UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Assuero Faria Garcia

Thi1, uma proteína envolvida na síntese de tiamina em *Arabidopsis*
thaliana: análises estruturais do mutante Thi1(A140V)

São Carlos

2011

Assuero Faria Garcia

Thi1, uma proteína envolvida na síntese de tiamina em *Arabidopsis thaliana*: análises estruturais do mutante Thi1(A140V)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Versão corrigida

São Carlos

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Garcia, Assuero Faria.

Thi 1, uma proteína envolvida na síntese de tiamina em *Arabidopsis thaliana*: análises estruturais do mutante Thi 1 (A140V)./ Assuero Faria Garcia; orientador Ana Paula Ulian de Araujo-- versão corrigida - São Carlos, 2011.

150 p.

Tese (Doutorado em Ciência - Área de concentração: Física Aplicada – Opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

1. Tiazol sintase (Thi 1). 2. Tiamina. 3. *Arabidopsis thaliana*. 4. Dicroísmo circular. 5. Fluorescência. I. Título.

Dedico este trabalho a meus pais,
primeiramente, e a mim por ter vencido
mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre estiverem presentes em minha vida, sempre me incentivaram, dando todo suporte e apoio, fornecendo condições para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos e projetos de vida;

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, primeiramente por ter acreditado em minha capacidade e ter me concedido a oportunidade de ter sido seu aluno de doutorado. Agradeço ainda pela amizade, pela paciência e confiança;

À Profa. Dra. Claudia Elisabeth Munte, que apareceu no finalzinho do trabalho, mas foi de fundamental importância para o fechamento desta tese. Sua boa vontade e disposição para ajudar foram a salvação da lavoura;

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, por ter cedido os clones de *thi1(A140V)*;

Ao Prof. Dr. Ricardo de Marco, pelo auxílio nos experimentos de massas;

Ao Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo, pelo auxílio nos ensaios de cristalização;

Ao Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho (Jabah), pela amizade e por ser um excelente professor. Suas aulas foram fundamentais na minha formação: apesar da dificuldade, termodinâmica nunca me pareceu tão fácil;

À Profa. Dra. Leila, responsável pela minha ida para a Biofísica e pela minha iniciação no meio acadêmico;

Ao corpo técnico do Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas": Andressa (Drê), Bel e Fernando, não só pela competência, mas pela amizade, pelo carinho e por estarem sempre prontos para ajudar;

Ao Zé, Thaty, Bel e Julia pela grande ajuda na impressão da tese;

E claro, aos técnicos do Grupo de Cristalografia Susana (Sur), Maria, Bianca, Humberto e Kelven, sempre presentes e dispostos a ajudar;

Ao Thales, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis, mas também nos momentos de alegria. Por ter me ensinado que nos momentos de crise nada melhor do que sangue-frio,

banho gelado e café!!! E por sempre ter ajudado, dando uma palavra de conforto, ou uma bela bronca para as crises sem sentido, pelo carinho, pelo companheirismo, pela cumplicidade, e ainda pelos almoços, e jantares sempre com um bom vinho pra relaxar... Ah! E não posso esquecer dos soertes, sempre me tirando da linha, né peste! Ah! Mais outra coisa, por ter trazido o Francês pra minha vida, sendo um excelente professor!!! *Je suis très heureux que tu fasses partie de ma vie...*

A minha pequena Lua, pelo amor incondicional sempre presente com sua carinha linda e seu pêlo gostoso... A gata mais linda do mundo....

Aos amigos antigos da biofísica (não vou citar nomes, quem for esperto saberá em qual categoria se encaixa), alguns ainda estão por aqui e outros já seguiram seu caminho, mas mesmo distantes ainda estão presentes e sem sombra de dúvida sempre estarão em minha vida;

Aos novos e queridos amigos da biofísica (não vou citar nomes, quem for esperto saberá em qual categoria se encaixa), que apesar do curto tempo já conquistaram meu carinho e afeto;

Aos demais que se encaixam na categoria colegas (não vou citar nomes, quem for esperto saberá em qual categoria se encaixa), simplesmente por não termos tanta intimidade;

Aos amigos beberrões, companheiros de todas as horas... apesar destes estarem nas categorias discriminadas acima, sinto a necessidade de registrar em mais este parágrafo: Ana Isabel, Joci, Julio, Debys, Luiz, Paty (JB), Ana Eliza, José Luiz, Fernanda, Thaty, Drê (quando o Fernandinho deixa..), Valérinha, Fábio...

Ao corpo docente do Grupo de Biofísica Molecular "Sérgio Mascarenhas": Nelma, Otaciro, Ricardo, Marcão, Xuxa, diretamente ou indiretamente todos exerceram um papel muito importante tanto para o meu crescimento profissional como pessoal;

A secretária Éster pela atenção e amizade;

A toda minha família e amigos pelo carinho e apoio;

Ao pessoal da secretaria da pós-graduação por toda atenção e disponibilidade em ajudar.

As Meninas da biblioteca pela ajuda na correção das referências e formatação da tese;

A Universidade de São Paulo, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada: opção Física Biomolecular do Instituto de Física de São Carlos;

A CAPES pelo auxílio financeiro.

"You have brains in your head. You have feet in your shoes. You can steer yourself in any direction you choose. You're on your own. And you know what you know. You are the guy who'll decide where to go."

Dr. Seuss

RESUMO

Garcia, A. F. **Thi1, uma proteína envolvida na síntese de tiamina em *Arabidopsis thaliana*: análises estruturais do mutante Thi1(A140V)**. 2011. 150p. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

A forma ativa da vitamina B₁, tiamina pirofosfato (TPP), é um cofator indispensável para certas enzimas que atuam no metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Sua biossíntese se dá pela formação independente de suas partes componentes pirimidina e tiazol. Em procariotos a via de síntese para vitamina B₁ já foi esclarecida, entretanto em eucariotos ainda existem ainda algumas lacunas a serem preenchidas. Em *Arabidopsis thaliana* a proteína Thi1 é possivelmente a responsável pela síntese do motivo tiazólico, uma vez que um composto relacionado a TPP foi encontrado em sua estrutura. Neste trabalho, Thi1 e seu mutante natural Thi1(A140V), o qual é responsável pela auxotrofia para tiamina numa linhagem mutante de *A. thaliana*, foram estudados com intuito de verificar a influência da mutação pontual na estrutura e na atividade de Thi1. As proteínas foram produzidas em *E. coli* e análises biofísicas usando anisotropia de fluorescência e Dicroísmo Circular (CD) mostraram diferenças consideráveis na estabilidade protéica. Estudos de desnaturação mostraram diferenças na temperatura de transição (T_m), de cerca de 4 °C maior para Thi1, e na concentração de guanidina na qual metade das proteínas estavam desnaturadas, de 0,42 M para Thi1 e 0,24 M para Thi1(A140V). Os dados de anisotropia de fluorescência obtidos a partir da desnaturação térmica também confirmaram a maior instabilidade de Thi1(A140V) frente a Thi1. Para avaliar a presença e caracterizar o provável precursor de TPP em Thi1(A140V), foram também realizados ensaios de absorção, CD e infra-vermelho dos ligantes intrínsecos. Os resultados destas análises mostraram que as moléculas poderiam apresentar diferenças em seus grupos constituintes. Entretanto, os experimentos complementares de Ressonância Magnética Nuclear (RMN 1D ¹H e 2D TOCSY) revelaram que as diferenças observadas nas amostras dos ligantes, provenientes de Thi1 e de Thi1(A140V), tratavam-se na verdade de diferenças nas proporções de quatro populações distintas de compostos, compondo um *pool* de ligantes. Na amostra proveniente de Thi1(A140V), a população dominante correspondeu à molécula de adenosina difosfato, ADP. Ainda, embora em ambas as amostras o ADT tenha sido encontrado, aquela derivada de

Thi1(A140V) apresentou uma população significativamente menor deste composto. Concluindo, os resultados demonstraram que a mutação A140V levou a uma maior instabilidade conformacional em Thi1 e, além disso, a presença de quantidades reduzidas de ADT em Thi1(A140V) sugerem que esta alteração tenha contribuído de alguma forma para a redução de sua atividade.

Palavras chaves: Tiazol Sintase (Thi1). Tiamina. *Arabidopsis thaliana*. Dicroísmo circular. Fluorescência.

ABSTRACT

Garcia, A. F. **Thi1, a protein involved on biosynthesis of thiamin in *Arabidopsis thaliana*: structural analysis of Thi1(A140V) mutant**. 2011. 150p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The active form of vitamin B₁, Thiamine pyrophosphate (TPP), is an indispensable cofactor for some enzymes that act on carbohydrates and amino acids metabolism. Its biosynthesis requires the independent formation of its compounds, pyrimidine and thiazole. In prokaryotes, the vitamin B₁ biosynthetic way has already been elucidated, but in eukaryotes there are some gaps to be filled. In *Arabidopsis thaliana*, the Thi1 protein is possibly responsible for the synthesis of the thiazole moiety, since a related compound to TPP was found in its structure. In this work, we have investigated Thi1 and its natural mutant Thi1(A140V), which is responsible for the thiamin auxotrophy in *A. thaliana* mutant line, to identify the role this mutation plays in the structure and activity of Thi1. The proteins were produced in *E. coli* and the results of biophysical analysis using fluorescence and Circular Dichroism (CD) showed considerable differences in the protein stability. Thermal and chemical unfolding studies have shown a difference in the melting temperature (around 4 °C higher for Thi1) and concentration of guanidine at which half of the protein had unfolded (0,42 M for Thi1 and 0,24 M for Thi1(A140V)). The fluorescence anisotropy data obtained from thermal unfolding showed Thi1(A140V) is more unstable compared to Thi1. We have also carried out tests of absorption, CD and infra-red to assess the presence and to characterize the possible precursor of TPP in Thi1 (A140V). The results showed that the ligands could have different compositions. However, complementary results from NMR (1D ¹H e 2D TOCSY) revealed that the difference observed in the ligand samples from both proteins were actually related to the proportion of four distinct compound population, representing a ligand pool. In the sample from Thi1(A140V), the dominant population corresponded to ADP. Besides, although both samples contained ADT, it was significantly less abundant in that one derived from Thi1(A140V). Concluding, the results demonstrated that the A140V mutation led to a more unstable conformation of Thi1 and, additionally, the presence of smaller amounts of ADT in Thi1(A140V) suggests this change might have contributed to reducing its activity.

