proteína selvagem pode também resultar na incorporação de uma pequena quantidade do 1MW na TrpRS expressa.

(A)

(B)

Figura 24: Espectro de fluorescência. (A) espectro total de Fluorescência (com o espectro do 1-metiltryptofano (1MW)). (B) visão ampliada de uma faixa de comprimento de onda. Sendo as proteínas: TrpRS tipo selvagem expressa em meio contendo Trp (WTW) e 1MW (WT1MW), a TrpRSD135A expressa em meio contendo Trp (AW) e 1MW (A1MW), a TrpRSD135C expressa em meio contendo Trp (CW) e 1MW (C1MW), a TrpRSD135S expressa em meio contendo Trp (SW) e 1MW (S1MW) e a TrpRSD135T expressa em meio contendo Trp (TW) e 1MW (T1MW).

Uma ressalva dos experimentos apresentados até agora é que a presença de uma certa quantidade de Trp para a síntese de TrpRS mutantes provavelmente é necessária para que estas proteínas possam ser capazes de incorporar o análogo nas proteínas sintetizadas subsequentemente, já que os Trp da sua sequência primária são importantes para sua atividade (Hogue et al., 1996; Chow et al., 1992).

ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA *in vitro*

Formação de Triptofano-hidroxamato

Na presença de Trp e ATP, a TrpRS catalisa a seguinte reação:

Na presença de 1M de hidroxilamina, o Trp-AMP é convertido não cataliticamente em Trp-hidroxamato e AMP (Davie et al., 1956, Davie, 1964; Lipmann et al., 1945). O Trp-hidroxamato pode ser detectado pela formação de um complexo de cor amarela com Fe^{3+} em meio ácido. Pequenas variações no meio reacional levam a alteração da formação do complexo triptofano-hidroxamato com Fe^{3+} , gerando um erro considerável na determinação da atividade da enzima (Schweet, 1955).

As reações feitas como descritas por Davie (1964), geram um alto desvio nos valores da leitura de absorbância a 460nm para medidas em duplicatas de tubos diferentes. Afim de minimizar a variação das medidas, modificou-se o protocolo de reação e detecção do composto formado. Inseriu-se uma etapa de centrifugação das amostras após a reação com a solução de cloreto férrico, para retirar as proteínas precipitadas da solução e torná-la mais homogênea.

Outra modificação feita foi a inserção de um tempo de espera de 20 minutos para a detecção da absorbância da amostra. Um experimento realizado no qual se mediu a absorbância a cada 2 minutos, indicou que após 20 minutos de reação a absorbância se tornava mais constante e, nos minutos iniciais, a variação da medida era muito grande (dados não mostrados).

Como a variação do sinal de atividade enzimática no sistema é muito grande utilizou-se este experimento apenas como indicativo de atividade para as enzimas, quando comparadas a TrpRS-wt, que teve a sua atividade considerada 100%. Atividades menores do que 10% não serão detectadas com confiança. Para detectar atividades baixas precisa-se empregar ensaios de intercâmbio de pirofosfato.

A Figura 25 mostra o ensaio de formação do triptofano-hidroxamato com os valores normalizados, considerando o valor da TrpRS-wt em 15 minutos de reação como

1. Analisando os dados da Figura 25 observa-se que somente a TrpRS-wt é capaz de catalisar a reação da formação do composto triptofanil-AMP, enquanto que os mutantes apresentaram um valor bem inferior que a TrpRS-wt, semelhantes aos valores dos controles negativos (sem ATP e sem Trp).

Figura 25: Gráfico do ensaio de formação de triptofano-hidroxamato. Sendo que as amostras WT (TrpRS-wt), A (TrpRSD135A), C (TrpRSD135C), S (TrpRSD135S) e T (TrpRSD135T) contém todos os reagentes. As amostras WT-W, A-W, C-W, S-W e T-W correspondem ao ensaio sem triptofano e as amostras WT-ATP, A-ATP, C-ATP, S-ATP, T-ATP correspondem ao ensaio sem ATP. O experimento foi realizado em quintuplicata e obteve-se a média dos valores com os respectivos desvios para cada medida que encontra indicado como barra de erro sobre os pontos.

Pode-se observar a baixa atividade enzimática das TrpRS mutantes ao observar-se a inclinação das curvas entre os tempos de 7 e 15 minutos. Durante estes tempos a inclinação das retas para as mutantes mantém-se muito próxima dos valores das inclinações dos controles negativos de cada uma. Em contrapartida a TrpRS tipo selvagem

apresenta uma grande inclinação quando comparada com os controles negativos, indicando reação. Dentre os quatro mutantes, o D135A apresentou a maior atividade, que ainda é menor do que o controle negativo do tipo selvagem na ausência de triptofano e apresenta quase a mesma inclinação que os controles negativos dela mesma, indicando pouca reação. Logo estes resultados indicam que as atividades dos mutantes utilizando triptofano como substrato são muito próximas de zero ao comparar a inclinação de suas retas e de seus controles negativos e quando comparadas a atividade da enzima tipo selvagem.

Estes resultados eram esperados para a reação com triptofano, pois todos os mutantes possuem uma modificação em um aminoácido (D135) que compõe o sítio ativo e que interage diretamente com o nitrogênio (N₁) do anel indólico do triptofano, com a finalidade de mudar sua especificidade para 1-metiltryptofano (Doublié et al., 1995).

Figura 26: Ensaio de formação de 1-metiltryptofano-hidroxamato utilizando 1MW. Sendo que as amostras wt (TrpRS-wt), a (TrpRSD135A), c (TrpRSD135C), s (TrpRSD135S) e t (TrpRSD135T) contém todos os reagentes. As amostras wtw, aw, cw, sw e tw correspondem ao ensaio sem 1MW e as amostras wtatp, aatp, catp, satp, tatp correspondem ao ensaio sem ATP. Os valores representam valores médios de dois experimentos.

Afim de averiguar a atividade com 1MW das TrpRS-wt e mutantes, fez-se o experimento utilizando 1MW no lugar do Trp (Figura 26).

O resultado indica que o mutante D135A, possui atividade enzimática um pouco maior que as outras mutantes e o TrpRS-wt. O TrpRS-wt apresentou valores próximos ao da TrpRSD135S e TrpRSD135T. Já a mutante D135C apresentou valores não tão expressivos nos dois experimentos, com triptofano e com 1MW. Estes valores não são tão significativos quando compara-se as inclinações das curvas com os respectivos controles negativos. Todas as enzimas apresentam valores de inclinação da reta muito próximos aos dos controles negativos, indicando uma baixa atividade enzimática.

Não há uma curva padrão do complexo triptofano-hidroxamato e Fe^{3+} , pois não há triptofano-hidroxamato e 1-metiltryptofano-hidroxamato disponíveis comercialmente. Por causa da baixa sensibilidade do método decidiu-se utilizá-lo apenas como indicativo de atividade enzimática.

Deve-se ressaltar que a evidência de uma possível reação *in vitro* com a TrpRS D135A é tênue pois os valores se encontram muito próximos do limite de sensibilidade do ensaio. O melhor método para medir a reação catalisada pela TrpRS e seus mutantes parece ser através de ensaios de intercâmbio de pirofosfato, que é capaz de indicar se a TrpRS mutante é capaz de ligar 1MW e condensá-lo com ATP, gerando 1MW-AMP, *in vitro*.

Intercâmbio de Pirofosfato

O ensaio de intercâmbio de pirofosfato consiste em medir a habilidade da enzima catalisar a incorporação de pirofosfato radioativo em ATP, numa solução contendo ATP e triptofano.

O passo limitante deste processo é a condensação de ATP e W para formar o complexo enzima-intermediário (TrpRS:Trp-AMP) (Knorre et al., 1974). Logo, a velocidade de formação de ATP radioativo pode ser utilizada para determinar o V_{max} e o

K_M ATP e K_M W da enzima para esta reação. Esta reação permite que a enzima realize a adenilação do Trp, e em alta concentração de pirofosfato se desloca a reação no sentido contrário, regenerando o ATP. A presença de pirofosfato com ^{32}P , gera ATP radioativo (^{32}P) que é adsorvido no carvão ativo, enquanto que o pirofosfato não adsorve, permitindo a sua detecção (Knorre et al., 1974; Nevinsky et al., 1974; Trezeguet et al., 1986; Merle et al., 1986; Sever et al., 1996; Praetorius-Ibba et al., 2000). A solução de inativação da reação é composta de ácido tricloroacético para precipitar a proteína, carvão ativo para adsorver o ATP e pirofosfato de sódio não marcado para saturar o carvão e evitar a adsorção de pirofosfato radioativo (Trezeguet et al., 1986; Merle et al., 1986; Sever et al., 1996).

Uma vez parada a reação, ela é filtrada em discos GF/C da Whatmann, e então o carvão ativo é lavado com 40 mL de solução de pirofosfato não marcado e gelada, para retirar o excesso de pirofosfato que tenha ficado no filtro ou no carvão. A lavagem com etanol é para facilitar a secagem do filtro, que somente após estar seco é colocado com líquido de cintilação para ser contado (Sever et al., 1996). As radioatividades medidas são proporcionais a quantidade de ATP radioativo produzido pela TrpRS, e que facilmente pode ser convertido em quantidade de ATP total produzido pela enzima, caracterizando assim a velocidade da reação, uma vez que os ensaios serão realizados a tempo fixo.

A TrpRS obedece cinética de Michaelis-Menten e através de ensaios onde se fixa a concentração de Trp e varia-se a concentração de ATP, pode-se determinar o K_M e k_{CAT} da enzima para o ATP. O mesmo é possível para o Trp ao se fixar a concentração de ATP e variar a concentração de Trp (Knorre et al., 1974; Nevinsky et al., 1974; Trezeguet et al., 1986; Merle et al., 1986). Pode-se utilizar 1MW neste ensaio e se determinar o K_M e k_{CAT} da TrpRS para este substrato.

Figura 27: Ensaio de intercâmbio de pirofosfato com TrpRS tipo selvagem 100nM com ATP e W em concentrações saturantes.

Primeiramente foi feito um ensaio com várias concentrações de TrpRS para se determinar a concentração que apresentaria uma resposta linear em função do tempo. Após algumas tentativas determinou-se que as melhores condições seriam utilizar uma concentração de 100nM de enzima por reação e parar a reação após 60 segundos como pode se observar na Figura 27.

Figura 28 : Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRS tipo selvagem. Os gráficos mostram os ensaios com Trp, ATP e 1MW com as concentrações em μmol/L e a velocidade da reação em mol/L.s de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[reagente]$ forneceram os valores de K_M k_{CAT} através da equação da reta. Quando $[ATP]$ foi variada utilizamos 2mM de Trp, quando $[W]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP e quando a $[1MW]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP.

Figura 29 : Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRSD135A. Os gráficos mostram os ensaios com Trp, ATP e 1MW com as concentrações em $\mu\text{mol/L}$ e a velocidade da reação em mol/L.s de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[\text{reagente}]$ forneceram os valores de K_M k_{CAT} através da equação da reta. Quando $[ATP]$ foi variada utilizamos 2mM de Trp, quando $[W]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP e quando a $[1MW]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP.