Keywords: Thiazole Synthase (Thi1). Thiamine pyrophosphate. *Arabidopsis thaliana*. Circular dichroism. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	–	Tiamina e seus derivados fosforilados	30
Figura 1.2	–	Via de biossíntese de tiamina proposta para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e para plantas	34
Figura 1.3	–	Mecanismo proposto para formação do precursor da porção tiazol da vitamina B1 em <i>S. cerevisiae</i> .	36
Figura 1.4	–	Seqüência de aminoácidos de Thi1.	39
Figura 1.5	–	Estrutura monomérica de Thi1 e sítio de interação com ligante.	40
Figura 1.6	–	Estrutura quaternária de Thi1 e diagrama da interface de dimerização.	42
Figura 1.7	–	Região da seqüência de aminoácidos onde ocorre a mutação pontual.	43
Figura 2.1	–	Esquema das etapas seguidas na apresentação desta tese.	47
Figura 2.2	–	Esquema ilustrativo das construções protéicas utilizadas neste trabalho.	49
Figura 3.1.1	–	Amplificação de <i>thi1</i> e <i>thi1(A140V)</i> e análise de restrição.	70
Figura 3.2.1	–	Análise da expressão heteróloga de Thi1 em células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) induzida por 0,4 mM de IPTG, a 37 °C.	71
Figura 3.2.2	–	Análise de solubilidade de Thi1 e Thi1(A140V).	72
Figura 3.3.1	–	Análise da purificação de Thi1 e Thi1(A140V).	74
Figura 3.4.1	–	Eletroforese não desnaturante	76
Figura 3.4.2	–	Determinação do estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular	78
Figura 3.4.3	–	Determinação do Raio de Stokes de Thi1 e Thi1(A140V).	79
Figura 3.4.4	–	Espectros de massas ESI-MS de Thi1 e Thi1(A140V).	80
Figura 3.5.1	–	Espectros de CD de Thi1 e de Thi1(A140V).	83
Figura 3.5.2	–	Estrutura cristalográfica do monômero de Thi1.	85
Figura 3.5.3	–	Espectro de Near/UV CD de Thi1 e Thi1(A140V).	87
Figura 3.5.4	–	Espectros de emissão de fluorescência de Thi1 e Thi1(A140V)	88
Figura 3.5.5	–	Gráfico de Stern-Volmer de supressão de acrilamida para Thi1 e Thi1(A140V).	91
Figura 3.5.6	–	O efeito do pH sobre a estrutura secundária de Thi1	93
Figura 3.5.7	–	Influência do pH sob estrutura terciária de Thi1 e Thi1(A140V),	96

	monitorado por emissão de fluorescência estática	
Figura 3.5.8 –	Comparação da influência do pH na estrutura secundária ($[\theta]_{220}$) e terciária (CM) de Thi1	97
Figura 3.5.9 –	Anisotropia em função do pH para Thi1 e Thi1(A140V) e previsão da carga para cada monômero em diferentes pHs..	99
Figura 3.5.10 –	Desenovelamento químico de Thi1 e Thi1(A140V) monitorado por Far/UV CD.	102
Figura 3.5.11 –	Desenovelamento químico monitorado por fluorescência intrínseca	103
Figura 3.5.12 –	Desnaturação térmica de Thi1 e Thi1(A140V) monitorada por CD.	105
Figura 3.5.13 –	Emissão de fluorescência do triptofano frente a variação de temperatura.	107
Figura 3.5.14 –	Anisotropia de fluorescência frente a variação de temperatura.	109
Figura 3.7.1 –	Representação esquemática de extração do ligante de Thi1 ou Thi1(A140V).	111
Figura 3.7.2 –	Análise dos ligantes de Thi1 e Thi1(A140V) por HPLC	112
Figura 3.7.3 –	Espectro de absorção do ligante de Thi1.	113
Figura 3.7.4 –	Representação da estrutura química da molécula de ADT.	114
Figura 3.7.5 –	Análise do ligante de Thi1 por Near/UV CD	116
Figura 3.7.6 –	Espectros de FT-IR dos ligantes de Thi1 em pastilhas de KBr	117
Figura 3.7.7 –	Estruturas químicas do ligante ADT e de ADP.	121
Figura 3.7.8 –	Espectro 1D 1H das moléculas ATP, ADT, AMP	122
Figura 3.7.9 –	Espectros 1D 1H dos ligantes de Thi1 e Thi1(A140V).	123
Figura 3.7.10 –	Espectro TOCSY do ligante de Thi1, identificando as correlações encontradas para a molécula de ADT.	124
Figura 3.7.11 –	Espectro TOCSY do ligante de Thi1(A140V), identificando as correlações encontradas para a molécula de ADP	125
Figura 3.7.12 –	Espectro TOCSY do ligante de Thi1(A140V), identificando as correlações encontradas para a segunda conformação da molécula de ADP.	126
Figura 3.7.13 –	Ampliação da região de contato entre o próton l e seus vizinhos k, j e i do diagrama de correlação TOCSY da região da adenina e ribose presentes no ligante Thi1(A140V).	127
Figura 3.7.14 –	Espectro TOCSY do ligante de Thi1(A140V), identificando as correlações encontradas para a quarta molécula, não identificada	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Distúrbios clínicos associados com a deficiência de tiamina (vitamina B1)	31
Tabela 2	–	Doenças genéticas relacionadas com a deficiência de vitamina B1	32
Tabela 3	–	OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENES THI1 E THI1(A140V)	49
Tabela 4	–	Parâmetros teóricos calculados para Thi1 e Thi1(A140V)	54
Tabela 5	–	Proteínas padrão utilizadas na construção da curva de calibração do gel nativo	55
Tabela 6	–	Proteínas padrão utilizadas na construção da curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular	57
Tabela 7	–	Massas calculadas a partir dos espectros de ESI para Thi1 e Thi1(A140V)	81
Tabela 8	–	Estimativas de estrutura secundária para Thi1 e Thi1(A140V), pH 8,0	84
Tabela 9	–	Estimativa de estrutura secundária para Thi1 e Thi1(A140V) em diferentes pHs	94
Tabela 10	–	Números de ondas esperados para alguns grupos funcionais e assinalamento estrutural com os ligantes de Thi1	118
Tabela 11	–	Deslocamentos químicos do composto desconhecido.	120

LISTA DE ABREVIATURAS

TMP	Tiamina monofosfato
TPP	Tiamina pirofosfato
ThDP	Tiamina difosfato
TTP	Tiamina trifosfato
ATTP	Tiamina adenosina trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
HMP-PP	4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina difosfato
HET-P	tiazol [4-metil-5- β -(2-hidroxietil) tiazol fosfato]
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PLP	Piridoxal-5-fosfato
AIR	5-aminoimidazol ribonucleotídeo
HMP-P	4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina fosfato
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desorribonucleico complementar
AHZ	2-carboxilato-4-metil-5- β -(etil adenosina 5'-difosfato) tiazol
ADT	Adenosina difosfato-5-(2-etil)-4-metiltiazol-2-carboxilato
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético

LB	Meio de cultura Luria Bertani
MM	Massa molecular
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
U	Unidades
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo
BSA	Albumina de soro bovino
OVA	Ovalbumina
ACB	Anidrase carbônica bovina
ITS	Inibidor de tripsina de soja
CIT-C	Citocromo C
ESI/MS	<i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>
UV	Ultravioleta
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
HPLC	<i>High-performance liquid chromatograph</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
DSS	<i>4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid</i>
TOCSY	<i>T</i> Otal <i>C</i> orrelation <i>S</i> pectroscopY.
FID	<i>Free Induction Decay</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 TIAMINA E SEUS DERIVADOS	29
1.2 A BIOSÍNTESE DE TIAMINA (VITAMINA B ₁)	32
1.3 TIAZOL SINTASE (THI1) DE ARABIDOPSIS THALIANA	38
1.4 LINHAGEM MUTANTE TZ-201 DE ARABIDOPSIS THALIANA	43
1.5 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA	44
2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE THI1 E THI1(A140V)	47
2.1.1 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> e plasmídeos utilizados para expressão proteica	47
2.1.2 Subclonagem de <i>thi1</i> e <i>thi1(A140V)</i>	48
2.1.3. Subclonagem dos genes de interesse em vetor de expressão	50
2.1.4 - Expressão das proteínas recombinantes	51
2.2 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	52
2.2.1 Lise Celular e análise da solubilidade de <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	52
2.2.2 Purificação de <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	52
2.2.3 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	53
2.2.4 Determinação da concentração de <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	53
2.3 ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO DE THI1 E THI1(A140V)	54
2.3.1 Eletroforese em gel nativo (condições não desnaturantes)	54
2.3.2 Cromatografia de exclusão molecular	56
2.3.3 Espectrometria de Massas de <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	57
2.4 CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE THI1 E THI1(A140V)	58
2.4.1 Obtenção dos espectros de CD para <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	58
2.4.2 Obtenção dos espectros de Fluorescência - Estado Estacionário	60
2.4.3 Obtenção dos espectros de Anisotropia de Fluorescência - Estado Estacionário	61
2.4.4 Cálculo da energia de ativação de <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	61
2.5 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO	63
2.6 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE INTRÍNSECO DE THI1 E THI1(A140V)	63
2.6.1 Obtenção dos ligantes de <i>Thi1</i> e <i>Thi1(A140V)</i>	63
2.6.2 Análise dos ligantes por HPLC	64
2.6.3 Análise dos espectros de absorção dos ligantes	65
2.6.4 Estudo comparativo da estrutura dos ligantes por Near/UV CD	65
2.6.5 Investigação estrutural por FT-IR	65
2.6.6 Análise estrutural comparativa da composição dos ligantes por RMN	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	69
3.1. CLONAGEM DE THI1 E THI1(A140V)	69
3.2. - EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	70

3.3. PURIFICAÇÃO DE THI1 E THI1(A140V).....	72
3.4. ESTUDOS DE OLIGOMERIZAÇÃO DE THI1 E THI1(A140V)	74
3.5 CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DE THI1 E THI1(A140V).....	81
3.5.1 Efeito da mutação pontual na estrutura secundária de Thi1	82
3.5.2 Efeito da mutação pontual na estrutura terciária de Thi1	84
3.5.3 O efeito do pH na estabilidade de Thi1.....	91
3.5.4 Efeito da mutação pontual nas propriedades termodinâmicas de Thi1 frente a agente desnaturante e temperatura.....	99
3.6 ENSAIOS DE CRISTALIZAÇÃO DE THI1 E THI1(A140V)	109
3.7 CARACTERIZAÇÃO DO LIGANTE INTRÍNSECO DE THI1 E DE THI1(A140V)	110
4 CONCLUSÕES.....	133
REFERÊNCIAS.....	137

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tiamina e seus derivados

A primeira vitamina B identificada foi a tiamina, derivando daí o nome vitamina B₁. Em Java, em 1630, o físico holandês Jacobus Bonitus descreveu a doença beribéri (que significa ovelha), na qual relatava pacientes com joelhos trêmulos e pernas tortas, que quando caminhavam lembravam ovelhas. O primeiro indício da causa real de beribéri foi relatado em 1880, em um navio japonês, quando foi notada uma relação entre a dieta dos marinheiros e um elevado número de casos da doença. A partir da mudança da dieta dos marinheiros, a incidência da doença caiu de 40 para 0 % num período de seis anos. Apesar destas evidências, a comunidade médica ainda acreditava que a doença era provocada por uma infecção microbiana ou uma toxina produzida por algum microrganismo ¹. Em 1886, após meses de pesquisas em busca da toxina ou do micróbio relacionado ao beribéri, o médico holandês Christian Eijkman notou que as galinhas que estavam fora (no quintal) de seu laboratório haviam desenvolvido sintomas parecidos com os sintomas do beribéri. Ele notou que as galinhas alimentadas com arroz branco (polido ou triturado) desenvolviam polineurite e que uma dieta com arroz parcialmente polido, descascado ou ainda com a casca, prevenia a doença ou até mesmo curava as galinhas doentes¹⁻². Porém, somente em 1911, um jovem bioquímico polonês, Casimir Funk, cristalizou uma substância amina obtida a partir de farelo de arroz. Ele estava convencido que esta substância era o que ele definiu como fator anti-beribéri, nomeando-a assim vitamina, o que significa amina vital ³. Finalmente, em 1926 Jansen e Donath isolaram a vitamina B₁ do arroz e a nomearam de aneurina, porém cometeram um erro na fórmula proposta e não incluíram o átomo de enxofre. Após 10 anos de pesquisa, Willians e Cline publicaram em 1937 a primeira fórmula correta e a síntese da molécula de tiamina ^{1; 4}.

A tiamina ou vitamina B₁ é uma molécula essencial para todos os seres vivos, desde bactérias até mamíferos, apesar de somente alguns organismos possuírem a capacidade de realizar sua síntese, tais como procariotos, fungos e plantas. Naturalmente a tiamina pode ocorrer como tiamina livre, mas também pode se encontrada como diferentes formas

fosforiladas: tiamina monofosfato (TMP), tiamina pirofosfato (TPP) (tiamina difosfato (ThDP), tiamina trifosfato (TTP) e tiamina adenosina trifosfato (ATTP), figura 1.1. Além destes derivados fosforilados, há ainda diversos derivados dissulfeto de tiamina. Os derivados fosforilados de tiamina são cofatores essenciais utilizados na biossíntese de terpenos e aminoácidos de cadeia ramificada e numa variedade de vias metabólicas de carboidratos, incluindo o ciclo de Calvin, via das pentoses fosfato e o ciclo do ácido cítrico e glicólise ⁵. O derivado mais importante biologicamente ativo é o TPP, que é sintetizado a partir de tiamina livre e de adenosina trifosfato (ATP) pela tiamina pirofosfoquinase, que para ser ativa necessita de magnésio ou outros cátions divalentes como cofator. TPP é um cofator para muitas enzimas que catalisam a descarboxilação de α -cetoácidos (compostos envolvidos em diversos processos biológicos tais como ciclo de Krebs e glicólise)⁶. Assim, a síntese de neurotransmissores, a produção de ácidos nucleicos, ácidos graxos, esteróides e alguns complexos de açúcares dependem de que estes complexos enzimáticos, cujo cofator é o TPP, estejam atuando adequadamente ⁷.

Figura 1. 1 – Tiamina e seus derivados fosforilados.

A tiamina é encontrada em uma grande variedade de fontes naturais como em casca de arroz, outros cereais, levedura, carne (especialmente carne de porco), ovo, leite e folhas verdes. Entretanto, a vitamina B₁ utilizada como suplemento alimentar é produzida praticamente só por síntese química, devido à falta de uma fonte natural rica em tiamina capaz de produzir esta vitamina em larga escala ⁸. Desde 1940, alimentos processados (farinha, pão e cereais) tem sido fortificado com tiamina ⁹.

A deficiência de vitamina B₁ é um grande problema de saúde, particularmente em países onde o arroz é o principal constituinte da dieta básica, pois o processo de polimento do arroz elimina a maior parte da tiamina presente nos grãos. Em humanos, uma dieta deficiente em tiamina pode ocasionar sérios danos ao sistema nervoso central, causando polineurite periférica (beribéri) ou lesões irreversíveis no mesencéfalo (Síndrome de Wernicke-Korsakoff). Estas lesões ocorrem devido à diminuição do nível de tiamina pirofosfato, coenzima da transcetolase citosólica, um complexo composto por três enzimas mitocondriais⁶. Além de uma dieta deficiente em tiamina, outro fator diretamente responsável para o surgimento de tais doenças é o alcoolismo que está diretamente relacionado à diminuição do nível de tiamina no organismo, já que o etanol inibe a ação da enzima tiamina pirofosfoquinase impedindo a conversão de tiamina em tiamina pirofosfato ¹⁰. A tabela 1 traz dados sobre as principais doenças associadas com a deficiência de vitamina B₁, bem como as prováveis doenças associadas a essa deficiência. A privação de tiamina devido a erros de metabolismo pode ainda acarretar doenças genéticas, listadas na tabela 2 ⁹.

Tabela 1 – Distúrbios clínicos associados com a deficiência de tiamina (vitamina B₁)

Doenças associadas	Doenças sugeridas
Beribéri (neuropatia periférica, cardiomiopatia)	Alzheimer
	Catarata
Polineurite	Câncer de cólon
	Arteriosclerose vascular
Síndrome de Wernicke-Korsakoff (encefalopatia)	Diabetes
	Síndrome alcoólica fetal

Esta tabela ilustra as doenças causadas pela deficiência em vitamina B₁. Modificado de Depeint, F. et al. ⁹.

Tabela 2- Doenças genéticas relacionadas com a deficiência de vitamina B₁

Doenças	Mutação genética	Relação com tiamina
Câncer de pulmão	THTR2	Absorção
Câncer	TKTL1	Cofator
Diabetes	THTL1	Cofator
Síndrome de Leigh	PDH	Cofator
<i>Maple syrup urine</i>	BCKDH	Cofator
Doenças neurodegenerativas	TKTL1	Metabolismo do Cofator
Síndrome de Rogers (TRMA)	THTR1	Absorção
Síndrome da Morte Súbita Infantil	TK	Cofator
Predisposição de Wernicke	TK	Cofator

Lista das doenças genéticas (frequentemente presentes como mutações autossomais recessivas) que afetam a absorção, metabolismo ou atividade da tiamina como cofator. THTR1/THTR2: transportador; TKTL1: similar a transcetolase; PDH: piruvato desidrogenase; BCKDK: α -cetoácidos desidrogenase; e TK: transcetolase. Modificado de Depeint, F. et al.⁹.

1.2 A biossíntese de tiamina (Vitamina B₁)

Como já mencionado, somente alguns microrganismos e plantas são capazes de realizar a síntese de tiamina. Os animais possuem a capacidade apenas de metabolizar a tiamina livre, via alimentação, formando um cofator fundamental para uma família específica de enzimas. Sabe-se que tanto em procariotos como em eucariotos, a via de síntese de tiamina *de novo* ocorre em duas etapas distintas: uma sendo a síntese da porção pirimidina, 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina difosfato, HMP-PP (5); a outra sendo a porção tiazol [4-metil-5- β -(2-hidroxietil) tiazol fosfato], HET-P (4)¹¹⁻¹². Apenas duas vias de biossíntese de tiamina em procariotos foram totalmente descritas até o momento, em *Escherichia coli* e em *Bacillus subtilis*¹³⁻¹⁴.

Em bactéria, a síntese de tiamina ocorre graças à atuação de doze proteínas distribuídas em onze passos enzimáticos. Somente na síntese da porção tiazólica há sete proteínas envolvidas, ThiF, ThiS, ThiG, ThiH ou ThiO, ThiI, que utilizam como substrato primário um açúcar DXP (1-dioxi-D-xilulose 5-fosfato), tirosina e ou cisteína. A síntese desta porção está dividida em três etapas distintas. A primeira é realizada pela atuação da enzima 1-dioxi-D-xilulose5-fosfato sintase (Dxs) que utiliza gliceraldeído 3-fosfato e piruvato para formação do açúcar DXP (1-dioxi-D-xilulose 5-fosfato). A etapa seguinte ocorre pela adenilação do enxofre, trazido por ThiS, pela enzima ThiF. O enxofre então é transferido por

ThiI (em *E. coli*) e IscS (ou NifS) formando tiocarboxi no C-terminal de ThiS. Este átomo de enxofre é então incorporado no anel de tiazol de tiamina. Em *B. Subtilis*, ThiO utiliza glicina e em *E. coli*, ThiH utiliza tirosina para produzir diidroglicina. A síntese da porção tiazólica é finalizada pela atuação da enzima ThiG (tiazol sintase), que é responsável pela união do tiocarboxi presente no C-terminal de ThiS com o açúcar DXP e diidroglicina produzindo o tautômero carboxilato fosfato tiazol. Este produto formado é então aromatizado pela enzima TenI (*B. subtilis*) produzindo o intermediário final (4-metil-5- β -(2-hidroxietyl) tiazol fosfato) ¹⁵⁻¹⁷.

Em eucariotos, mais especificamente em *Saccharomyces cerevisiae*, as células sintetizam a porção tiazol a partir de L-cisteína, glicina e um terceiro composto, muito provavelmente NAD^+ (8) ¹¹⁻¹². A porção pirimidina sintetizada em outra via paralela a síntese de HET-P, ocorre a partir de uma histidina e vitamina B₆ (piridoxal-5-fosfato, PLP) ¹⁸. Até o momento acredita-se que a síntese do anel de tiazol é realizada por somente uma única enzima, a tiazol sintase (THI4), responsável por catalisar a reação que produz HET-P ¹⁹⁻²¹, figura 1.2. A biossíntese de tiamina em plantas parece ocorrer por meio de uma via de síntese muito parecida com a via proposta para *S. cerevisiae*, figura 1.2.

Figura 1.2 – Via de biossíntese de tiamina proposta para *Saccharomyces cerevisiae* e para plantas. Thi5/11/12/13, enzimas envolvidas na síntese de HMP-P (13/14) a partir de histidina (11) e vitamina B₆ (12); Thi20/21, enzimas responsáveis pela fosforilação de HMP ou HMP-P para a formação de HMP-PP; Thi1 ou THI4, tiazol sintase; ThiC, enzima envolvida na síntese de HMP-P (10) a partir de AIR (9); HMPK, hidroximetilpirimidina quinase; Thi6, tiamina fosfato difosforilase/hidroxietiltiazol quinase; TPP, tiamina fosfato pirofosfatase; TMP-Pase, tiamina fosfato fosfatase; TPK, tiamina pirofosfoquinase; ?, enzima desconhecida envolvida na síntese de HMP-P (10) a partir de AIR (9). Figura modificado de Roje¹¹.

Apesar da semelhança nas etapas finais da via de síntese de tiamina entre bactéria e *S. cerevisiae*, a biossíntese das regiões heterocíclicas em ambas são diferentes. Diversos estudos mostram que em *S. cerevisiae* a formação da porção do anel de tiazol está relacionada com a proteína tiazol sintase (THI4), apesar desta etapa ainda não ter sido totalmente elucidada. A

resolução da estrutura cristalográfica de THI4 co-cristalizada com um metabólito (adenosina difosfato-5-(2-etil)-4-metiltiazol-2-carboxilato, ADT), sugere que o NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo) possa ser um substrato utilizado na síntese da porção tiazólica. Um estudo recente com mutantes de THI4, permitiu a identificação de três reações parciais catalisadas por eles, levando a proposição de um possível mecanismo de catálise ocorrido na biossíntese de HET-P, figura 1.3 ^{14; 20-23}. Neste mecanismo proposto por *Begley et al.* ¹⁴, ocorre a clivagem da ligação N-glicosil do NAD^+ (15), seguido pela abertura do anel e tautomerização originando o composto 18 da figura 1.3. A reação segue com a formação da imina a partir da glicina (composto 19), seguido por uma tautomerização e perda de água resultando no composto 22. Na sequência ocorrem duas tautomerizações seguidas pela adição de um sulfureto produzindo o composto 25, que sofre uma ciclização originando 26. A reação é completada com a perda de duas moléculas de água seguida pela formação do anel de tiazol. Apesar de o mecanismo proposto ter sido parcialmente validado experimentalmente, o papel THI4 na reação de catálise ainda não foi esclarecido e não se sabe ainda se há ou não outras enzimas envolvidas na catálise e nem qual seria a origem exata do enxofre (figura 1.2) ¹⁴.

Figura 1.3 – Mecanismo proposto para formação do precursor da porção tiazol da vitamina B₁ em *S. cerevisiae*. A fonte do enxofre, indicado por "S⁻²", ainda não foi identificada. Modificado de Begley et al.¹⁴.