Figura 30: : Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRSD135C. Os gráficos mostram os ensaios com Trp, ATP e 1MW com as concentrações em $\mu\text{mol/L}$ e a velocidade da reação em mol/L.s de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[\text{reagente}]$ forneceram os valores de K_M k_{CAT} através da equação da reta. Quando $[ATP]$ foi variada utilizamos 2mM de Trp, quando $[W]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP e quando a $[1MW]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP.

Figura 31: Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRSD135S. Os gráficos mostram os ensaios com Trp, ATP e 1MW com as concentrações em $\mu\text{mol/L}$ e a velocidade da reação em $\text{mol/L}\cdot\text{s}$ de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[reagente]$ forneceram os valores de K_M k_{CAT} através da equação da reta. Quando $[ATP]$ foi variada utilizamos 2mM de Trp, quando $[W]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP e quando a $[1MW]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP.

Figura 32: Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRSD135T. Os gráficos mostram os ensaios com Trp, ATP e 1MW com as concentrações em $\mu\text{mol/L}$ e a velocidade da reação em mol/L.s de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[\text{reagente}]$ forneceram os valores de K_M e k_{CAT} através da equação da reta. Quando [ATP] foi variada utilizamos 2mM de Trp, quando [W] foi variada utilizamos 2mM de ATP e quando a [1MW] foi variada utilizamos 2mM de ATP.

Com as condições acertadas, o experimento foi realizado para a TrpRS tipo selvagem e as mutantes TrpRSD135A, TrpRSD135C, TrpRSD135S e TrpRSD135T. As enzimas tiveram o K_M e k_{CAT} determinados para Trp, ATP e 1MW a partir da regressão linear das curvas dupla-recíproca (Figuras 28, 29, 30, 31 e 32)

Tabela 4: Valores das constantes cinéticas dos substratos Trp, ATP e 1MW para a TrpRS tipo selvagem e mutantes.

Enzima TrpRS	K_M (Trp) (μM)	K_{CAT} (Trp) (s^{-1})	K_{CAT}/K_M (Trp) (rel)	K_M (ATP) (μM)	K_{CAT} (ATP) (s^{-1})	K_{CAT}/K_M (ATP) (rel)	K_M (1MW) (μM)	K_{CAT} (1MW) (s^{-1})	K_{CAT}/K_M (1MW) (rel)
WT	13,0 (1,2)	181,8 (4,6)	1,00	82,7 (13,3)	274,3 (11,0)	1,00	12,9 (5,5)	18,5 (2,0)	1,00
D135A	11,6 (3,0)	17,4 (1,1)	0,11	87,5 (20,1)	19,0 (1,1)	0,07	15,9 (1,2)	18,8 (3,4)	0,82
D135C	45,3 (5,9)	55,4 (1,8)	0,09	180,9 (63,0)	39,4 (3,4)	0,07	15,7 (5,5)	55,1 (4,9)	2,45
D135S	21,8 (6,5)	22,8 (1,8)	0,07	197,5 (50,5)	28,9 (1,9)	0,04	11,6 (4,2)	23,1 (2,1)	1,39
D135T	13,8 (2,8)	29,9 (1,6)	0,15	85,4 (25,6)	28,1 (2,1)	0,10	16,3 (4,6)	25,9 (1,9)	1,11

Os erros das medidas se encontram entre parênteses

Tabela 5: Valores das relações das constantes cinéticas entre dois substratos que competem pelo mesmo sítio de ligação

Enzima TrpRS	$K_M(1MW)/K_M(Trp)$	$k_{CAT}(1MW)/k_{CAT}(Trp)$	$k_{CAT}/K_M(1MW)/k_{CAT}/K_M(Trp)$ (relativo)	$k_{CAT}/K_M(1MW)/k_{CAT}/K_M(Trp)$ (absoluto)
WT	0,99	0,10	1,00	0,10
D135A	1,37	1,08	7,90	0,79
D135C	0,35	0,99	28,70	2,87
D135S	0,53	1,01	19,00	1,90
D135T	1,18	0,87	7,30	0,73

Os dados das Figuras 28, 29, 30, 31 e 32, estão resumidos nas Tabelas 4 e 5. Os valores de K_{CAT} e K_M que obteve-se para a enzima tipo selvagem são compatíveis com os valores da TrpRS de *E.coli* na literatura ($K_{M(Trp)} = 18,2 \mu M$; $K_{M(ATP)} = 132 \mu M$; $k_{CAT} = 111 s^{-1}$) (Sever et al., 1996) Através da análise dos dados de K_M e k_{CAT} (Tabela 4) pode-se observar que k_{cat} das mutantes para formar Trp-AMP diminuiu ao se comparar a TrpRS tipo selvagem, mas quando se utilizou 1MW o k_{CAT} das mutantes apresentou valores iguais (TrpRSD135A) ou maiores do que a TrpRS tipo selvagem.

O K_M para Trp e ATP aumentam para TrpRSD135C, TrpRSD135S e TrpRSD135T. Para a TrpRS135A, o K_M para Trp diminui e o K_M para ATP aumentou quando comparado ao da tipo selvagem (Tabela 4). O K_M para 1MW aumenta para as mutantes TrpRSD135A, TrpRSD135C e TrpRSD135T e diminui para a mutante TrpRSD135S comparada ao valor da enzima tipo selvagem.

A relação k_{CAT}/K_M do Trp e ATP para as mutantes é sempre menor que a da enzima tipo selvagem. Por outro lado, para 1MW as mutantes TrpRSD135C e TrpRSD135S apresentam valores de k_{CAT}/K_M maiores (2,5 vezes, 1,4 vezes respectivamente) que a tipo selvagem. A TrpRSD135A apresenta um valor de k_{CAT}/K_M para 1MW um pouco menor que ao da tipo selvagem e a TrpRSD135T apresenta um valor um pouco maior. Logo, pode-se concluir que as mutantes D135S e D135C utilizam 1MW como substrato mais eficientemente do que a proteína tipo selvagem. Esta distinção também é aparente quando compara-se os valores cinéticos obtidos para Trp com os valores obtidos para 1MW.

A relação $K_{M(1MW)}/K_{M(Trp)}$ apresenta valores menores para as mutantes TrpRSD135C e TrpRSD135S (aproximadamente 3 e 2 vezes respectivamente) quando comparadas a tipo selvagem indicando maior afinidade para 1MW do que para Trp (Tabela 5). De forma oposta, as mutantes TrpRSD135A e TrpRSD135T apresentaram valores maiores na relação $K_{M(1MW)}/K_{M(Trp)}$ indicando maior afinidade para Trp do que para 1MW (Tabela 5). Os valores da relação $k_{CAT}/K_{M(1MW)} / k_{CAT}/K_{M(Trp)}$ são sempre maiores para as mutantes quando comparadas a enzima tipo selvagem, principalmente para as mutantes TrpRSD135C e TrpRSD135S.

Os valores de $K_{M(1MW)}/K_{M(Trp)}$ e $k_{CAT}/K_{M(1MW)} / k_{CAT}/K_{M(Trp)}$ (Tabela 5) indicam a especificidade da enzima em discriminar dois substratos que competem pelo mesmo sítio

de ligação, uma situação que esta enzima enfrentará no interior da célula quando na presença dos dois substratos (Trp e 1MW). Os valores de $k_{CAT}/K_M (1MW) / k_{CAT}/K_M (Trp)$ estão apresentados em duas formas na Tabela 5. Na penúltima coluna os valores estão normalizados em relação a enzima tipo selvagem, indicando que todas as enzimas mutantes apresentam uma melhora na habilidade de utilizar 1MW como substrato quando comparado com a enzima tipo selvagem. Na última coluna, os valores absolutos desta razão estão apresentados e mostram que somente os mutantes D135S e D135C utilizam 1MW mais eficientemente como substrato do que Trp.

As mutações pontuais realizadas no resíduo Asp 135 por Ala, Cys, Ser e Thr resultaram na diminuição da atividade enzimática com os substratos Trp e ATP quando comparadas a tipo selvagem. Em relação ao 1MW todas as mutantes apresentaram maior seletividade na discriminação dele com Trp, mas as mutantes TrpRSD135C e TrpRSD135S apresentaram também maior especificidade por 1MW do que a tipo selvagem.

Pode-se observar também que o aumento do K_M para Trp, ATP e 1MW para as mutantes em relação a tipo selvagem não chegam a ser superiores a 4 vezes para a mutante TrpRSD135C. A redução do k_{CAT} para Trp e ATP das mutantes em relação a tipo selvagem são sempre superiores a 6 vezes o valor da tipo selvagem, indicando assim que as mutações provocaram uma preda maior na estabilização do estado de transição do que do que na acomodação dos substratos no sítio ativo. Quando observa-se os valores de K_M e k_{CAT} para 1MW pode-se observar que a única variação significativa seria o aumento de 3 vezes no k_{CAT} para a mutante TrpRSD135C em relação a tipo selvagem, indicando um aumento na estabilização do estado de transição para a reação de ativação do aminoácido.

O único estudo que utilizou enzimas com mutações envolvendo os aminoácidos que interagem diretamente com o triptofano no sítio ativo foi o de Praetorius-Ibba e colaboradores (2000). Neste trabalho, três mutantes de TrpRS de *Bacillus stearothermophilus* envolvendo o Asp 132 (Asp135 em *E.coli*) foram produzidos: D132N, D132S e D132T. Foi observado uma drástica diminuição na habilidade destes mutantes em aminoacilar o $tRNA^{Trp}$ (k_{CAT}/K_M diminui 200-3000 vezes). Dados sob

cinética de intercâmbio de pirofosfato não foram apresentados mas os autores constataram que foi observada atividade para a mutante D132N.

Possivelmente novas mutações em outras posições ao redor do sítio ativo poderiam auxiliar estas mutações, criando espaço para a acomodação do grupo metil-N₁ dos análogos de triptofano. Uma possível mutação seria a troca de uma das duas prolinas que se localizam antes (P128) e após (P145) a α -hélice de especificidade, o que permitiria uma maior flexibilidade de movimento para a α -hélice e possivelmente acomodaria melhor o 1MW no sítio ativo. Praetorius-Ibba e colaboradores (2000) demonstraram que esta mutação não afeta tanto a atividade da enzima, o que torna esta mutação interessante para auxiliar na mudança da especificidade da TrpRS.

EXPRESSÃO DA TROPONINA C (F29W) EM MEIO CONTENDO 1-METILTRIPTOFANO

O fato de ter sido observado uma pequena incorporação de 1MW em TrpRS-wt quando superexpressa em *E.coli*, fez-se necessário testar se este resultado era devido a uma característica da *E.coli* ou se era devido a superexpressão da TrpRS-wt. Com esta finalidade, expressou-se um mutante de Troponina C com um triptofano na posição 29 na presença de triptofano ou de 1MW. Depois das purificações das respectivas proteínas, obteve-se os espectros de fluorescência de excitação e emissão mostrados na Figura 33. Estes espectros indicaram que não houve incorporação de 1MW na TnCF29W já que eles são sobreponíveis e não se observa o deslocamento para o vermelho no espectro de excitação, esperado para a proteína com 1MW. Com estes resultados fica claro que a *E.coli* não é capaz de incorporar 1MW em proteínas em condições normais (isto é, em níveis “normais” de TrpRS citoplasmática). Isso provavelmente é devido ao impedimento estérico causado pelo Asp135 da TrpRS-wt. Este resultado é consistente com os dados publicados por Hogue e colaboradores (1993) e Ross e colaboradores (1997), que mostram que 1MW não é incorporado em proteínas por *E.coli*. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que uma simples super-expressão de TrpRS-wt pode resultar na incorporação parcial de 1MW em proteínas expressas em *E.coli* como

observado anteriormente nos ensaios de incorporação de 1MW na TrpRS, que apresentaram uma pequena incorporação do análogo de W na sua sequência primária.