TMP é formada por tiamina fosfato sintase (TPS) pela condensação de duas porções, a porção pirimidina formada por 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina difosfato (HMP-PP) e a outra a porção do anel de tiazol, formada por 4-metil-5-(2-hidroxietil)tiazol fosfato (HET-P). Estas duas porções são sintetizadas separadamente e até agora duas vias de síntese para HET-P foram completamente descritas em procariotos¹¹.

A biossíntese de HMP-PP em bactérias ocorre a partir de 5-aminoimidazol ribonucleotídeo (AIR) por uma reação catalisada muito provavelmente por três enzimas: ThiC, ThiD e uma enzima ainda desconhecida. Em *E. coli* ThiC em conjunto com uma segunda enzima não identificada catalisa a reação que converte AIR em 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina fosfato (HMP-P). ThiD, ou HMP-P quinase, finaliza a reação

fosforilando HMP-P o que produz HMP-PP ²⁴. Já em *S. cerevisiae* os precursores de HMP-PP são a vitamina B₆ (piridoxal-5-fosfato, PLP) e L-histidina ²⁵. Apesar da via de síntese de HMP-PP em *S. cerevisiae* ser diferente da via de síntese em bactérias, muitos trabalhos sugerem que a via de síntese de HMP-PP em plantas pode ser mais próxima da via de síntese de HMP-PP em bactérias do que a de HMP-PP de *S. cerevisiae* ¹¹. Kim e colaboradores clonaram o gene *BTHI* de *Brassica napus* que codifica uma enzima bifuncional denominada hidroximetilpirimidina quinase/tiamina-fosfato pirofosforilase (HMP-P quinase/TMPPase) envolvida na biossíntese da porção pirimidina ²⁶⁻²⁷. Além desta enzima bifuncional, outros homólogos à enzima ThiC de bactéria foram identificados em diferentes plantas, incluindo *Arabidopsis* ¹¹.

Como já mencionado, a porção tiazol (HET-P) em bactérias é formada a partir de três substratos diferentes: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, cisteína e glicina ou tirosina ¹⁷. Recentemente foi postulado que, em eucariotos, o principal substrato para a formação do HET-P seria o NAD⁺ e que a reação de catálise seria controlada por uma única enzima, a tiazol sintase (THI4) ^{20; 23}. A estrutura cristalográfica de THI4 bem como diversos estudos bioquímicos mostraram que esta enzima apresenta uma molécula fortemente ligada a cada uma de suas subunidades. Tal molécula apresenta uma estrutura molecular muito parecida com NAD⁺, um forte indicativo de que este ligante poderia ser uma molécula intermediária derivada de NAD⁺, cisteína e glicina para formar HET-P ¹¹. A ocorrência de proteínas homólogas a tiazol sintase (THI4) de leveduras já foi constatada em outros organismos como em *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* ²⁸⁻³⁰. Em *Zea mays* e *A. thaliana* os genes que codificam as proteínas tiazol sintase foram clonados e estudos de localização subcelular sugerem que estes genes estão localizados nos plastídios e mitocôndrias ^{28; 31}.

A biossíntese de tiamina é finalizada pela atuação de uma enzima fosfatase, que hidrolisa TMP, liberando um grupo fosfato (figura 1.2). A concentração do cofator TPP nas células regula a atividade de diversas enzimas envolvidas em processos celulares como fermentação e respostas a estresse. Pelo fato do TPP e seus derivados poderem atuar como sinalizadores metabólicos, torna-se essencial a manutenção do nível de tiamina na célula, que é realizado por meio de um forte controle da via de biossíntese de tiamina.

O controle da via de biossíntese de tiamina é feito por moléculas conhecidas como *riboswitches*, que são pequenas seqüências de mRNA presentes em alguns RNAs que agem como elementos de controle da expressão pela ligação direta de metabólitos. O *riboswitch*

dependente de TPP controla a expressão de enzimas envolvidas na síntese de tiamina em *Arabidopsis*. Quando há muito TPP presente nas células, sua interação com o *riboswitch* induz uma mudança conformacional no mRNA, alterando o sítio de interação com o ribossomo e impedindo a síntese protéica³². Em bactérias há uma ampla ocorrência de *riboswitches* e vários estudos mostram a presença de *riboswitches* específicos para TPP também em fungos, algas e outras plantas^{33; 35}.

1.3 Tiazol Sintase (*Thi1*) de *Arabidopsis thaliana*

Inicialmente o gene *thi1* de *A. thaliana* foi clonado devido à sua capacidade de complementar cepa de *E. coli* deficiente em reparo de DNA por excisão de bases²⁹. Entretanto, a dedução da sequência polipeptídica do gene *thi1* revelou alta identidade deste com genes envolvidos na biossíntese de tiamina em *S. cerevisiae* (51,7 % de identidade e 65,4 % de similaridade), *S. pombe* (55,1 % de identidade e 67,8 % de similaridade) e também com genes estresse-induzido de duas espécies de *Fusarium* (57,8 % de identidade e 71,2 % de similaridade)^{29; 31}. Experimentos de complementação em linhagens de *S. cerevisiae* deficientes em relação ao gene *thi4* (gene essencial para a via de biossíntese de tiamina neste organismo) usando *thi1* deixaram claro que *thi1* era capaz de restabelecer a prototrofia à tiamina. Em outras palavras, as leveduras mutantes para *thi4* contendo o cDNA de *thi1* de *A. thaliana* eram capazes de crescer sem a necessidade de adicionar tiamina ao meio de cultura. Com esta confirmação experimental, o gene de *A. thaliana* foi nomeado *thi1*, 1 por ter sido o primeiro gene identificado de *A. thaliana* relacionado com a via de biossíntese de tiamina^{29; 31; 36}. Além da constatação do envolvimento direto do gene *thi1* na via de biossíntese de tiamina, estes estudos de complementação em leveduras ainda sugeriram um duplo direcionamento do gene para cloroplastos, onde ocorre a síntese de tiamina em plantas, e para mitocôndrias, já que há grandes evidências que em *S. cerevisiae* a biossíntese de tiamina ocorra nestas organelas a pesar de alguns relatos sugerirem que a síntese de tiamina possa ocorrer também no citoplasma^{28-29; 37}.

O gene *thi1*, composto por 1047 pares de bases, codifica uma proteína de 36 kDa (349 resíduos de aminoácidos), figura 1.4, pertencente a uma superfamília de proteínas conhecidas

como *Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase*, composta por duas classes de oxirredutases (I e II) e também por NADH oxidasas e peroxidases. Thi1 foi produzida de forma recombinante e teve sua estrutura cristalográfica resolvida a 1.6 Å, figura 1.5 (a) ³⁸. Interessantemente, a estrutura cristalográfica revelou a presença de uma molécula fortemente ligada a cada subunidade, modelada como 2-carboxilato-4-metil-5-β-(etil adenosina 5'-difosfato) tiazol, nomeada como AHZ por Godoi et al. A mesma molécula foi estudada e paralelamente nomeada como adenosina difosfato-5-(2-etil)-4-metiltiazol-2-carboxilato (ADT) por Chatterjee et al. (figura 1.5 (c)), que acredita ser um produto ou intermediário da reação catalisada por Thi1. A atividade enzimática de Thi1 ainda não foi demonstrada experimentalmente, entretanto como já citado anteriormente alguns estudos de mutação sítio dirigida em sua ortóloga, THI4 de *S. cerevisiae*, possibilitaram a obtenção de mutantes que apresentaram atividade parcial. A partir destes foi possível a identificação de intermediários da reação corroborando para a proposição de um mecanismo de síntese do ADT em *S. cerevisiae*, figura 1.3 ^{12; 23}.

MAAIASTLSL	SSTKPQRLFD	SSFHGSALSA	APISIGLKPR	SFSVRATTAG	YDLNAFTFDP	60
IKESIVSREM	TRRYMTDMIT	YAETD	VDVVVG	AGSAGLSAAY	EISKNNPVQV	120
GGAWLGGQLF	SAMIVRKPAH	LELDEIGVAY	DEQDTYVVVK	HAALFTSTIM	SKLLARPNVK	180
LFNAVAAEDL	IVKGNRVGGV	VTNWALVAQN	HHTQSCMDPN	VMEAKIVVSS	CGHDGPFAT	240
GVKRLKSGM	IDHVPGMKAL	DMNTAEDAIV	RLTREVVPGM	IVTGMEVAEI	DGAPRMGPTF	300
GAMMISGQKA	GQLALKALGL	PNAIDGTLVG	NLSPELVLA	ADSAETVDA		349

Figura 1. 4 – Seqüência de aminoácidos de Thi1. Em vermelho está destacada a seqüência correspondente ao peptídeo sinal, responsável pelo direcionamento protéico para o cloroplasto e em azul, região da seqüência de ligação a dinucleotídeos.

Figura 1. 5 – Estrutura monomérica de Thi1 e sítio de interação com ligante. (a) Estrutura de Thi1 em complexo com seu ligante (em azul), adenosina difosfato-5-(2-etil)-4-metiltiazol-2-carboxilato (ADT), Zn^{2+} (esfera cinza) e duas moléculas de água (esferas vermelhas). **(b)** diagrama topológico de Thi1 com as duas variantes dos motivos de ligação a mononucleotídeo (magenta e azul). **(c)** Representação esquemática das interações entre Thi1 e ADT, as ligações de hidrogênio estão representadas pelas linhas pontilhadas em verde e as interações hidrofóbicas ocorrem com os resíduos destacados em vermelho. Figura modificada de Godoi et al.³⁸.

A estrutura cristalográfica de Thi1 revelou que suas subunidades agrupam-se como um homooctâmero (figura 1.6 (a) e (b)) formado por tetrâmeros de dímeros, ou seja, a estrutura octamérica assume a forma de dois anéis sobrepostos e cada anel é composto por 4 monômeros. As subunidades monoméricas, identificadas na figura como cadeia A e cadeia B, formam um dímero assimétrico por meio de ligações de hidrogênio e interações de van der

Waals, figura 1.6 (c) e (d). Além destas interações na interface de dimerização, cada monômero interage ainda com mais três outros monômeros, um em seu próprio anel e os outros dois no próximo anel. O monômero de Thi1 é formado por nove α -hélices, 13 folhas β e diversas regiões desordenadas, sendo que estes elementos de estrutura secundária são ordenados em duas regiões (figura 1.5 (a) e (b)): a porção N-terminal desordenada seguida por uma longa α -hélice (resíduos de 18 à 38), e um domínio globular $\alpha\beta$ tipo *three-layer sandwich* com uma topologia similar a domínios ligantes de FAD/NAD (resíduos de 39 à 284). Neste domínio globular há dois motivos de ligação de mononucleotídeos, o primeiro tem maior semelhança com a topologia esperada para um domínio de ligação de NAD diferindo apenas pela inserção de um subdomínio entre as fitas $\beta 2$ e α -hélice B, já o segundo motivo não possui uma topologia peculiar, sendo muito menos conservado, apresentando várias diferenças topológicas³⁸.

Figura 1. 6 – Estrutura quaternária de Thi1 e diagrama da interface de dimerização. (a) e (b) diferentes disposições do octâmero, com as dimensões totais de cada face. Em cada subunidade está representado em vermelho a estrutura do ADT. (c) dímero de Thi1, novamente em destaque o ligante ADT em vermelho e também o átomo de zinco (esfera cinza). (d) diagrama esquemático das interações entre os monômeros de Thi1, identificados como cadeia A e B. As ligações de hidrogênio ocorrem entre os resíduos destacados pelo retângulo azul, no total são 13 ligações de hidrogênio. Adaptado de Godoi et al.³⁸.

1.4 Linhagem mutante *tz-201* de *Arabidopsis thaliana*

Vários mutantes deficientes na biossíntese de tiamina já foram identificados e caracterizados. Somente em *A. thaliana* 5 mutantes auxotróficos para tiamina foram descritos até o momento³⁹⁻⁴⁰. Estes mutantes foram isolados e classificados em cinco grupos distintos de acordo com o *locus* em que a mutação ocorre: *py* (cromossomo II), *tz* (V), *th1* (I), *th2* (V) e *th3* (IV)⁴⁰. As linhagens mutantes *py* e *tz* (*locus tz*, corresponde ao gene *thi1*) apesar de apresentarem cotilédones verdes, produzem plantas com folhas albinas que não são capazes de se desenvolver e morrem caso não haja suplementação com tiamina para *py* e *tz* ou pirimidina para *py* ou tiazol para *tz*, já os demais mutantes são viáveis apesar de produzirem plantas com um fenótipo variegado na ausência de suplementação com tiamina^{5;39-40}.

O gene *thi1* da linhagem mutante *tz*, possui apenas uma única alteração de base em relação a sequência do gene *thi1* de *A. thaliana* selvagem, entretanto esta transição de uma C para uma T, provoca uma substituição de um resíduo de aminoácido na posição 140, uma alanina é trocada por uma valina, figura 1.7. Apesar de esta mutação pontual ocorrer entre aminoácidos do mesmo grupo, aminoácidos alifáticos e apolares, esta posição está localizada em uma região altamente conservada entre todos os homólogos eucarióticos de *thi1*. Este fato associado com os estudos que descrevem e comprovam a auxotrofia para tiamina no mutante *tz* de *A. thaliana*, assim como nos ensaios de complementação em levedura, indicam que a mutação tem um importante papel estrutural e ou funcional^{38; 40}.

Figura 1. 7 – Região da sequência de aminoácidos onde ocorre a mutação pontual. A seta azul indica a posição do resíduo de alanina (A) na sequência de aminoácidos de Thi1 selvagem e a seta verde indica o resíduo de valina (V) na sequência de aminoácidos do mutante de Thi1 na posição 140 (posição relativa à sequência de resíduos da estrutura cristalográfica de Thi1, disponível no PDB sob o código de acesso 1RP0).

1.5 Objetivo e justificativa

Vitaminas do complexo B são fundamentais no metabolismo de plantas e outros organismos, assim como para a saúde e nutrição humana. Devido ao grande número de processos metabólicos no qual estão envolvidas, o entendimento da via de biossíntese destas vitaminas tem ganhado grande importância em bioquímica e biologia estrutural. Neste sentido este trabalho teve como objetivo geral avaliar o papel da mutação pontual em Thi1 de *A. thaliana*, utilizando uma abordagem biofísica e estrutural. Ainda, visou explorar as prováveis causas da não funcionalidade de Thi1 por meio de um estudo comparativo entre as proteínas selvagem e mutada.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Produzir de forma recombinante as proteínas Thi1 e Thi1(A140V);
- Analisar fatores físicos e químicos que influenciam na oligomerização;
- Verificar se a mutação pontual tem influência na estabilidade térmica e química da proteína;
- Cristalizar Thi1(A140V) para resolver sua estrutura e esclarecer a natureza do ligante;
- Avaliar se a proteína mutante é co-purificada com a molécula ligante ADT, provável precursor de HET-P responsável pelo fornecimento do anel de tiazol para tiamina;
- Caracterizar o ligante presente na proteína mutada, por meio de estudos comparativos com o ADT, utilizando as técnicas de absorção, dicroísmo circular, fluorescência, FT-IR e ressonância magnética nuclear.

MATERIAIS E MÉTODOS

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos biofísicos com Thi1 e seu mutante natural (Thi1(A140V)), bem como a caracterização do ligante intrínseco de ambas proteínas foram realizados de acordo com as seguintes etapas:

Figura 2. 1 - Esquema das etapas seguidas na apresentação desta tese.

2.1 Expressão heteróloga de Thi1 e Thi1(A140V)

2.1.1 Linhagens de *Escherichia coli* e plasmídeos utilizados para expressão proteica

Foram utilizadas duas linhagens distintas de *E. coli*. A linhagem DH5 Γ (Invitrogen) foi utilizada para a propagação e manutenção dos vetores plasmidiais. A linhagem

BL21(DE3) (Novagen) foi utilizada para expressão das proteínas recombinantes. Esta linhagem além de serem deficientes nas proteases *lon* e *omp T*, fator que as torna adequadas para expressão de proteínas recombinantes⁴¹, possui também uma cópia integrada do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7, sob o controle do promotor *lac UV5*, induzível por IPTG. Para expressão da proteína de interesse o sistema pET (Novagen) foi escolhido, pois este sistema confere, em geral, uma alta eficiência na produção de proteínas recombinantes em *E. coli*.

2.1.2 Subclonagem de *thiI* e *thiI(A140V)*

O plasmídeo contendo o gene *thiI* foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Glaucius Oliva (IFSC, USP) e o plasmídeo contendo o gene *thiI(A140V)* foi cedido pela professora Dra. Marie-Anne Van Sluys (IB, USP), ambos colaboradores deste projeto. Após análise da estrutura cristalográfica de ThiI³⁸, optou-se por retirar porções flexíveis das regiões N e C terminais que não apresentavam densidade eletrônica nos mapas de difração, visando estabilizar a proteína recombinante e facilitar sua cristalização. Vale ressaltar aqui que a proteína cristalizada no trabalho de Godoi et al. Já não possuía o peptídeo de trânsito no N-terminal, além de ter sido tratada com papaína para a digestão das extremidades flexíveis³⁸. Neste sentido, para realizar a expressão da versão truncada das duas proteínas em *E. coli*, oligonucleotídeos foram desenhados. Com base na sequência depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), sob o número de acesso NC_003076, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos para as extremidades 5' (senso) e 3' (anti-senso) do gene (tabela 3). Para ser possível realizar a clonagem no vetor de expressão do sistema pET foram adicionados sítios para as endonucleases de restrição *NdeI* e *EcoRI* nos extremos 5' e 3', respectivamente.

Figura 2. 2 - Esquema ilustrativo das construções protéicas utilizadas neste trabalho. (a) em verde oliva representação da extensão total da sequência primária da proteína Thi1 selvagem. Logo abaixo, consta a representação da versão truncada de Thi1 e/ou Thi1(A140V), das quais foram retirados 50 resíduos da porção N-terminal e 21 resíduos na porção C-terminal. (b) representação do conteúdo predito de estrutura secundária de Thi1 truncada (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>). Os destaques na sequência representam 1º domínio em vermelho e 2º domínio em azul. Legendas: **H** indica o início de uma hélice; **A**, **B** e **C** representam o início de um fita β; volta β; volta γ; ■ resíduos que interagem com ligante; ■ resíduos que interagem com metal; > representam os β-hairpin.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do genes *thiI* e *thiI(A140V)*

Nome ^a	Sequência ^a	Coordenadas ^b
ThiS-NdeI	5' GGATTTG <u>CATATGTACGACTTGAACGCTTTCAC</u> 3'	1 – 20
ThiR- <i>EcoRI</i>	5' CGGAATTCTTATCAGAGAGTTCCGTCAATAGC 3'	816 - 834

^a Sublinhado, nome e sítio da enzima de restrição e grifo descontínuo região interna complementar

^b localização do oligonucleotídeo na sequência codificadora de *ThiI*, em pares de bases

As sequências de *thiI* e *thiI(A140V)* foram amplificadas por PCR, a partir dos plasmídeos recombinantes moldes. Para a reação de PCR foram utilizados 100 ng de DNA molde, juntamente com 100pmol dos oligonucleotídeos ThiS-*NdeI* e ThiR-*EcoRI*, 0,2 mM de dNTPs, 1 unidade de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), 5 µL de 10X *High Fidelity PCR Buffer* + MgCl₂ (Fermentas) e água para completar o volume final da reação, 50 µL. A reação de PCR foi realizada em um termociclador (*Mastercycler gradient Eppendorf*) e o ciclo da reação utilizado para amplificação foi: 2 min. a 94°C, seguido por 30 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C e 60 seg. a 68°C, finalizando com 5 min. a 68°C. O tamanho do produto de PCR amplificado (834pb) foi verificado por eletroforese em gel de agarose.

Após a eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE [1X], os produtos de PCR referentes a *thiI* e *thiI(A140V)* foram purificados utilizando o *kit Wizard SV gel and PCR clean-up System* (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram inseridos no plasmídeo pTZ57R/T (*InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit*- Fermentas), o qual foi propagado em células de *E. coli* DH5α. As colônias transformantes foram cultivadas em meio LB-ágar contendo 0,5mM de IPTG; 0,1mg/mL de X-gal; 0,1mg/mL de ampicilina, a 37°C, “overnight”. Das colônias selecionadas, identificadas visualmente pela coloração branca, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina e submetido à análise do padrão de restrição com as enzimas *Nde I* e *EcoRI*. A confirmação dos clones positivos e análise da fidelidade das sequências foram validadas por sequenciamento, realizado em um sequenciador automático ABI-Prism 377 (Perkin Elmer), segundo instruções do fabricante, realizado no laboratório do Grupo de Cristalografia do IFSC, USP.

2.1.3. Subclonagem dos genes de interesse em vetor de expressão

Confirmada a fidelidade da sequência, os DNAs correspondentes a *thi1* e *thi1(A140V)* foram subclonados nos vetores de expressão. Os vetores de propagação contendo os DNAs de interesse e o vetor de expressão pET-29a (+) (*Novagen*) foram digeridos simultaneamente com as endonucleases de restrição *Nde* I e *Eco*RI, purificados por eletroforese, seguida por extração em gel com o *kit Wizard SV gel and PCR clean-up system* (Promega). Após a purificação e quantificação, os insertos foram misturados com os plasmídeos linearizados (razão molar de vetor e inserto 1:5) para ligação utilizando a enzima T4 DNA *ligase* (Fermentas), por 12 horas a 4°C. A propagação dos plasmídeos resultantes foi realizada pela transformação de células de *E. coli* DH5 α , competentes por cloreto de cálcio ⁴². As colônias transformantes foram selecionadas pela resistência ao antibiótico específico (30 μ g/mL de canamicina). Novamente, os clones positivos foram confirmados por sequenciamento.

2.1.4 - Expressão das proteínas recombinantes

Os plasmídeos recombinantes produzidos a partir da inserção dos DNAs de interesse nos vetores de expressão foram utilizados para a transformação de células de *E. coli* BL21(DE3), competentes por cloreto de cálcio ⁴². Testes de expressão foram realizados a fim de determinar as condições ideais de temperatura, concentração de agente indutor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) e tempo de indução para expressão de Thi1 e Thi1(A140V). As condições otimizadas para expressão das proteínas recombinantes estão descritas a seguir. As colônias transformantes foram inoculadas em meio LB, contendo o antibiótico canamicina na concentração de 30 μ g/mL, crescidas a 37°C, sob agitação constante de 250rpm por 16 h. Este pré-inóculo foi utilizado para a inoculação de 1000mL de meio LB líquido contendo o antibiótico específico, na proporção de 1:100. As células foram cultivadas até a cultura atingir uma densidade óptica (DO), medida em 600nm, de 0,8. A seguir induziu-se a expressão das proteínas com 0,4mM de IPTG e o crescimento foi mantido por 3 horas à 37°C. A produção da proteína recombinante foi monitorada pela retirada de alíquotas da cultura a cada hora, submetidas à análise em SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 15% ⁴³. As bandas referentes as proteínas foram visualizadas por a coloração com *Coomassie Blue* (0,25% de *Coomassie Brilliant Blue* R-250, 90% de etanol absoluto e 10% de ácido acético glacial). Ao final da indução, a cultura foi centrifugada a 4000 x g (rotor GS3-Sorval) durante 10 minutos, a 4°C, as células

sedimentadas foram estocadas a -20 °C ou usadas em sequência para o preparo do extrato protéico.