Figura 33: Espectros de Fluorescência de excitação (a) e emissão (b) para a troponina C com W (W) e 1MW (1MW) na presença de cálcio. Todos os espectros foram normalizados

CO-EXPRESSÃO DA TnCF29W (INDUZÍVEL) E TrpRS (CONSTITUTIVA)

Possivelmente a baixa incorporação de 1MW observada na própria TrpRS, quando expressa em meio mínimo contendo 1MW, seja causada pela inativação da enzima ao se introduzir o análogo de Trp na sua estrutura, pois o k_{CAT}/K_M da proteína tipo selvagem para 1MW era somente 10 vezes menor do que para Trp (Tabelas 4 e 5). A partir deste raciocínio, construiu-se um novo vetor que expressasse a TrpRS mutante constitutivamente (com Trp) antes da indução da segunda proteína recombinante de interesse. Escolheu-se a TnCF29W, uma troponina C com um triptofano na posição 29, para os testes devido a facilidade de purificação, os altos níveis de expressão que se obtém desta proteína, e o fato que as análises de fluorescência desta proteína se encontram bem descritas na literatura. Especificamente, a sua fluorescência aumenta 3 vezes em resposta as mudanças estruturais induzidas pela ligação de Ca^{2+} (Pearlstone et al., 1992).

O cDNA da TnCF29W está clonado entre os sítios de NdeI e BamHI do pET-3a (Figura 34) (Pearlstone et al., 1992). As construções das TrpRS mutantes se encontram entre os sítios de NdeI e HindIII do mesmo vetor sob o controle do promotor interno do gene da TrpRS (Figura 34). Resolvemos clonar a TrpRS com o seu próprio promotor (de *E.coli*) após ao cDNA da TnCF29W. Para isso, fizemos um PCR utilizando um oligonucleotídeo que hibridizasse antes do promotor da TrpRS e mudasse o sítio de HindIII por um sítio de restrição para BamHI. Para este PCR utilizou-se a construção inicial (pTrpRS-Hind) (Figura 16), feita a partir da clonagem do gene da TrpRS, com o próprio promotor (Figuras 15 e 16), da cepa BL21(DE3)pLysS (Studier et al., 1990).

Figura 34: Esquema da construção do plasmídeo contendo a TnCF29W (sob controle do promotor $\phi 10$ da T7RNA Polimerase) e a TrpRS sob o controle do promotor interno (Pi).

Figura 35: Plasmídeo de expressão induzível da TnCF29W e constitutiva da TrpRS.

Utilizando-se a reação de PCR com os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1, foi possível obter o gene da TrpRS com o seu próprio promotor entre os sítios de BamHI e HindIII. Após purificação e digestão com estas enzimas de restrição, pôde-se fazer a reação de ligação da TrpRS com o vetor da TnCF29W para produzir o pTnCF29W-TrpRS (Figuras 34 e 35). Esta clonagem elimina o terminador de transcrição entre os sítios de BamHI e HindIII (Studier et al., 1990) no pTnCF29W. A construção foi confirmada com o sequenciamento do DNA.

Figura 36: Gel de SDS-PAGE 15% de indução da TnCF29W utilizando a construção da Figura 37.

Observa-se nas pistas não-induzidas (NI) e induzidas (I) da nova construção uma banda de peso 20 kDa, que indica a expressão da TnC (Figura 36). O fato de apresentar proteína antes da indução é devido a expressão basal que não deve ter sido eficientemente reprimida pelo controle pLysS da célula (Studier et al., 1990).

Pode-se observar uma fraca indução de uma proteína de 36 kDa na pista I na Figura 36 que deve corresponder a uma pequena indução de TrpRS após a indução com IPTG. Nesta construção (Figura 36) a expressão basal de TrpRS possui Trp na sua sequência, que podem ser importantes para a sua atividade (Hogue et al., 1996).

Utilizou-se a construção da TnCF29W-TrpRSwt descrita na Figura 35 para a inserção das mutações pontuais na TrpRS. Para isto foi feito a digestão dos plasmídeos pTnCF29W-TrpRS, pTrpRSD135A, pTrpRSD135C, pTrpRSD135S e pTrpRSD135T, com a enzima Bsu36I que clivaria o DNA no início do gene da TrpRS e a HindIII que iria clivar no final do gene (vide Figuras 35 e 37). Os fragmentos purificados foram então clonados entre os mesmos sítios do pTnCF29W-TrpRSwt (Figura 37). A confirmação da inserção com a mutação no gene da TrpRS foi feita através do sequenciamento do DNA.

Após a confirmação das mutações e do gene completo incluindo o promotor da TrpRS (Hall et al, 1982), transformou-se células da cepa CY(DE3)pLysS (Drapeau et al., 1968; Quaggio não publicado) com estes plasmídeos. Fez-se a indução da TnCF29W em meio mínimo como descrito em materiais e métodos, utilizando a condição que havia demonstrado a melhor incorporação de 1MW na TrpRS. Depois da indução das proteínas, realizou-se a purificação da TnCF29W. A Figura 38 apresenta um gel de SDS-PAGE da expressão e purificação da TnCF29W expressa a partir do plasmídeo pTnCF29W-TrpRSD135A.

Figura 37: Esquema da inserção das mutações pontuais na TrpRS do plasmídeo TnCF29W-TrpRS.

Figura 38: Gel de SDS-PAGE 15% da purificação da TnCF29W expressa em meio contendo 1MW. Utilizando o vetor pTnCF29W-TrpRSD135A. Sendo: I: amostra não induzida, II: amostra induzida, III: proteína purificada e IV: marcador de peso molecular.

FLUORESCÊNCIA DA TnCF29W QUANDO EXPRESSA NA PRESENÇA DOS MUTANTES DE TRPRS

Com a TnCF29W expressa em meio contendo 1MW e a TrpRS expressa de forma constitutiva, esperava-se observar a incorporação de 1MW na TnCF29W. Para averiguar a incorporação do análogo, obteve-se os espectros de excitação de fluorescência das TnCF29W expressas em meio contendo triptofano (TnCF29W) ou contendo 1MW (TnCF29W-TrpRS-wt e mutantes) (Figura 39).

Os espectros de excitação de fluorescência das proteínas expressas com 1MW a partir da construção das Figuras 35 e 37, mostraram-se sobreponíveis com o espectro da TnC expressa com triptofano como pode ser observado na Figura 39. A incorporação parcial que observou-se para a TrpRS quando super expressa (a partir do promotor do fago T7) (Figura 24) não foi observada para a TnC super expressa na presença da TrpRS mutante constitutiva: não detectou-se um deslocamento para o vermelho no espectro de excitação (Figura 39). As possíveis causas para a não incorporação do 1MW neste caso podem ser devido, além da baixa atividade de incorporação de 1MW pela TrpRS mutante, à baixa produção de TrpRS quando sob controle do promotor interno (Hall et al, 1982).

(a)

(b)

Figura 39: Continuação na próxima página)

Figura 39: Espectro de excitação de fluorescência da TnCF29W (normalizado) em tampão com Cálcio (a, b) e sem Cálcio (c, d). Sendo w a TnCF29W expressa com triptofano usando o plasmídeo inicial da TnCF29W. As demais foram expressas com 1MW utilizando-se as construções TnCF29W-TrpRS-wt (q), TnCF29W-TrpRSD135A (a), TnCF29W-TrpRSD135C (c), TnCF29W-TrpRSD135S (s), TnCF29W-TrpRSD135T (t).

Em *E.coli* o gene da TrpRS, chamado TrpS, se localiza no *dam* operon, que é responsável por controlar a expressão de 7 genes e possui vários promotores importantes para a alta expressão da TrpRS (Figura 40) (Lyngstadaas et al, 1999). Os níveis de expressão pelo promotor interno (Pi na Figura 40) são 5 vezes menor do que a expressão constitutiva da TrpRS quando sob o controle de todos os demais promotores do operon, sendo que o segundo promotor (P2 na Figura 40) é o mais importante para a obtenção de altos níveis de expressão da TrpRS (Lyngstadaas et al, 1999).

Figura 40: Desenho do *dam* operon de *E.coli* com a localização dos promotores do operon (P1-P6) determinados por Lyngstadaas e colaboradores (1999) e o promotor interno do gene TrpS segundo Hall e colaboradores (1982).

A forma de contornar este problema, neste caso, seria trocar o promotor da TrpRS na construção das Figuras 35 e 37 por um promotor mais forte que viabilizasse a expressão da TrpRS mutante na célula em níveis maiores do que o promotor interno dela (Pi) é capaz de fornecer. Além disso, os dados de cinética enzimática das mutantes indicam que a mutação de outros resíduos na TrpRS sejam necessários para auxiliar a mudança da especificidade da enzima para 1MW.

Outra possibilidade ainda não verificada é se as TrpRS mutantes são capazes de realizar a aminoacilação do tRNA^{Trp} tanto com Trp e 1MW, uma vez que estudos utilizando mutações pontuais no Asp 132 de *B.stearothermophilus* (Praetorius-Ibba et al., 2000) indicaram uma queda de 200-3000 vezes nesta etapa da reação catalisada pela TrpRS.

TRPRS DE *Xanthomonas axonopodis pv citri*

Durante este projeto, realizou-se a anotação dos genes da categoria III.B.4 (Metabolismo de macromoléculas/ metabolismo de RNA/ aminoacil tRNA sintetase e modificadores de tRNA) da *Xanthomonas axonopodis pv citri*. Através da anotação desta categoria pode-se constatar que todos os genes de modificação do tRNA e as AARS estão presentes no genoma da *Xanthomonas axonopodis pv citri*. Existem algumas particularidades encontradas nesta categoria como a presença de um segundo gene de lisil-tRNA^{Lys} sintetase induzido por choque térmico (LysU) e um gene com homologia com a GluS (glutaminil-tRNA^{Glu} sintetase). Também detectou-se dois genes homólogos ao gatA (Glu-tRNA^{Gln} amidotransferase subunidade A). Isso foi inesperado pois este gene é encontrado em archeas e se associa com as subunidades B e C para formar um complexo ternário (Ibba et al. 2000). Este complexo é responsável pela conversão de Glu para Gln no tRNA^{Gln}, uma vez que estes organismos não possuem GlnRS, e a aminoacilação do tRNA^{Gln} é realizado pela GluRS que forma Glu-tRNA^{Gln} (Ibba et al. 2000).

Quando foi analisado o gene TrpS que codifica a TrpRS da *Xanthomonas axonopodis pv citri* observou-se que ele apresenta uma extensão C-terminal de 88 aminoácidos quando comparado a proteína de *E.coli*. Essa extensão não é comum em procariotos sendo encontrada somente em *Xanthomonas*, *Xylella* e *Pseudomonas*, bactérias cujos genomas somente foram seqüenciados no último ano (Simpson et al, 2000 para a *Xylella*; Stover et al, 2000 para a *Pseudomonas*) (Figura 42). Enquanto esta dissertação estava sendo redigida, o genoma da *Xanthomonas campestris pv campestris* foi seqüenciado. A seqüência primária da TrpRS da *Xanthomonas campestris* é 92% homóloga a seqüência da *Xanthomonas citri*, sendo que as diferenças se encontram na extensão C-terminal de 88 aminoácidos, também presente na *X.campestris*.

Esta novidade despertou o interesse em estudar a TrpRS da *Xanthomonas*. Desta forma clonou-se, expressou-se e purificou-se a TrpRS de *Xanthomonas* (aqui designado TrpRSX) na sua forma tipo selvagem e sem a extensão de 88 aminoácidos na região C-terminal (TrpRSX Δ 88). Estas proteínas foram clonadas a partir de um cosmídeo de DNA

genômico de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* utilizando os primers descritos em Materiais e Métodos (Tabela 1) (Figura 41).

Figura 41: Plasmídeos de expressão induzível da TrpRS de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* completo (TrpRSX) e com a deleção dos 88 resíduos C-terminais (TrpRSXΔ88).

As duas TrpRS da *Xanthomonas* foram expressas em BL21(DE3)pLysS em meio rico e foram purificadas como descrito nos Materiais e Métodos. As proteínas não ficaram totalmente puras mas estima-se que representam mais que 80% das proteínas da mistura sendo visualizado através do gel de SDS-PAGE (Figura 43).

As etapas de purificação para TrpRSX tipo selvagem e a TrpRSXΔ88 foram as mesmas sendo que a primeira etapa foi a lise das células utilizando pressão no “French Press” após serem ultracentrifugadas, e as frações solúveis aplicadas na coluna de DEAE Sepharose. Ambas eluem utilizando um gradiente de KCl de 0 a 300mM em tampão de 50mM de K₂HPO₄ pH 6,8. Após coletar as frações que apresentavam a proteína, determinado por análise do gel de SDS-PAGE, efetuou-se duas novas etapas de purificação através de coluna de hidroxapatita e CM Sepharose. Nestas etapas, as proteínas não ligaram em nenhuma das duas resinas. Afim de concentrar a proteína que se encontrava muito diluída foi feita uma precipitação com sulfato de amônio e 3 diálises contra o tampão de estoque para ensaio de atividade enzimática como descrito para a

TrpRS de *E.coli*. Os perfis de SDS-PAGE das frações finais depois da precipitação com sulfato de amônio estão apresentados nas pistas 2 e 10 da Figura 43.

Neisseria	---MSKKRVLTVGTTTGIPHLGNYVGAIRPAVRAAQNPDTESEFLFLADYHGIKCHEPEM	57
Pseudomonas	---MTT-RILTGITPTGTPHLGNYAGAIRPAILASRRSDVDSFYFLADYHALIKCDDPAR	56
Xanthomonas	-MTSMTRVLTGITTSCTPHLGNYVGAIRPAIQASAGADAESFYFLADLHSLIKAQDPAR	59
Xylella	MGHFMISIRVLTGITTSCTPHLGNYVGAIRPAIRAAGPGTESFYFLADLHSLIKVQDPER	60
E.coli	---MTKPVIFSGAQPSGELTIGNYMGALRQWVNMQD-DYHCICYVDQHAITVRQDAQK	55
H.	---MAKPIVFSGVQPSGELTIGNYLGAIRNWMQD-DYECIFCVVDLHAITVRQDPVA	55
Bacillus	-----MKTIFSGIQPSGVITIGNYI GALRQFVELQH-EYNCYFCIVDQHAITVWQDPHE	53
	:::* :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*	
Neisseria	IHQSTQAVAAATWLACGLDPERTTFYRQSDIPEVMELNWLTCITAKGLMNAHAYKAAVQ	117
Pseudomonas	IQRSRLEIAATWLACGLDVERATFYRQSDIPEIPELTWLLTCVSAKGLNRAHAYKAAVD	116
Xanthomonas	TQRSTLEIAATWLACGLDPKQVWFYRQSDVPELTWLLTCVAGKGLNRAHAYKAAVD	119
Xylella	TQRSTLEIAATWLACGLDPEKQVWLYRQSDVPELTWLLTCVAGKGLNRAHAYKAAVD	120
E.coli	LRKATLDLALYLACGIDPEKSTIFVQSHVPEHAQLGWALNCYTYFGELSRMTQFK---D	112
H.	LRKATLDLALYLACGIDPNKSTIFVQSHVPEHTQLSWVLCYTYFGELSRMTQFK---D	112
Bacillus	LRQNIIRLAALYLAVGIDPTQATLFIQSEVPAHAQAAMLCQIVYIGELSRMTQFK---E	111
	:: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*	
Neisseria	ANAENGQEDPDFGVEMGLYSYPIMLTADILMFNAHEVPVGRDQIQHVEMARDIAGRFNHR	177
Pseudomonas	RNVEAG-EDPDAGVTMGLYSYPLMAADILMFNAHKIPVGRDQVQHVEMARDIAGRFNHL	175
Xanthomonas	RNRADG-EDEDAGVTAGLFMYPLMAADILIFNAHQVPVGRDQIQHIEMARDIAGRFNHR	178
Xylella	KNRSEG-GDDDAGITAGLFMYPLMAADILIFNAHQVPVGRDQIQHIEMARDIAGRFNHI	179
E.coli	KSARY-----AENINAGLFDYPVPLMAADILLYQTNLVPVGEDQKQHLEISRDIAQRFNAL	167
H.	KSARY-----AENINAGLFDYPVPLMAADILLYQAKSVVPVGEDQKQHLEISRDIAQRFNAL	167
Bacillus	KSAG-----KEAVSAGLLTYPLMAADILLYNTDIPVGEDQKQHLEISRDIAQRFNAL	165
	: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*	
Neisseria	F---RELFTLPEVKIDENVELLVGL-DG-RKMSKSYGN---TIPLWENDKKTQKSVNKKI	229
Pseudomonas	FGNGREFFVLPEAVIEENVATLPGL-DG-RKMSKSYGN---TIPLFSPSRQLKDAIARIV	230
Xanthomonas	YG---REFFTLPEAVIDEQVSTLPGL-DG-RKMSKSYGN---TIPLFAPREELRKLVSIL	231
Xylella	YG---GEYFVLPEAAIDQVATLPGL-DG-RKMSKSYGN---TMPLFCTREELKKYVFSIV	232
E.coli	YG---EIFKVPPEFIPKSGARVMSLLEPTKKMSKSDNRRNNVIGLLEDPKSVVKKIKRAV	224
H.	YG---NIFTIPEIFIGKAGARIMSLQDPEKKMSKSDNRRNNVITLLEDPKSVVKKIKRAV	224
Bacillus	YG---ELFTIPEARIPKVGARIMSLVDPTKKMSKSDPNKAYITLLDDAKTIEKKISAV	222
	: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*	
Neisseria	TNMKEP-----GEPKPPDESPLFEIYKAFSTPSETAEFTKMLADGLAWGEAKKLLAAKIN	284
Pseudomonas	TDSRAP-----GEPKDPDSSHLFLLYSAFASAEQVAAFQELLEGLAWGEAKQRLFLQD	285
Xanthomonas	TDSRAP-----GQAKDATQGSALFQLYQAFATPQESAAFAQAFADGIGWDAKQVFERID	286
Xylella	TDSRAP-----GEPKEAVGSVAFQLYQAFAGVECSMFAQALAEGLGWGEAKVRLFERID	287
E.coli	TDSDEPPVRYDVQNKAGVSNLLDILSAVTG-QSIPELEKQF-EGKMYGHLKGEVADAVS	282
H.	TDSDEPPVRYDVQNKAGVSNLLDILSAVTD-KPIADLEKEF-EGKMYGHLKTAVADEV	282
Bacillus	TDSSEG--TIRYDKEAKPGISNLLNIYSTLSG-QSIEELERQY-EGKGYGVFKADLQVVI	278
	: :: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*	
Neisseria	AELAEPRERYNELTADPSQIEEILQAGAQAQKAR-KEARELLGKVRDAVGIR---PLK---	336
Pseudomonas	NELGEARERYQALIAKPDIEDILLAGAQAQKAR-RIATPFIAELREAVGLRSLREPLKSAE	344
Xanthomonas	QEIAPLRTRYEGLIAEPARIEAILRAGGARLRARYATPLLAELRDAVGLRDLSSQAATAA	346
Xylella	AEVAPLRERYEDFMRRPADIEAMLCDISAGRLRERDAIPLLARLREAVGLRSLSLCMASAV	347
E.coli	GMLTELQERYHRFRNDEAFLQVQMKDAGAEKAS-AHASRTLKAVYEAIGFV-----AKP--	334
H.	TLLASLQERFHQYRNDETLLDNILRQGAEKAR-AKAQETLAKVYEAIGFV-----AAK--	334
Bacillus	ETLRPIQERYHHWMESEE-LDRVLDEGAEKAN-RVASEMVRKMEQAMGLG-----RRR--	329
	: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*	
Neisseria	-----	
Pseudomonas	SGKKKAAKAAARLVSRDDGSGFRRLDAAGEQLLLSRAFADGKAAGAVSKRLLAGETAD	404
Xanthomonas	VHASEKIALPVFKQYRESGQFYFKLNDGAGALLQSDGFASPRDAGQVIARLKQAAQAS	406
Xylella	PVPQEKVALPVLKQYREQDGRFYFKLIDGQGAVLVQSRGFASPRDAGQWIALFKQAVSAE	407
E.coli	-----	
H.	-----	
Bacillus	-----	
Neisseria	-----	
Pseudomonas	LRAEGNAFGLWLDGEAVAQSPAFADAAAARDAAIERTREALAPQE	448
Xanthomonas	DLQLPGVHAQVDADVLAAMDALREA-----	432
Xylella	ALVSPMLEPVADPVVLAALRLREAG-----	434
E.coli	-----	
H.	-----	
Bacillus	-----	

A

Xanthomonas	GLIAEPARIEAILRAGGARLRARYATPLLAELRDVGLRDLSSQAATAAVHASEKIALPV	357
Xylella	DFMRRPADIEAMLCDISAGRLRERDAIPLLARLREAVGLRSLCLMASAVPVPEKVALPV	358
Pseudomonas	ALIAKPDDIEDILLAGAAKAR-RIATPFTAELEAVGLRSLREPLKSAESGKKKAAKAAR	355
	:: : * ** : * . . . : * * * * : * : * : * : * : * : * : *	
Xanthomonas	FKQYRESDGQFYFKLNDGAGALLQSDGFASPRDAGQVIARLKQAAQASDLQLP-----	411
Xylella	LKQYREQDGRFYFKLIDGQAVLVQSRGFASPRDAGQWIALFKQAVSAEALVSP-----	412
Pseudomonas	LVSFRDDGSRFRRLDAAAGEQLLLSRAFDGKAAGAVSKRLLAGETADLRAEGNAFGLW	415
	: . : * : * * * : * . * * : * : * . : * : * : . * .	
Xanthomonas	-----GVHAQVDADVVLAAAMDALREA-----	432
Xylella	-----MLEPVADPVVLAALRLREAG-----	434
Pseudomonas	LDGEAVAQSPAFADAAARDAAIERTREALAPQE	448
	 * : * * *	

B

Figura 42: A: Alinhamento das seqüências das TrpRS dos procariotos *Neisseria meningitides*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Xanthomonas citri*, *Xylella fastidiosa*, *E.coli*, *H.influenzae* (H) e *Bacillus stearothermophilus*. **B:** Alinhamento da região C-terminal da TrpRS de *Pseudomonas aeruginosas*, *Xanthomonas citri*, *Xylella fastidiosa*. O alinhamento foi feito com o programa Clustal W (versão 1.7) sendo que: “*” significa 100% conservado, “.” significa altamente conservado e “-” significa conservado.