2.2 Purificação das proteínas recombinantes

2.2.1 Lise Celular e análise da solubidade de Thi1 e Thi1(A140V)

As células foram ressuspensas em tampão contendo 20mM de Tris pH8,0, 300mM de NaCl e 1mM de EDTA, na proporção de 10 mL de tampão para células provenientes de 500mL de cultura. A lise celular foi realizada em alíquotas de 5 mL por sonicação, *Sonic Dismembrator* modelo 500 (Fisher Scientific), operando sob uma potência de 11%, por sete ciclos com intervalos regulares de 30 segundos de repouso em gelo entre cada pulso. Todo o procedimento de descongelamento e lise celular foi realizado a baixa temperatura, mantendo-se os frascos em gelo. O extrato resultante foi centrifugado a 20000 x g por 30 minutos, a 4 °C, possibilitando a separação da fração insolúvel da fração solúvel. Alíquotas de ambos foram retiradas e submetidas à análise em SDS-PAGE 15%.

2.2.2 Purificação de Thi1 e Thi1(A140V)

Com intuito de eliminar qualquer influência que pudesse interferir nos ensaios de cristalização de Thi1 e ou de Thi1(A140V), constatado anteriormente para versão selvagem de Thi1 por Godoi et al. ³⁸, optou-se por trabalhar com as versões sem qualquer *tag*. Dessa maneira, a primeira etapa de purificação de Thi1 ou Thi1(A140V) foi a precipitação com sulfato de amônio, sendo que diversos percentuais de saturação foram testados e avaliados por SDS-PAGE. Após a otimização e padronização, a precipitação com sulfato de amônio foi realizada sob as seguintes condições: a fração solúvel do extrato protéico obtido após a lise celular e centrifugação foi incubada com sulfato de amônio, atingindo 25% de saturação, por

45 minutos sob agitação constante, a 10 °C. Após o período de incubação a solução foi fracionada em tubo *epENDORF* de 2 mL e submetida à centrifugação a 20000 x g por 10 min, a 4 °C. O precipitado, de cada tubo, foi ressuspensão em 1 mL tampão contendo 20 mM de Tris pH8,0, 300 mM de NaCl e 1 mM de EDTA (tampão de ressuspensão) e dialisado extensivamente contra este mesmo tampão.

A segunda etapa de purificação de Thi1 ou de Thi1(A140V) empregada para a separação dos contaminantes remanescentes foi uma cromatografia de exclusão molecular. A fase estacionária utilizada nesta etapa foi uma coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare), pré-equilibrada com tampão de ressuspensão, acoplada a um sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare). O método utilizado para realização da cromatografia foi eluição isocrática sob uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. A eluição da proteína e seus contaminantes foram monitorados pela absorbância a 280 e 220 nm. Durante todas as etapas de purificação alíquotas para análise em SDS-PAGE 15% foram reservadas.

2.2.3 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Durante todas as etapas, desde a expressão a até a fase final de purificação protéica alíquotas foram reservadas e analisadas em SDS-PAGE ⁴³, utilizando um sistema vertical da *Pharmacia LKB Biotechnology*, Uppsala, Suécia. As amostras protéicas foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE contendo corante (azul de bromofenol) e β -mercaptoetanol e fervidas por 5 minutos. A eletroforese foi realizada a 120V até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel, cerca de 2 horas. A coloração das bandas protéicas foi feita por *Coomassie Blue* 0,2% (p/v) preparado em metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v). Os marcadores de massa molecular (MM) utilizados foram: albumina de soro bovino, BSA (66kDa), ovalbumina, OVA (45kDa), anidrase carbônica bovina, ACB (30kDa), inibidor de tripsina de soja, ITS (20,1kDa) e citocromo C, CIT-C (12,4kDa).

2.2.4 Determinação da concentração de Thi1 e Thi1(A140V)

A concentração das proteínas recombinantes foi determinada com base na absorção em comprimento de onda (λ) de 280nm, medido em um espectrofotômetro U-2001 Hitachi, utilizando o coeficiente de extinção teórico (ϵ) calculado a partir da composição dos resíduos de aminoácidos de cada proteína ⁴⁴. O coeficiente de extinção empírico calculado para os monômeros de Thi1 e Thi1(A140V) foram coincidentes e correspondente a $\epsilon_{280} = 19.940 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Esse cálculo foi obtido através do programa ProtParam tool, disponível no servidor ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://ca.expasy.org/tools/protparam.html>) ⁴⁵. Na tabela 4 estão listados os parâmetros calculados para as proteínas Thi1 e Thi1(A140V).

Tabela 4 - Parâmetros calculados para o monômero de Thi1 e Thi1(A140V)

Proteína	Massa Molecular	$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	pI (ponto isoelétrico)
Thi1	29723.4	19940	5.68
Thi1(A140V)	29723.4	19940	5.68

A lei de Beer-Lambert foi utilizada para realizar os cálculos da concentração protéica. Esta lei diz que quando uma luz de intensidade I_0 atinge a amostra e I é a intensidade da luz que após passar pela amostra, ocorre um fenômeno conhecido como absorbância e este pode ser escrito em termos de

$$A = \log_{10}(I_0/I) = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

onde A é a absorbância em 280 nm, ϵ é o coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c é a concentração (M) e l é o caminho ótico (cm).

2.3 Estudos de Oligomerização de Thi1 e Thi1(A140V)

2.3.1 Eletroforese em gel nativo (condições não desnaturantes)

Sob condições nativas, a separação de proteínas depende de muitos fatores incluindo tamanho, forma e a carga nativa. Basicamente a eletroforese em gel nativo difere do SDS-PAGE convencional devido a ausência de SDS e de agentes redutores, geralmente presentes no tampão da amostra utilizado em SDS-PAGE. Esta técnica foi utilizada para a verificação de possíveis monômeros e ou outras forma oligoméricas maiores. A concentração protéica utilizada foi de 2 mg/mL para os experimentos, realizados num sistema comercial *Phast System* (GE Healthcare) em um gel nativo de gradiente, com a concentração de poliacrilamida variando de 8 a 25%. Esta condição é adequada para se obter uma relação linear entre a distância de migração das proteínas (R_f) e o logaritmo das massas moleculares válido para proteínas nativas e globulares de 50 à 750 kDa. Para estas moléculas pode-se dizer que sua massa molecular (R_h) é diretamente proporcional ao valor de $100[\log 100R_f]$. Também foram realizados experimentos em gel nativo com uma concentração fixada em 10% de poliacrilamida, para estes ensaios a concentração protéica utilizada foi de 0,5 mg/mL. Para ambos experimentos um padrão de proteínas, com massas moleculares conhecidas, foi utilizado (kit de calibração para eletroforese GE *Healthcare* de alto peso molecular), tabela 5. Os géis forma corados com *Coomassie blue*. Os fatores de retardação (R_f) das proteínas utilizadas como padrão foram calculados segundo $100[\log 100R_f]$ e em conjunto com os respectivos raios hidrodinâmicos (R_h) foram utilizados para a construção de um gráfico.

Tabela 5 - Proteínas padrão utilizadas na construção da curva de calibração do gel nativo

Proteína	Peso Molecular (Da)	R_h (nm) ^a
Tioglobulina	669000	8,50
Ferritina	440000	6,10
Catalase	232000	5,22
Lactato Desidrogenase	140000	4,30
Albumina	66000	3,55

^a Valores obtidos a partir do manual do kit de calibração para eletroforese GE *Healthcare* de alto peso molecular.

2.3.2 Cromatografia de exclusão molecular

Proteínas que diferem em massa, diferentes populações oligoméricas de uma proteína ou mesmo agregados protéicos podem ser separados por uma técnica conhecida como cromatografia de exclusão molecular ou gel filtração. O princípio básico desta cromatografia está fundamentado na propriedade do polímero utilizado que compõe a matriz da fase estacionária (este pode ser de poliacrilamida, dextrana ou mesmo agarose).

A coluna de gel filtração Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare) foi utilizada para avaliar e comparar o estado de oligomerização das proteínas Thi1 e Thi1(A140V). A coluna foi previamente equilibrada com o tampão de ressuspensão. A eluição da amostra foi isocrática com 1,3 volumes de coluna sob uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min e o volume de amostra injetado foi de 500 μ L.

Para calcular o raio hidrodinâmico (Rh) de Thi1 e Thi1(A140V), a coluna foi calibrada com o *kit* de calibração de coluna gel filtração para baixo e alto pesos moleculares (*Gel Filtration Calibration Kits*, Ge Healthcare), tabela 6. Como recomendado pelo manual do fabricante, os padrões foram preparados em duas misturas protéicas diferentes, a mistura A contendo um conjunto de padrões: ferritina (440.000 Da), conalbumina (75.000 Da), anidrase carbônica (29.000 Da) e ribonuclease A (13.700 Da). A mistura B contendo: aldolase (158.000 Da), ovalbumina (44.000 Da), ribonuclease A (13.700 Da) e aprotinina (6.500 Da). O *Blue Dextran* foi empregado para a determinação do volume morto da coluna. Sabendo-se os volumes de eluição de cada proteína (V_e), foi possível calcular os valores de K_{av} , a partir de $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, sendo V_t o volume total da coluna. Os valores de K_{av} foram utilizados para a construção da curva de calibração, K_{av} versus $\log(M)$ (logaritmo da massa molecular de cada proteína padrão), permitindo o cálculo da massa molecular das proteínas de interesse por regressão linear. Para confirmação das massas e cálculo dos raios hidrodinâmicos de Thi1 e Thi1(A140V), construiu-se um gráfico de $\sqrt{-\log(K_{av})}$ contra o logaritmo dos raios hidrodinâmicos (Rh) das proteínas padrões, onde novamente a partir da regressão linear foram obtidos os valores em questão.

Tabela 6– Proteínas padrão utilizadas na construção da curva de calibração da cromatografia de exclusão molecular.

Proteína	Peso Molecular (Da)	<i>R_h</i> (nm) ^a
Ferritina	440000	6,10
Aldolase	158000	4,81
Conalbumina	75000	3,6
Ovalbumina	43000	3,05
Anidrase Carbonica	29000	2,0
Ribonuclease	13700	1,64
Aprotinina	6500	-

^a Valores obtidos a partir do manual *do Gel Filtration Calibration Kits* GE Healthcare.

2.3.3 Espectrometria de Massas de Thi1 e Thi1(A140V)

Os métodos de ionização como ESI/MS (do inglês, *electrospray ionization mass spectrometry*) e MALDI (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) são amplamente empregados no estudo de peptídeos e proteínas, estas técnicas são caracterizadas pela formação de íons estáveis (por possuírem um excesso energético relativamente baixo). ESI produz múltiplos íons carregados, característica esta que permite a detecção de moléculas e ou complexos protéicos relativamente grandes, levando a determinação da massa molecular com alta precisão. Outra característica que torna a espectrometria de massas, em particular ESI, uma interessante metodologia no estudo de complexos protéicos não covalentes (como interação proteína-proteína, proteína-íon metálico e proteína - ácido nucléico), caracterizada pelo processo de ionização relativamente brando, sob circunstâncias apropriadas os complexos protéicos não covalentes formados em solução podem ser transferidos para fase gasosa.⁴⁶

Antes das injeções para análise das massas intactas de Thi1 e Thi1(A140V), foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular para troca da solução de tampão. Esta troca foi realizada em uma coluna de HiTrap™ *Desalting* (Ge Healthcare) acoplada a um sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare), sob uma eluição isocrática a um fluxo de 2 mL.min⁻¹. Os sais não voláteis presentes na solução tampão foram removidos através da troca da solução tampão de purificação para uma solução tampão acetato de amônia 10 mM pH 7,0, condição

tamponante ideal (e no qual a estrutura nativa da proteína deve ser preservada) para análise por ESI/MS ⁴⁷. Após a troca do tampão as amostras foram acidificadas com 0,1 % de ácido fórmico.

Todos os experimentos de ESI/MS foram realizados em espectrômetro de massas micrOTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), e as análises realizadas pelo *software Compass micrOTOF*. Para ser possível a análise da estrutura quaternária de cada proteína os parâmetros de ionização foram cuidadosamente definidos, para impedir que as interações não covalentes presentes em solução fossem quebradas com a ionização do oligômero. Os parâmetros utilizados em cada análise foram: voltagem do *spray* 4.2 kV, pressão do nebulizador 2 bar, voltagem do cone da amostra -400 V, temperatura de ionização 300 °C, no modo positivo. Estes experimentos foram realizados em colaboração e supervisão do Prof. Dr. Ricardo de Marco (IFSC).

2.4 Caracterização biofísica de Thi1 e Thi1(A140V)

2.4.1 Obtenção dos espectros de CD para Thi1 e Thi1(A140V)

Os experimentos para análise comparativa da estrutura secundária de Thi1 e Thi1(A140V) foram realizados em espectropolarímetro Jasco modelo J-815 *CD Spectrometer* (Toquio, Japão) equipado com um sistema de controle de temperatura (*Peltier*). A concentração protéica utilizada foi 0,25 mg.mL⁻¹ para Far/UV CD e 3,5 mg.mL⁻¹ para Near/UV CD, em tampão tris 20 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM. As medidas foram realizadas com uma média de 8 acumulações, sensibilidade de 100 mGraus, velocidade de varredura igual a 100 nm.min⁻¹, em uma cubeta de quartzo retangular com caminho ótico de 1 mm para Far/UV CD (190 – 250 nm) e 5 mm para Near/UV CD (250 – 350 nm), largura de banda de 1 nm e tempo de resposta de 0,5 s. Os espectros originais passaram pelo processo de subtração das contribuições do solvente e também foram tratados pela aplicação do algoritmo Transformada Rápida de Fourier (*FFT — Fast Fourier Transform*) disponível no programa Origin 8.0, de modo a preservar as bandas típicas. Cada espectro de Far/UV CD foi

convertido para elipticidade molar média por resíduo ($[\theta]_{MRE}$) de acordo com a equação (2). Já os espectros de Near/UV CD foram convertidos para elipticidade molar ($[\theta]_M$) com a equação (3), pois apenas os quatros aminoácidos aromáticos e a presença de algum cofator aromático podem contribuir para o sinal de CD nesta região.

$$[\theta]_{MRE} = \frac{(\theta_{obs} \cdot 0,1 \cdot MRM)}{c \cdot l} \quad (2)$$

$$[\theta]_M = \frac{(\theta_{obs} \cdot 0,1)}{c \cdot l} \quad (3)$$

Para avaliar a estabilidade de Thi1 e Thi1(A140V) em função do pH, as amostras foram incubadas por 12 horas em solução tampão acetato-borato-fosfato de sódio, concentração final de 20 mM contendo 10 mM de NaCl, numa faixa de pH 2,0 a 11,5. As amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min, a 8 °C, para eliminar qualquer precipitado protéico e foram analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular, a temperatura ambiente (25 °C). Durante o tempo de incubação as amostras foram mantidas em banho de gelo.

Com o intuito de comparar a estabilidade de Thi1 e Thi1(A140V) foi feito um estudo comparativo por CD, em relação a elevação da temperatura e de adição de agente caotrópico. Estes experimentos foram monitorados e caracterizados pela mudança nas medidas de elipticidade em 220 nm, induzidas pelo aumento ou diminuição da concentração do agente desnaturante ou pelo aumento da temperatura.

O experimento de desnaturação térmica foi realizado sob uma rampa de aquecimento de 20 até 86 °C, com uma variação de 2 °C, sendo a razão de aquecimento de 1° C.min⁻¹. A reversibilidade térmica das proteínas desnaturadas também foi analisada adquirindo o espectro de CD, nas mesmas condições iniciais, ou seja, após o aquecimento a 86 °C as amostras foram resfriadas até atingir novamente 20 °C, sendo a taxa de resfriamento proporcional a de aquecimento.

O efeito do agente desnaturante sobre a estrutura secundária de Thi1 e Thi1(A140V) foi avaliado mediante o aumento da concentração do agente desnaturante (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 0,9 e 1,0 M de cloreto de guanidina). Para cada concentração de guanidina as amostras foram diluídas cuidadosamente, sempre na proporção de 1:50, sob leve agitação. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min a 4 °C, para garantir que não houve precipitação. As medidas foram realizadas a 25 °C.

2.4.2 Obtenção dos espectros de Fluorescência - Estado Estacionário

Os espectros de emissão de fluorescência foram adquiridos em um espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, equipado com um sistema de controle de temperatura (Neslab RTE-210). As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm, sendo as fendas utilizadas na excitação e emissão 2 e 1 nm, respectivamente. As mudanças estruturais de Thi1 e Thi1(A140V) foram monitoradas frente à excitação seletiva do triptofano em 295 nm. Os espectros de emissão foram monitorados de 300 a 450 nm. A concentração protéica utilizada foi de 0,1 mg.mL⁻¹ em tampão tris 20 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM para as medidas submetidas a variação térmica, ou em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes pHs, de 2,0 a 11,5. Já nos experimentos de desnaturação por guanidina as amostras foram preparadas como descrito anteriormente. Nos experimentos de supressão da fluorescência as concentrações de acrilamida utilizadas cobriram a faixa de 0 a 220 mM. Os espectros originais passaram pelo processo de subtração das contribuições do solvente.

A alteração da polaridade do meio, bem como a perturbação provocada pela variação de temperatura nos espectros de emissão de fluorescência foram avaliadas pelo deslocamento e ou supressão do máximo de emissão e também pela análise do centro de massa espectral (CM). Este parâmetro indica o centro de distribuição energético e também permite uma análise mais exata do deslocamento do espectro. O CM pode ser calculado pela relação:

$$CM = \frac{(\sum \lambda_i F_i)}{\sum F_i} \quad (4)$$

onde F_i é a fluorescência no comprimento de onda λ_i e $\sum F_i$ corresponde a área total do espectro, ou seja, o somatório da intensidade de fluorescência ao longo de todos os pontos de comprimento de onda λ_i ⁴⁸.

2.4.3 Obtenção dos espectros de Anisotropia de Fluorescência - Estado Estacionário

A relação entre a polarização da luz utilizada na excitação da amostra com a radiação emitida durante a fluorescência é que define a espectroscopia de polarização de fluorescência. A mudança da polarização que ocorre entre a excitação e a emissão pode ser usada na análise de processos físicos como difusão rotacional, grau de desnaturação protéica e até mesmo orientação na superfície da amostra. A emissão de fóton como consequência do retorno de um elétron em um nível de mais alta energia para o estado fundamental é o princípio básico da fluorescência. Muitos fluoróforos permanecem no estado excitado por um intervalo de tempo de 10^{-5} até 10^{-8} s, assim o intervalo de tempo entre a absorção e a emissão pode ser grande suficiente para a molécula como um todo ou partes sofrerem um rearranjo estrutural ou mesmo uma reorientação⁴⁹.

Os experimentos de anisotropia foram realizados em espectrofluorímetro ISS K2 (ISS, IL, USA), modo estático, equipado com um sistema de controle de temperatura (Neslab RTE-210). As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm, sendo as fendas utilizadas na excitação e emissão 2 e 1 nm, respectivamente. A concentração protéica utilizada foi de 0,01 mg.mL⁻¹. A anisotropia média foi obtida após 10 varreduras consecutivas a cada temperatura para variação térmica (sendo a variação de 5°C e a razão de aquecimento médio de 1°C.min⁻¹) cobrindo o intervalo de 20 a 90°C ou para variação de pH, realizada em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes pHs, de 2,0 a 11,5.

2.4.4 Cálculo da energia de ativação de Thi1 e Thi1(A140V)

Os espectros obtidos a partir dos experimentos de desnaturação térmica realizados por dicroísmo circular foram analisados e tratados como um processo irreversível de dois estados.

onde N é representa as formas nativa e D a forma desnaturada da proteínas, e k é a constante de velocidade primeira ordem que é dependente da temperatura e pode ser descrito pela equação de Arrhenius,

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (6)$$

onde E_a é a energia de ativação do processo, A constante pré-exponencial (frequência de colisões que a reação produz), R é a constantes dos gases e T a temperatura absoluta ⁵⁰.

As curvas de desnaturação foram expressas em termos da fração de proteína desnaturada por,

$$f_D = \frac{x_n - x_{obs}}{x_n - x_D} \quad \text{e} \quad f_n + f_D = 1 \quad (7)$$

Sendo x correspondente aos mínimos característicos para os espectros de CD. Os índices n e D indicam os valores espectrais da forma nativa e desnaturada, e o índice obs refere-se os valores espectrais observados a uma dada temperatura.

Para a análise dos dados segundo um processo irreversível de dois estados utilizou-se o modelo de Lumry e Eyring, que permite relacionar a equação de Arrhenius com a teoria de estados de transição ⁵¹. Sendo a fração de proteína nativa (x_n) dependente da temperatura, $\ln(1/f_n) = kt$. Assim a curva de transição pode ser expressa em função da temperatura (T), em Kelvin, pela equação 8.

$$\ln\left[\ln\left(\frac{1}{f_n}\right)\right] = \left(\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (8)$$

A partir das propriedades espectrais obtidas por CD, os valores de elipticidade molar foram transformadas em termos da fração de proteína nativa e desnaturada, foi construído um gráfico de $\ln[\ln(1/f_n)]$ em função de $1/T$, que foi ajustado para uma função linear segundo a equação 8, utilizando o programa Origin 8.0. Assim foi possível estimar a energia de ativação de cada reação a partir do coeficiente angular e também obter o valor da temperatura de transição pelo coeficiente linear para Thi1 e Thi1(A140V).

2.5 Ensaios de cristalização

Os ensaios de cristalização de Thi1 e Thi1(A140V) foram realizadas em colaboração com o Dr. Humberto d'Muniz Pereira e o Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo do grupo de cristalografia do IFSC. As triagens iniciais foram realizadas com auxílio de um sistema automatizado de cristalização *Honeybee 939* (Genomic Solution), utilizando a técnica de difusão de vapor por gota depositada (*sitting drop vapor diffusion*)⁵². As condições utilizadas nos experimentos foram as fornecidas pelos fatoriais *Classics* e *Classics II suite* e *Cryos suite*, adquiridos da empresa *Qiagen* e também pelo fatorial *salt RX HT* da empresa *Hampton Research*. Além destes fatoriais, também foram testadas condições semelhantes as realizadas no trabalho de Godoi *et al.*, utilizando-se o método de difusão de vapor com gotas suspensas (*hanging drop vapor diffusion*)³⁸. Os ensaios de cristalização foram realizados a 18 °C, e as concentrações protéicas testadas foram de 4, 6, 10 e 20 mg.mL⁻¹.