Figura 43: Gel de SDS-PAGE 15% da TrpRS tipo selvagem (TrpRSX) e da TrpRS sem os 88 aminoácidos terminais (TrpRSXΔ88). As pistas de 1 a 6 indicam o gel da TrpRSX e as pistas de 7 a 12 indicam o gel da TrpRSXΔ88. Pistas 1 e 7 são padrão de peso molecular com os pesos indicados ao lado. Pista 2 (A) corresponde a TrpRSX após a precipitação com sulfato de amônio e diálise contra o tampão de ensaio de atividade enzimática. Pista 3 (K) corresponde a purificação após o gradiente de KCl na coluna de DEAE Sepharose. Pista 4 (F) corresponde a solução após “French Press” e ultracentrifugação. Pista 5 (I) corresponde a células após indução da proteína e pista 6 (N) corresponde a amostra antes da indução. Pista 8 (F) corresponde a solução após “French Press” e ultracentrifugação. Pista 9 (K) corresponde a purificação após o gradiente de KCl na coluna de DEAE Sepharose. Pista 10 (A) corresponde a Δ88 após a precipitação com sulfato de amônio e diálise contra o tampão de ensaio de atividade enzimática. Pista 11 (I) corresponde a amostra induzida e pista 12 (N) corresponde a amostra antes da indução.

Formação de triptofano-hidroxamato

Para se verificar a funcionalidade da Trp_{RS} da *Xanthomonas* e o fragmento sem os 88 aminoácidos terminais, realizou-se um ensaio de formação de triptofano-hidroxamato com as enzimas purificadas e dosadas através da técnica de Hartree (1972).

Os resultados do ensaio de formação de triptofano-hidroxamato para a Trp_{RSX} e a Trp_{RSX}Δ88 da *Xanthomonas citri* indicaram que o mutante de deleção apresenta uma perda de 25% da atividade quando comparada com a Trp_{RS} tipo selvagem (Figura 44). O resultado da Trp_{RSX}Δ88 apresenta atividade bem próxima da tipo selvagem fornece indícios que estes resíduos não devem alterar a região do sítio ativo, pelo menos para a reação de ativação do triptofano.

Figura 44: Ensaio de formação de Triptofano-hidroxamato para a Trp_{RSX} e a Trp_{RSX}Δ88 (sem os 88 resíduos C-terminal). Os ensaios foram realizados na presença de ATP e Trp (Trp_{RSX} e Trp_{RSX}Δ88), e os controles sem Trp (Trp_{RSX}-W e Trp_{RSX}Δ88-W) e sem ATP (Trp_{RSX}-ATP e Trp_{RSX}Δ88-ATP). As medidas foram feitas em triplicatas e os valores plotados correspondem a média com a barra de desvio padrão. Os valores foram normalizados considerando a Trp_{RS} (Trp_{RSX}) em 15 minutos de reação como 100% de atividade. As condições de reação foi: 10 mM de ATP (pH 7,8), 10 mM de MgCl₂, 1 M de NH₂OH (pH 7,8), 100 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 2 unidades de Pirofosfatase, 10 mM de Trp, 3μM de Trp_{RS} a 37°C.

Intercâmbio de Pirofosfato

O ensaio de intercâmbio de pirofosfato foi feito para confirmar o resultado do ensaio de formação de triptofano-hidroxamato. Primeiramente foi feito um ensaio para averiguar a faixa de linearidade da atividade da enzima com relação a concentração e tempo de reação (Figura 45).

Com as condições determinadas para 60 segundos de reação e 100nM de concentração de enzima no meio reacional, realizou-se os experimentos fixando a concentração de Trp (2mM) e variando a concentração de ATP, e fixando o ATP (2mM) e variando a concentração de Trp para as duas formas da enzima (Figuras 46 e 47).

Figura 45: Ensaio de intercâmbio de pirofosfato com TrpRS tipo selvagem 100nM em 50mM de HEPES (pH 7,0), 0,05% de BSA, 10mM de $Mg(OAc)_2$, 10mM de KF, 4mM de DTT, 10mM de pirofosfato de sódio (10cpm/pmol de ^{32}P), 2mM de ATP, 2mM de Trp.

Figura 46: Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRSX. Os gráficos mostram os ensaios com Trp, ATP e 1MW com as concentrações em $\mu\text{mol/L}$ e a velocidade da reação em mol/L.s de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[\text{reagente}]$ forneceram os valores de K_M k_{CAT} através da equação da reta. Quando $[ATP]$ foi variada utilizamos 2mM de Trp e quando $[W]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP. Condições como descrito na Figura 45

Figura 47: Ensaio de cinética para a reação de intercâmbio de pirofosfato para a TrpRSXΔ88. Os gráficos mostram os ensaios com Trp e ATP com as concentrações em $\mu\text{mol/L}$ e a velocidade da reação em mol/L.s de ATP produzido. Os gráficos de $1/V$ vs $1/[\text{reagente}]$ forneceram os valores de K_M e k_{CAT} através da equação da reta. Quando $[\text{ATP}]$ foi variada utilizamos 2mM de Trp e quando $[\text{W}]$ foi variada utilizamos 2mM de ATP. Condições como descrito na Figura 45.

Tabela 6: Valores das constantes cinéticas para o Trp e ATP para a TrpRS tipo selvagem (TrpRSX) e a mutante de deleção (TrpRSXΔ88).

Enzima	K_M (Trp) (μM)	K_{CAT} (Trp) (s^{-1})	K_{CAT}/K_M (Trp)	K_M (ATP) (μM)	K_{CAT} (ATP) (s^{-1})	K_{CAT}/K_M (ATP)
TrpRSX	14,7 (3,0)	224,9 (11,8)	1,00	60,9 (12,9)	230,6 (11,5)	1,00
TrpRSXΔ88	13,6 (1,5)	185,8 (5,1)	0,89	84,0 (21,3)	159,6 (10,1)	0,50

Os erros das medidas se encontram entre parênteses

Através dos valores da Tabela 6 pode-se observar que a TrpRS sem os 88 resíduos C-terminais apresenta uma pequena diminuição no valor de K_M para o Trp e um pequeno aumento (cerca de 38%) no K_M para o ATP, enquanto que os valores de k_{CAT} são um pouco menor para a mutante de deleção (cerca de 20% para o Trp e 30% para o ATP). A relação k_{CAT}/K_M para a TrpRS Δ 88 tanto para o Trp como para o ATP é menor do que para a TrpRS tipo selvagem da *Xanthomonas*, consistente com os resultados do ensaio de formação de triptofano-hidroxamato.

A atividade um pouco menor para a mutante fornece indícios de que estes resíduos não afetam drasticamente a atividade da enzima *in vitro*. Uma busca através do BlastX (Altschul et al., 1997) por homologia na sequência dos 88 resíduos terminais extra da TrpRS da *Xanthomonas* não apresentou similaridade com sequências de outras proteínas conhecidas. Fica então a questão de qual seria a finalidade destes resíduos terminais na TrpRS da *Xanthomonas*, *Xylella* e *Pseudomonas*.

COMPARAÇÃO DE TRPRS E TYRRS DE *Xanthomonas*, *Xylella* e *Pseudomonas*

As aminoacil tRNA sintetases são divididas em subgrupos dentre as duas classes I e II. Existem 3 subgrupos principais dentro da classe I: subgrupo Ia composto de seis das dez AARS que apresentam sítio de edição do tRNA aminoacilado (ArgRS, CysRS, IleRS, LeuRS, MetRs e ValRS); subgrupo Ib composto pela GluRS e GlnRS que apresentam os domínios catalíticos mais similares e são consideradas as AARS mais próximas filogenética e estruturalmente (Agou et al., 1998; Siatecka et al., 1998); e finalmente o subgrupo Ic composto pela TrpRS e TyrRS que apresentam um alto grau de homologia entre o arranjo dos seus sítio ativo em termos de reconhecimento do aminoácido (Doublié et al., 1995; Ilyin et al., 2000).

Questiona-se a relação evolutiva entre a TrpRS e TyrRS, uma vez que estas apresentam muitas semelhanças estruturais, na composição do sítio ativo, as duas são homodiméricas e se encontram na mesma classe formando uma subclasse própria (Doublié et al., 1995; Hogue et al., 1996; Praetorius-Ibba et al., 2000). Praetorius-Ibba e colaboradores (2000) tentaram modificar a especificidade da TrpRS de

B.stearothermophilus para Tyr através de mutações de resíduos conservados no sítio ativo da TrpRS e da TyrRS, uma vez que estas duas enzimas apresentam alto grau de homologia estrutural. Eles não obtiveram o resultado desejado, mas apenas conseguiram aumentar a afinidade da Tyr pela TrpRS mutante quando em ensaios de competição enzimática. Mas este resultado forneceu indícios de que as estruturas provêm de um ancestral comum.

Fato interessante é que a TyrRS de *B.stearothermophilus* apresenta uma extensão de 30 resíduos na região N-terminal e cerca de 100 resíduos na região C-terminal quando comparada com a estrutura e sequência da TrpRS de *B.stearothermophilus* e de todos os demais procariotos. Estes resíduos C-terminal da TyrRS apresentam a estrutura de forma desordenada, e não foram resolvidos na estrutura cristalina da TyrRS (Brick et al., 1989). Este dado mostrou-se interessante, principalmente porque a TyrRS e TrpRS de *Xanthomonas*, *Xylella* e *Pseudomonas* apresentam praticamente o mesmo tamanho. Como a TrpRS destes três organismos apresenta a extensão C-terminal sem homologia estrutural com outra proteína conhecida, decidiu-se investigar se existe semelhança entre as regiões C-terminal da TrpRS e TyrRS destes três organismos (Figura 48).

O alinhamento das sequências da TrpRS e TyrRS de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* apresentou 11 resíduos totalmente conservados, 18 resíduos altamente conservados e 18 resíduos conservados na região C-terminal (marcado em azul na Figura 48A). Estes valores representam cerca de 11% de similaridade e 30% de resíduos altamente conservados e similares na região C-terminal destas duas proteínas (Figura 48A). A similaridade entre as sequências completas da TrpRS e TyrRS corresponde a 12%. Logo, a similaridade entre os trechos C-terminais das duas enzimas é similar a homologia entre as demais regiões das proteínas com conhecida homologia estrutural. Isto fornece indícios de que as duas proteínas possuem regiões similares, incluindo a extensão C-terminal. O alinhamento da região C-terminal da TyrRS dos procariotos *Pseudomonas aeruginosas*, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* e *Xylella fastidiosa* apresentou 21 resíduos totalmente conservados, 20 resíduos altamente conservados e 9 resíduos conservados, representando 22% de similaridade e 43% de resíduos altamente conservados e similares na sequência (Figura 48B). O alinhamento da região C-terminal da TrpRS dos procariotos *Pseudomonas aeruginosas*, *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* e

Xylella fastidiosa apresentou 23 resíduos totalmente conservados, 13 resíduos altamente conservados e 16 resíduos conservados, representando 24% de similaridade e 38% de resíduos altamente conservados e similares na sequência (Figura 48C).

Este resultado é um indicio maior de que a TrpRS e TyrRS derivam de um ancestral comum. Para estes três procariotos, além destas enzimas apresentarem alta similaridade entre a mesma enzima de organismos diferentes (Figura 48B e C), elas apresentam similaridade, incluindo a extensão C-terminal, entre diferentes enzimas de um mesmo organismo (Figura 48A).

Como estes resíduos C-terminal não apresentam estrutura definida na TyrRS de *B.stearothermophilus* (Brick et al., 1989), estes resíduos podem estar envolvidos com o reconhecimento do tRNA^{Trp} ou mesmo com a possível dimerização da TrpRS, pois não é conhecido se a TrpRS de *Xanthomonas* é um dímero como as demais TrpRS de procariotos (Carter, 1993). Outra possibilidade é de que eles estejam envolvidos no recrutamento do EF-TU, responsável por levar o tRNA acilado com o aminoácido cognato até o ribossomo (Rodina et al., 2001). Ainda será necessário caracterizar melhor esta TrpRS e o seu mutante de deleção, como também torna-se interessante os esforços para estudar isoladamente este fragmento de 88 resíduos afim de se obter conclusões mais precisas da sua real função.

TyrRS	-MTTIEESLALIGRGTEEEILKLDQLQARLATGKPLRVKAGFDPTAPDLHLGHTVLLNKM	59
TrpRS	MTSM ^T TRVLTGITTSGT ^{PH} LGNYVGAI ^{RA} IQASAGADAESFYFLADLHSLIKAQDPART	60
	: . * : . * . . . * . * * . .	
TyrRS	QFQQLGHQVIFLIG-----DFTGMIGDPSGKNATRKPLSREDVLANARTYEEQVFK	110
TrpRS	QRSTLEIAATWLACGLDPK ^W VFYRQSDVPETTELMWLLTCVAGKILNRAHAYKAAVDR	120
	* . * . : * . : : : . : : : * . * : : *	
TyrRS	ILDRE ^{TE} VR--FNSEWFGQMSAADM ^{IK} LSAQHTVARM ^{LER} DDFAK ^R FGSQQPIA ^I HEFL	168
TrpRS	NRADGEDEDAGVTAGLFMY ^P VLMAADILIFNAHQVPVGRDQIQHIEMAR ^{DF} AQRFNHVYG	180
	. * . : : * * : * * . : : : . * :	
TyrRS	YPLVQGYDSVALKADVELGGTDQKFN---LLMGRGLQEHYQAPQIVLTMPLLEGLDGVA	225
TrpRS	REFF ^T LPEAVIDEQVSTLPGLDGRKMSKSYGNTIPLFAPREELRKL ^V SIL ^T DSRAPQA	240
	: . : * : * * * : * : : : : . * *	
TyrRS	KMSK--SLGNYIGINEPAIDIVTKTMKIGDAL ^{TWR} WIDLLSFDISMAEAARLKEEVASGE	283
TrpRS	KDATQGSALFQLYQA ^F ATPQESAAFAQA ^F ADGIGWGD ^{AK} QQVFERIDQEIA ^{PL} RTRYEGLI	300
	* : : * : . . : : : : * : * * * : .	
TyrRS	LHPR-----EVKLRLARELATRFHDAATAEQAIAGWHAVVTGQGDTGLLPLQEV	332
TrpRS	AEPARIEAILRAGGARLRARYATPLLAELRDAVGLRDLSSQAATAAVHASEKIALPVFKQ	360
	. * . : : * * * . : : * * . : : * * : :	
TyrRS	VVPAEGLRLAGLLTAAGLTPSNSEATRKLKER-AVKIDGEVVEDPGRVFTQGFEGVIQVG	391
TrpRS	YRES ^D GQFYFKLNDGAGALLLQSDGFASPRDAGQVIARLKQAAQASDLQLPGVHAQVDAD	420
	: * * . * * : * : . : : * : . : : : * . . : : .	
TyrRS	KRN ^F ARVSLVTG	403
TrpRS	VVLAAMDALREA	432
	* : * .	

A

TyrRS_Xylella	KAIAGWQAVVTGQGNNNLLPLQKINVPADGVRLVALLTKSGLAPSNSEAMRK	360
TyrRS_Xantho	QAIAGWHAVVTGQGDTGLLPLQEVVVPAEGLRLAGLLTAAGLTPSNSEATRK	360
TyrRS_Pseudomonas	SAHKSAGNRLKEGELPEDLPEIELSSPED-MPVASVLNKAGLVKNAAAARDL	357
	. * . : . * * : : * : : : : * . * * . : *	
TyrRS_Xylella	LKERAVRVDGIVVDDAHLHFVPGFEGLIQIGKRNFAKVRLVTSSESHDFPESNGIDKS	418
TyrRS_Xantho	LKERAVKIDGEVVEDPGRVFTQGFEGVIQVGKRN ^F ARVSLVTG-----	403
TyrRS_Pseudomonas	LGAGSVKVDGQVVD ^R -TFMLALGETRVFQAGKKAFARITLKA ^E -----	399
	* : : : * * * : . * : : * * : * : : * :	

B

TrpRS_Xantho	DLSSQAATAAVHASEKIALPVFKQYRES ^D GQFYFKLNDGAGALLLQSDGFASPRDAG	393
TrpRS_Xylella	SLSLCMASAVPVPQEKVALPVLKQYREQDGRFYFKLIDGQGAVLVQSRGFASPRDAG	394
TrpRS_Pseudomonas	SLREPLKSAESGKKKA ^A ARLV ^S FRDDDG ^S FRFRLLDAAEQ ^L LLSRA ^F ADGKAAG	391
	: * : : * . : . . . : : * : * * * . * * : * * * . : * *	
TrpRS_Xantho	QVIARLKQAAQASDLQLP-----GVHAQVDADV ^V LAAMDALREA-----	432
TrpRS_Xylella	QWIALFKQAVSAEALVSP-----MLEPVADPVV ^V LAALRRLREAG----	434
TrpRS_Pseudomonas	AVSKRLLAGETADLRAEGNAFGLWLDGEAVAQSPAFADAAARDAAIERTREALAPQE	448
	: . * . . * . . * * : * * *	

C

Figura 48: A Alinhamento das seqüências da TrpRS e TyrRS da , *Xanthomonas axonopodis pv citri*, com a região C-terminal extra em comparação com a seqüência da TrpRS de *E.coli* está grifado em ciano. **B** Alinhamento da região C-terminal da TyrRS dos procariotos *Pseudomonas aeruginosas*, *Xanthomonas axonopodis pv citri* e *Xylella fastidiosa*. **C:** Alinhamento da região C-terminal da TrpRS de *Pseudomonas aeruginosas*, *Xanthomonas axonopodis pv citri*, *Xylella fastidiosa*. O alinhamento foi feito com o programa Clustal W (versão 1.7) sendo que: “*” significa 100% conservado, “:” significa altamente conservado e “.” significa conservado.

CONCLUSÕES

Neste projeto de mestrado tentou-se modificar a atividade da TrpRS de *E.coli* afim de torná-la capaz de utilizar análogos metilados de triptofano (1-metiltriptofano) para aminoacilar o tRNA^{Trp}, visto que a TrpRS tipo selvagem não é capaz de utilizar este análogo como substrato *in vivo*. A finalidade de modificar a atividade desta enzima era se construir um sistema capaz de incorporar análogos metilados de triptofano em proteínas recombinantes expressas em *E.coli*. Através da estrutura cristalizada da TrpRS de *B.stearothermophilus* (Doublie et al. 1995) constatamos que o fato da enzima não reconhecer análogos metilados de triptofano, deve-se a presença de um resíduo de ácido aspártico no sítio ativo da enzima. Este Asp (135 em *E.coli*) faz uma ponte de hidrogênio com o H do N₁ do anel indólico do triptofano, e o espaço presente neste sítio ativo não deve permitir a incorporação do 1-metiltriptofano.

Utilizando programas de modelagem molecular fizemos a sobreposição da TrpRS de *E.coli* com a estrutura da *B.stearothermophilus*, uma vez que a homologia entre elas é alta (72%). Modelamos a TrpRS de *E.coli* tipo selvagem e os mutantes que construímos, TrpRSD135A, TrpRSD135C, TrpRSD135S e TrpRSD135T. Analisando o sítio ativo destes mutantes percebemos que eles apresentavam uma cavidade maior, que poderia acomodar o grupo metila do 1-metiltriptofano no local do hidrogênio do triptofano.

Clonamos a TrpRS de *E.coli* tipo selvagem e as mutantes no plasmídeo pET-3a para que fosse possível a expressão destas proteínas de forma heteróloga. Uma das mutantes TrpRSD135V não se apresentou solúvel durante a purificação da proteína, possivelmente porque a Val é um aminoácido β-ramificado diferente dos aminoácidos Asp, Ala, Cys, Ser. A Thr também é β-ramificada mas o seu grupo hidroxila possivelmente mimetiza interações hidrofílicas do Asp da proteína selvagem. Para averiguar se as mutações não afetaram drasticamente a estrutura da enzima, uma vez que a mutação pontual se encontra em uma α-hélice, realizamos ensaios de dicroísmo circular. O resultado desta análise indicou que não existe diferenças significativas nas estruturas secundárias das TrpRS mutantes comparadas com a tipo selvagem.

Realizamos então testes de incorporação de 1MW na própria TrpRS utilizando uma cepa auxotrófica a triptofano CY(DE3)pLysS e meio mínimo contendo 1MW. Esperávamos observar a incorporação de 1MW na TrpRS mutante expressa após a indução, uma vez que uma certa quantidade de TrpRS mutante seria expressa com Trp na sua sequência primária. Tanto na proteína do tipo selvagem quanto nos mutantes, quando comparadas com a mesma proteína expressa em meio rico contendo Trp, observamos a incorporação de uma pequena quantidade de 1MW na TrpRS expressa através do seu espectro de fluorescência de excitação, uma vez que o 1MW possui o espectro de fluorescência de excitação deslocado para o vermelho em relação ao do Trp.

Fizemos uma nova construção, na qual possuíamos o gene da troponina C com um códon de Trp na posição 29, sob o controle de um promotor induzível. Inserimos então a TrpRS de *E.coli* sob o controle do seu próprio promotor (Hall et al., 1982), para que fosse expressa de forma constitutiva na célula, após o gene da troponina C. Com esta nova construção inserimos as mutações pontuais no sítio ativo da TrpRS e realizamos os testes de incorporação de 1MW ao fazer a indução em meio mínimo contendo 1MW e utilizando a cepa CY(DE3)pLysS. Após a purificação da TnC expressa, constatamos que não houve incorporação de 1MW na sequência da TnC, através do ensaio de fluorescência de excitação, comparando o espectro da TnC expressa em meio mínimo contendo 1MW e expressa em meio rico contendo Trp.

Especulamos então que um dos possíveis problemas de não ter se observado a incorporação de 1MW na TnCF29W, pode ser devido ao promotor da TrpRS, que é fraco. Na *E.coli* este gene se encontra em um operon (dam operon) e o promotor responsável por grande parte (80%) da expressão constitutiva da TrpRS é um promotor que se encontra a 3000 pb do gene da TrpRS (Lyngstadaas et al., 1999). Uma perspectiva futura então será a troca do promotor da TrpRS para um que apresente uma expressão maior e garanta a sua expressão constitutiva em quantidade suficiente para que ela possa aminoacilar o tRNA^{Trp} com o 1MW.

Testes de atividade *in vitro* foram feitos para verificar se as TrpRS mutantes apresentavam atividade catalítica. Para tal utilizamos primeiramente o ensaio de formação de triptofano-hidroxamato, que não possui sensibilidade suficiente para a caracterização das enzimas, mas fornece indício da atividade da TrpRS. Quando

utilizamos Trp como substrato, todas as mutantes apresentaram atividade igual a do controle negativo para a TrpRS tipo selvagem, indicando que se havia perdido grande parte da atividade enzimática. Ao ser realizado o ensaio utilizando 1MW como substrato, obtivemos atividades similares entre os TrpRS mutantes e o tipo selvagem, sendo que a TrpRSD135A apresentou uma atividade um pouco maior.

Para estudar a atividade enzimática das mutantes quantitativamente, realizamos ensaios de intercâmbio de pirofosfato, que permitiu determinar o K_M e k_{CAT} para o Trp, ATP e inclusive o 1MW. Com este ensaio constatou-se que os mutantes perderam a atividade enzimática com o Trp e ATP. Ao realizar o ensaio com 1MW, os mutantes TrpRSD135C e TrpRSD135S apresentaram a maior atividade e especificidade enzimática. Observamos que a mutante TrpRSD135C apresentou uma maior estabilização do estado de transição para quando utilizando 1MW como substrato.

Futuramente deve-se realizar o ensaio de aminoacilação de tRNA^{Trp} para verificar a capacidade das TrpRS mutantes em realizar a reação total. Também deve-se realizar a construção de novos mutantes, como por exemplo a substituição das prolinas que posicionam a α -hélice na qual o Asp 135 se encontra, para permitir uma maior mobilidade para a acomodação do metil-N₁ no sítio ativo. Uma outra estratégia seria produzir uma biblioteca de mutantes aleatórios da TrpRS e tentar identificar um clone cujo crescimento seja inibido em meio contendo Trp mais 1MW.

Durante a realização deste projeto, foi realizado, em paralelo, a anotação da categoria das aminoacil tRNA sintetases do genoma da *Xanthomonas axonopodi pv citri*. Pode-se perceber que a TrpRS da *Xanthomonas* apresenta uma extensão de 88 aminoácidos na região C-terminal comparada com a de *E.coli* e demais procariotos. Esta extensão só é encontrada até agora também em *Pseudomonas* e *Xyllela*, não apresentava homologia com nenhuma proteína conhecida. Frente a este fato inédito, decidimos clonar a TrpRS tipo selvagem e um mutante de deleção da extensão de 88 aminoácidos da *Xanthomonas*. Foram realizados ensaios de formação de triptofano-hidroxamato e intercâmbio de pirofosfato com a TrpRS e o mutante de deleção da *Xanthomonas*. Os resultados indicaram uma perda pequena de atividade enzimática no mutante de deleção quando comparada com a tipo selvagem, indicando que esta extensão não está

diretamente relacionada com o sítio ativo. Este domínio pode estar relacionado com o reconhecimento do tRNA ou alguma outra atividade até então desconhecida.

O resultado do alinhamento das seqüências das TrpRS e TyrRS da *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Xylella fastidiosa* indicaram alta similaridade entre as seqüências da mesma proteína em organismo diferente e diferentes proteínas no mesmo organismo. Este fato reforça a idéia de um ancestral comum entre estas duas proteínas. Outro fator importante neste caso é de que a seqüência dos resíduos extra C-terminal da TrpRS estão presentes em todas as TyrRS mas não foram definidos estruturalmente por serem muito desordenados (pelo menos na ausência do tRNA^{Tyr}) (Brick et al., 1989). A deleção destes resíduos C-terminais na TrpRS da *Xanthomonas* não apresentaram grandes modificações na atividade enzimática para a etapa de ativação do aminoácido. Isto pode ser um indício de que na evolução destas enzimas nos procariotos a TrpRS perdeu estes resíduos relativamente recente. Aparentemente, esta perda não afetou a sua atividade ou a função destes resíduos de alguma forma que ainda não sabemos.

As perspectivas para futuros estudos da TrpRS de *Xanthomonas* se baseiam em: 1 - determinar um melhor protocolo de purificação destas proteínas e realizar os ensaios de aminoacilação de tRNA^{Trp}; 2 - dicroísmo circular para verificar o quanto se modificou a estrutura da enzima com a deleção da cauda C-terminal; 3 - clonar e expressar e purificar a cauda de 88 aminoácidos; 4 – tentativas de cristalização destas proteínas para se obter a estrutura molecular de alta resolução; 5 - realizar ensaios de nocaute do gene da TrpRS na *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* e inserir então o mutante de deleção para verificar se a cauda é responsável por alguma atividade desconhecida e essencial para a *Xanthomonas*.

BIBLIOGRAFIA

- 1- AGOU, F., QUEVILLON, S., KERJAN, P., MIRANDE, M. Switching the amino acid specificity of an aminoacyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, v.37, n.32, p.11309-11314, 1998.
- 2- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v.25, p.3389-3402, 1997.
- 3- ANDRADE, M.A., CHACÓN, P., MERELO, J.J., MORÁN, F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering*, v.6, n.4, p.383-390, 1993.
- 4- BEECHEM, J.M., BRAND, L. Time-resolved fluorescence of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, v.54, p.43-71, 1985.
- 5- BLATTNER, F.R., PLUNKETT, G. III, BLOCH, C.A., PERNA, N.T., BURLAND, V., RILEY, M., COLLADO-VIDES, J., GLASNER, J.D., RODE, C.K., MAYHEW, G.F., GREGOR, J., DAVIS, N.W., KIRKPATRICK, H.A., GOEDEN, M.A., ROSE, D.J., MAU, B., SHAO, Y. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, v.277, n.5331, p.1453-1474, 1997.
- 6- BRICK, P., BHAT, T.N., BLOW, D.M. Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate. *J.Mol.Biol.*, v.208, n.1, p.83-98, 1989.
- 7- CARTER, C.W.JR. Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev.Biochem.*, v.62, p.715-748, 1993.
- 8- CHAN, K.W., KOEPEL, R.E. Role of the TIGN sequence in E. coli tryptophanyl-tRNA synthetase. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1205, n.2, p.223-229, 1994.
- 9- CHOW, K.C., XUE, H., SHI, W., WONG, T.F. Mutational identification of an essential tryptophan in tryptophanyl-tRNA synthetase of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, v.267, n.13, p.9146-9149, 1992.
- 10- CREIGHTON, T.E. *Proteins: structures and molecular properties*. 2.ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1996. 140-142p.
- 11- CUSACK, S. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology*, v.7, n.6, p.881-889, 1997.
- 12- DAS, K., ASHBY, K.D., SMIRNOV, A.V., REINACH, F.C., PETRICH, J.W., FARAH, C.S. Fluorescence properties of recombinant tropomyosin containing tryptophan, 5-

- hydroxytryptophan and 7-azatryptophan. *Photochemistry and Photobiology*, v.70, n.5, p.719-730, 1999.
- 13- DAVIE, E.W., KONINGSBERGER, V.V., LIPMANN, F. The isolation of a tryptophan-activating enzyme from pancreas. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.65, n.1, p.21-38, 1956.
 - 14- DAVIE, E.W. Tryptophan-activating enzyme. *Methods of Enzimology*, v.5, p.718-722, 1962.
 - 15- DE PRAT GAY, G., DUCKWORTH, H.W., FERSHT, A.R. Modification of the amino acid specificity of tyrosyl-tRNA synthetase by protein engineering. *FEBS Lett.*, v.318, n.2, p.167-171, 1993.
 - 16- DOUBLIÉ, S., BRICOGNE, G., GILMORE, C., CARTER, C.W.JR. Tryptophanyl-tRNA synthetase crystal structure reveals an unexpected homology to tyrosyl-tRNA synthetase. *Structure*, v.3, n.1, p.17-31, 1995.
 - 17- DRAPEAU, G.R., BRAMMAR, W.J., YANOFSKY, L. Amino acid replacements of the glutamic acid residue at position 48 in the tryptophan synthetase A protein of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, v.35, n.2, p.357-367, 1968.
 - 18- EFTINK, M.R. Fluorescence techniques for studying protein structure. *Methods in Biochem. Anal.*, n.35, p.127-205, 1991.
 - 19- FARAH, C.S., REINACH, F.C. Regulatory properties of recombinant tropomyosins containing 5-hydroxytryptophan: Ca²⁺-binding to troponin results in a conformational change in a region of tropomyosin outside the troponin binding site. *Biochemistry*, v.38, n.32, p.10543-10551, 1999.
 - 20- FERSHT, A.R. Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, v.26, n.25, p.8031-8037, 1987.
 - 21- GIEGÉ, R., SISSLER, M., FLORENTZ, C. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Research*, v.26, n.22, p.5017-5035, 1998.
 - 22- GREENFIELD, N.J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry*, v.235, n.1, p.1-10, 1996.
 - 23- HALL, C.V., VANCLEEMPOT, M., MUENCH, K.H., YANOFSKY, C. The nucleotide sequence of the structural gene for *Escherichia coli* tryptophanyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, v.257, n.11, p.6132-6136, 1982.
 - 24- HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Annual Biol.*, v.48, n.2, p.422-427, 1972.

- 25- HIMENO, H., HASEGAWA, T., ASAHARA, H., TAMURA, K., SHIMIZU, M. Identity determinants of *E. coli* tryptophan tRNA. *Nucleic Acids Research*, v.19, n.23, p.6379-6382, 1991.
- 26- HOGUE, C.W., RASQUINHA, I., SZABO, A.G., MACMANUS, J.P. A new intrinsic fluorescent probe for proteins. Biosynthetic incorporation of 5-hydroxytryptophan into oncomodulin. *FEBS Letters*, v.310, n.3, p.269-272, 1992.
- 27- HOGUE, C.W., SZABO, A.G. Characterization of aminoacyl-adenylates in *B. subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase, by the fluorescence of tryptophan analogs 5-hydroxytryptophan and 7-azatryptophan. *Biophysical Chemistry*, v.48, n.2, p.159-169, 1993.
- 28- HOGUE, C.W., DOUBLIÉ, S., XUE, H., WONG, J.T., CARTER, C.W.JR., SZABO, A.G. A concerted tryptophanyl-adenylate-dependent conformational change in *Bacillus subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase revealed by the fluorescence of Trp92. *J. Mol.Biol.*, v.260, n.3, p.446-466, 1996.
- 29- HUTNIK, C.M., MACMANUS, J.P., BANVILLE, D., SZABO, A.G. Metal-induced changes in the fluorescence properties of tyrosine and tryptophan site-specific mutants of oncomodulin. *Biochemistry*, v.30, n.30, p.307652-307660, 1991.
- 30- IBBA, M., SEVER, S., IBBA, M.P., SÖLL, D. Transfer RNA identity contributes to transition state stabilization during aminoacyl-tRNA synthesis. *Nucleic Acids Research*, v.27, n.18, p.3631-3637, 1999.
- 31- IBBA, M., SOLL, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu.Rev.Biochem*, v.69, p.617-650,2000.
- 32- IBBA, M., BECKER, H.D., STATHOPOULOS, C., TUMBULA, D.L., SOLL, D. The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci*, v.25, n.7, p.311-316, 2000.
- 33- ILYIN, V.A., TEMPLE, B., HU, M., LI, G., YIN, Y., VACHETTE, P., CARTER, C.W.JR. 2.9 A crystal structure of ligand-free tryptophanyl-tRNA synthetase: domain movements fragment the adenine nucleotide binding site. *Protein Science*, v.9, n.2, p.218-231, 2000.
- 34- JAHN, M., ROGERS, M.J., SÖLL, D. Anticodon and acceptor stem nucleotides in tRNA(Gln) are major recognition elements for *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase. *Nature*, v.352,n.6332, p.258-260, 1991.
- 35- KISELEV, L.L. Aminoacyl-tRNA synthetases (codases) and their noncanonical functions. *Molecular Biology*, v.24,n.6, p.1143-1168, 1990.
- 36- KNORRE, D.G., MALYGIN, E.G., SLINKO, M.G., TIMOSHENKO, V.I., ZINOVIEV, V.V., KISSELEV, L.L., KONCHKINA, L.L., FAVOROVA, O.O. Beef pancreas

- tryptophanyl-tRNA synthetase. Order of substrate binding in ATP-(32-P)-pyrophosphate exchange reaction. *Biochimie*, v.56, n.6-7, p.845-855, 1974.
- 37- LIPMANN, F., TUTTLE, L.C. A specific micromethod for the determination of acyl phosphates. *J. Biol. Chem.*, v.159, n.1, p.21-28, 1945.
 - 38- LYGSTADAA, A., LONER-OLENSEN, A., GRELLAND, E., BOYE, E. The gene for 2-phosphoglycolate phosphatase (gph) in *Escherichia coli* is located in the same operon as dam and at least five other diverse genes. *Biochim et Biophys Acta*, v.1472, n.1-2, p.376-384, 1999.
 - 39- MERLE, M., TREZEGUET, V., GRAVES, P.V., ANDREWS, D., MUENCH, K.H., LABOUESSE, B. Tryptophanyl adenylate formation by tryptophanyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, v.25, n.5, p.1115-1123, 1986.
 - 40- MUSIER-FORSYTH, K., SCHIMMEL, P. Atomic determinants for aminoacylation of RNA minihelices and relationship to genetic code. *Accounts of Chemical Research*, v.32, n.4, p.368-375, 1999.
 - 41- NEVINSKY, G.A., FAVOROVA, O.O., LAVRIK, O.I., PETROVA, T.D., KOCHKINA, L.L., SAVCHENKO, T.I. Fluorinated tryptophans as substrates and inhibitors of the ATP--(32P)PPi exchange reaction catalysed by tryptophanyl tRNA synthetase. *FEBS Letter*, v.43, n.2, p.135-138, 1974.
 - 42- NUREKI, O., VASSYLYEV, D.G., TATENO, M., SHIMADA, A., NAKAMA, T., FUKAI, S., KONNO, M., HENDRICKSON, T.L., SCHIMMEL, P., YOKOYAMA, S. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science*, v.280, n.5363, p.578-582, 1998.
 - 43- PEARLSTONE, J.R., BORGFORD, T., CHANDRA, M., OIKAWA, K., KAY, C.M., HERZBERG, O., MOULT, J., HERKLOTZ, A., REINACH, F.C., SMILLIE, L.B. Construction and characterization of a spectral probe mutant of troponin C: application to analyses of mutants with increased Ca²⁺ affinity. *Biochemistry*, v.31, n.28, p.6545-6553, 1992.
 - 44- PRAETORIUS-IBBA, M., STANGE-THOMANN, N., KITABATAKE, M., ALI, K., SOLL, I., CARTER JR., C.W., IBBA, M., SOLL, D. Ancient adaptation of the active site of tryptophanyl-tRNA synthetase for tryptophan binding. *Biochemistry*, v.39, n.43, p.13136-13143, 2000.
 - 45- PROVENCHER, S.W., GLÖCKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, v.20, n.1, p.33-37, 1981.

- 46- QUAGGIO, R.B., FERRO, J.A., MONTEIRO, P.B., REINACH, F.C. Cloning and expression of chicken skeletal muscle troponin I in *Escherichia coli*: the role of rare codons on the expression level. *Protein Science*, v.2, n.6, p.1053-1056, 1993.
- 47- RAO, S.T., ROSSMANN, M.G. Comparison of super-secondary structures in proteins. *Journal of Molecular Biology*, v.76, n.2, p.241-256, 1973.
- 48- RICH, R.L., NEGRERIE, M., LI, J., ELLIOTT, S., THORNBURG, R.W., PETRICH, J.W. The photophysical probe, 7-azatryptophan, in synthetic peptides. *Photochemistry and Photobiology*, v.58, n.1, p.28-30, 1993.
- 49- RICH, R.L., SMIRNOV, A.V., SCHWABACHER, A.W., PETRICH, J.W. Synthesis and photophysics of the optical probe N-1-methyl-7-azatryptophan. *J. Am. Chem. Soc.*, v.117, n.48, p.11850-11853, 1995.
- 50- RODNINA, M.V., WINTERMEYER, W. Ribosome fidelity: tRNA discrimination, proofreading and induced fit. *Trends in Biochemical Sciences*, v.26, n.2, p.124-130, 2001.
- 51- ROSS, J.B.A., SZABO, A.G., HOGUE, C.W.V. Enhancement of protein spectra with tryptophan analogs: fluorescence spectroscopy of protein-protein and protein-nucleic acid interactions. *Methods in Enzimology*, v.278, p.151-191, 1997.
- 52- ROSSMANN, M.G., MORAS, D., OLSEN, K.W. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, v.250, n.463, p.194-199, 1974.
- 53- ROULD, M.A., PERONA, J.J., SÖLL, D., STEITZ, T.A. Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8 Å resolution. *Science*, v.246, n.4934, p.1135-1142, 1989.
- 54- SAKS, M.E., SAMPSON, J.R., ABELSON, J.N. The transfer RNA identity problem: a search for rules. *Science*, v.263, n.5144, p.191-197, 1994.
- 55- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 56- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.74, n.12, p.5463-5467, 1977.
- 57- SCHMID, F.X. *Protein Structure, a Practical Approach*. New York: Oxford University Press Inc., 1997.
- 58- SCHWEET, R.S. The quantitative determination of amino acid hydroxamides. *Biochim et Biophys. Acta*, v.18, n.4, p.566, 1955.

- 59- SEVER, S., ROGERS, K., ROGERS, M.J., CARTER, C.JR., SÖLL, D. Escherichia coli tryptophanyl-tRNA synthetase mutants selected for tryptophan auxotrophy implicate the dimer interface in optimizing amino acid binding. *Biochemistry*, v.35, n.1, p.32-40,1996.
- 60- SHI, W., CHOW, K.C., WONG, J.T.F. High-level expression of *Bacillus subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase in Escherichia coli. *Biochem. Cell Biol.*, v.68, n.2, p.492-495, 1990.
- 61- SIATECKA, M., ROZEK, M., BARCISZEWSKI, J., MIRANDE, M. Modular evolution of the Glx-tRNA synthetase family--rooting of the evolutionary tree between the bacteria and archaea/eukarya branches. *Eur. J. Biochem.* v.256, n.1, p.80-87, 1998.
- 62- SILVIAN, L.F., WANG, J., STEITZ, T.A. Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA^{Ile} and mupirocin. *Science*, v.285, n.5430, p.1074-1077, 1999.
- 63- SIMPSON,A.J.G., REINACH,F.C., ARRUDA,P., E CONSÓRCIO GENOMA. The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa. The Xylella fastidiosa Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature*, v.406, n.6792, p.151-157, 2000.
- 64- SMIRNOV, A.V., ENGLISH, D.S., RICH, R.L., LANE, J., TEYTON, L., SCHWABACHER, A.W., LUO, S., THORNBURG, R.W., PETRICH, J.W. Photophysics and biological applications of 7-azaindole and its analogs *J. Phys. Chem.B*, v.101,n.15, p.2758-2769, 1997.
- 65- SOUMILLION, P., JESPERS, L., VERVOORT, J., FASTREZ, J. Biosynthetic incorporation of 7-azatryptophan into the phage lambda lysozyme: estimation of tryptophan accessibility, effect on enzymatic activity and protein stability. *Protein Eng.*, v.8, n.5, p.451-456, 1995
- 66- STEINBERG, W., ANAGNOSTOPOULOS, C. Biochemical and genetic characterization of a temperature-sensitive, tryptophanyl-transfer ribonucleic acid synthetase mutant of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriology*, v.105, n.1, p.6-19, 1971.
- 67- STEWARD, L.E., COLLINS, C.S., GILMORE, M.A., CARLSON, J.E., ROSS, J.B.A., CHAMBERLIN, A.R. *In vitro* site-specific incorporation of fluorescence probes into β -galactosidase. *J.Am.Chem.Soc.*, v.119, p.6-11, 1997.
- 68- STOVER,C.K., PHAM,X.Q., ERWIN,A.L., MIZOGUCHI,S.D., WARRENER,P., HICKEY,M.J., BRINKMAN,F.S., HUFNAGLE,W.O., KOWALIK,D.J., LAGROU,M, GARBER,R.L., GOLTRY,L., TOLENTINO,E., WESTBROCK-WADMAN,S., YUAN,Y., BRODY,L.L., COULTER,S.N., FOLGER,K.R., KAS,A., LARBIG,K., LIM,R., SMITH,K., SPENCER,D., WONG,G.K., WU,Z. AND PAULSEN,I.T. Complete genome sequence of

- Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, v.406, n.6799, p.959-964, 2000.
- 69- STUDIER, F.W., ROSENBERG, A.H., DUNN, J.J., DUBENDORFF, J.W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, v.185, p.60-89, 1990.
- 70- SYDOR, J.R., HERRMANN, C., KENT, S.B.H., GOODY, R.S., ENGELHARD, M. Design, total chemical synthesis, and binding properties of a [Leu-91-N1-methyl-7-azaTrp]Ras-binding domain of c-Raf-1. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA*, v.96, n.14, p.7865-7870, 1999.
- 71- TREZEGUET, V., LABOUESSE, B. The adenosine triphosphate-pyrophosphate isotopic exchange reaction: a tool for determination of tryptophan. *Analytical Biochemistry*, v.154, n.2, p.618-623, 1986.
- 72- VENYAMINOV, S.Y., BAIKALOV, I.A., WU, C.S.C., YANG, J.T. Some problems of CD analyses of protein conformation. *Analytical Biochemistry*, v.198, n.2, p.250-255, 1991.
- 73- VENYAMINOV, S.Y., BAIKALOV, I.A., SHEN, Z.M., WU, C.S.C., YANG, J.T. Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Analytical Biochemistry*, v.214, n.1, p.17-24, 1993.
- 74- WONG, C.R., EFTINK, M.R. Incorporation of tryptophan analogues into staphylococcal nuclease, its V66W mutant, and Delta 137-149 fragment: spectroscopic studies. *Biochemistry*, v.37, n.25, p.8938-8946, 1998.