2.6 Caracterização do ligante intrínseco de Thi1 e de Thi1(A140V)

2.6.1 Obtenção dos ligantes de Thi1 e Thi1(A140V)

O procedimento para a obtenção dos ligantes de Th1l e de Th1l(A140V) foi exatamente o mesmo, assim como a quantidade de material protéico de partida, cerca de 30 mg. As amostras das proteínas puras foram concentradas para cerca de 4 mL e fracionadas em quatro tubos *ependorfs* de 1 mL. As amostras foram aquecidas a 100 °C por aproximadamente 5 min, a fim de promover a desnaturação protéica. O precipitado formado (proteínas desnaturadas) foi separado do sobrenadante por meio de centrifugação por 10 min, a 16.000 x g, a 4 °C. Para eliminar qualquer resquício protéico, o sobrenadante foi filtrado em um concentrador (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices - Milipore) com limite nominal de peso molecular de 10 kDa. Esta metodologia empregada na obtenção dos ligantes foi semelhante à descrita por Chatterjee e colaboradores, com algumas modificações²⁰.

Para realização das caracterizações espectroscópicas, as amostras contendo o ligante foram submetidas a uma troca de solvente, de tampão para água. Esta troca foi realizada em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-10 (GE Healthcare), que apresenta uma limite de exclusão de 700 Da, acoplada a um sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare), sob uma eluição isocrática de fluxo de 2 mL.min⁻¹.

2.6.2 Análise dos ligantes por HPLC

As amostras resultantes do processo de desnaturação protéica foram analisadas por cromatografia de fase reversa em HPLC (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*), utilizando uma coluna C18 (Waters 25cm x 4.6mm, 6µm). O protocolo a seguir foi adaptado a partir de Chatterjee et al²⁰. As análises foram realizadas em um sistema de cromatografia formado por um módulo de separação *Waters* 2695 e um detector de absorbância *Waters* 2487. Os solventes foram: solvente A – H₂O; solvente B – 100 mM KPi, pH 6.6 e solvente C – Metanol 100 %. O gradiente utilizado, sob um fluxo de 1 ml/min foi o seguinte: 0 min 100 % B, 5 min 10 % A 90 % B, 8 min 25 % A 60 % B 15% C, 14 min 25 % A 60 % B 15 % C, 19 min 30 % A 40 % B 30 % C, 21 min 100 % B, 30 min 100 % B. A absorbância foi monitorada a 258 nm a temperatura ambiente.

2.6.3 Análise dos espectros de absorção dos ligantes

Os espectros de absorção dos ligantes isolados de Thi1 e de Thi1(A140V) foram obtidos cobrindo a faixa de 400 a 230nm, a uma velocidade de 400 nm/min, medidos em um espectrofotômetro U-2001 Hitachi usando uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

2.6.4 Estudo comparativo da estrutura dos ligantes por Near/UV CD

Os espectros de *Near/UV CD* dos ligantes provenientes de Thi1 e de Thi1(A140V) foram adquiridos em um espectropolarímetro Jasco modelo J-815 *CD Spectrometer* (Toquio, Japão). A concentração de ligante utilizada foi baseada no valor de absorção medido em 258 nm, este valor foi de 2,0 A. As medidas foram realizadas na região ultravioleta próximo (250 – 350 nm) como uma média de 8 acumulações, sensibilidade de 100 mGraus, velocidade de varredura igual a 100 nm.min⁻¹, em uma cubeta de quartzo retangular com caminho ótico de 5 mm, largura de banda de 1 nm e tempo de resposta de 0,5 s. Os espectros originais passaram pelo processo de subtração das contribuições do solvente e também foram tratados utilizando um Filtro de Fourier, de modo a preservar as bandas típicas.

2.6.5 Investigação estrutural por FT-IR

Os experimentos de FT-IR foram realizados num espectro fotômetro Nicolet Magna-IR, como uma média de 50 varreduras, com resolução de 4 cm⁻¹, na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹. Todos os experimentos de FT-IR foram realizados na presença de um fluxo constante de nitrogênio, para evitar interferência referente à H₂O. As amostras do ligante foram liofilizadas e imobilizadas em pastilhas de KBr.

2.6.6 Análise estrutural comparativa da composição dos ligantes por RMN

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos ligantes, bem como a análise dos resultados foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Claudia E. Munte, do IFSC, USP. Amostras de ligante de Thi1 e Thi1(A140V) foram preparadas conforme descrito anteriormente. Para as medidas de RMN foram adicionados, às amostras, 100 μ M de DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) e 8 % de D₂O. Todos os experimentos foram realizados a 298 K em um espectrômetro Varian Inova 600, equipado com uma sonda inversa de tripla ressonância (¹H, ¹⁵N, ¹³C) criogênica, localizado no Nacional de Biociências (LNBio), Campinas. O sinal da água foi suprimido com auxílio da sequência de pulsos *WATERGATE* W5⁵³. Espectros 1D ¹H foram adquiridos com 57590 pontos de dados complexos e 32 repetições. Espectros 2D homonucleares TOCSY foram adquiridos em modo de aquisição STATES⁵⁴, com 1024 experimentos na dimensão t₁ e 4096 pontos complexos na dimensão t₂, sendo que um total de 24 repetições (FID – *Free Induction Decay*) foram promediados. O tempo de mistura para a trava de spin (*spin-lock*) foi de 80 ms. Deslocamentos químicos foram referenciados com relação ao grupo metil do DSS, utilizado como padrão interno. Os dados foram processados com o programa TOPSPIN 3.0 (Bruker). Espectros 1D foram analisados com o programa TOPSPIN 3.0 (Bruker); espectros 2D foram analisados com o programa AUREMOL (Bruker).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Clonagem de Thi1 e Thi1(A140V)

O objetivo fundamental deste projeto foi a realização de estudos biofísicos e estruturais comparativos das proteínas Thi1 e seu mutante natural Thi1(A140V), com intuito de obter informações que pudessem relacionar sua estrutura e função. Assim, o primeiro passo foi a produção das proteínas recombinantes Thi1 e Thi1(A140V). O trabalho desenvolvido por Godoi et al. no Grupo de Cristalografia do IFSC, revelou que a proteína Thi1 apresentava uma região tanto na extremidade N como na C-terminal altamente flexível, fato este que dificultava o processo de cristalização. Para evitar que estas regiões atrapalhassem nos futuros ensaios estruturais, oligonucleotídeos foram sintetizados para a clonagem dos genes de *thi1* e *Thi1(A140V)* permitindo a produção da forma truncada de cada proteína, ou seja, sem tais regiões flexíveis.

Na clonagem dos genes *thi1* e *Thi1(A140V)*, foram utilizados dois *primers* para amplificação dos genes de interesse, o Thi1S-*Nde*I que possuía um sítio para *Nde* I e Thi1R-*Eco*RI que possuía um sítio de restrição para *Eco* RI. Os genes *Thi1* e *Thi1(A140V)* foram amplificados por PCR a partir dos plasmídeos recombinantes. Os produtos amplificados, aproximadamente 834 pb, foram purificados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % (figura 3.1.a). Os genes codificantes para Thi1 e Thi1(A140V) foram inseridos no plasmídeo pTZ57R/T e propagado em células de *E. coli* DH5 α . Dentre as colônias transformantes os clones positivos foram confirmados por análise do padrão de restrição como demonstrado na eletroforese em gel de agarose 0,8%, figura 3.1.b. A validação destes clones e análise da fidelidade das seqüências foi feita por seqüenciamento, confirmando assim o sucesso da clonagem.

Figura 3.1. 1 - Amplificação de *thi1* e *thi1(A140V)* e análise de restrição. (a) produtos da PCR após purificação - 1 e 2 correspondem aos fragmentos de DNA amplificados de *thi1* e *thi1(A140V)*, respectivamente. (b) padrão de restrição dos clones de *thi1(A140V)* (colunas 1 e 2) e *thi1* (colunas 3 e 4) em pTZ57R/T respectivamente, após digestão com as endonucleases de restrição *Nde* I e *EcoR* I. MM - padrão em pares de bases *GeneRuler* 1 kb DNA *Ladder* (Fermentas).

Após a validação da identidade seqüencial, um clone de cada gene foi selecionado para a subclonagem em vetor de expressão pET29a (+). Para isto, os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as endonucleases de restrição (*Nde* I e *EcoR* I), afim de liberar os insertos (*thi1* e *thiA(140V)*). O vetor pET29a (+) foi linearizado com as mesmas enzimas de restrição (*Nde* I e *EcoR* I).

Os insertos *thi1* e *thi1(A140V)* foram ligados no vetor de expressão pET29a (+) previamente linearizado. Decorrido o tempo necessário para a ligação ocorrer, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5 α , objetivando a propagação e manutenção dos plasmídeos recombinantes. Colônias transformantes foram selecionadas, seus plasmídeos extraídos e um novo seqüenciamento confirmou a integridade das seqüências de interesse. Um clone positivo de cada construção foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3) com intuito de realizar a expressão das proteínas recombinantes.

3.2. - Expressão das proteínas recombinantes

Sistemas de expressão bacterianos são comumente utilizados para produção de proteínas recombinantes tanto de origem eucarionte como procarionte, pois são relativamente de fácil manipulação, fácil crescimento e baixo custo⁵⁵. Neste trabalho para a produção das proteínas recombinantes utilizou-se células de *E. coli* BL21(DE3). Esta linhagem traz em seu genótipo o lisógeno λ DE3, cuja expressão da T7 RNA polimerase está sob o controle do promotor forte *lacUV5*. A adição do agente indutor IPTG, induz a expressão da T7 RNA polimerase que reconhece o promotor T7 e conseqüentemente permite a expressão do gene de interesse. Após a realização de diversos testes de expressão, a condição mais eficiente frente aos diversos parâmetros variados foi adição de 0,4 mM de IPTG, após a cultura atingir uma densidade óptica em 600 nm de 0,8, sendo que a expressão protéica foi acompanhada por 3 h a 37 °C.

Figura 3.2. 1 - Análise da expressão heteróloga de Thi1 em células de *E. coli* BL21(DE3) induzida por 0,4 mM de IPTG, a 37 °C. (a) Padrão de expressão da proteína de interesse, neste caso consta somente a representação de Thi1. Coluna 1: proteínas totais antes da indução; coluna 2: após 1 hora de indução; coluna 3: após 2 horas de indução; coluna 4: após 3 horas de indução. (b) Padrão de expressão. Coluna 1: Thi1 antes da indução; coluna 2: Thi1 após indução; Coluna 3: Thi1(A140V) antes da indução; coluna 4: Thi1(A140V) após indução. MM representa marcador de peso molecular e a setas indicam a posição esperada para as proteínas recombinantes.

A figura 3.2. 1 mostra um gel de poliacrilamida 15 % representando todo o processo de expressão heteróloga de Thi1 e Thi1(A140V). É nítida a presença de uma banda de expressão de aproximadamente 30 kDa, peso esperado para a subunidade de Thi1 e de Thi1(A140V). Na figura 3.2. 1 (a) nota-se o surgimento de uma banda de expressão protéica após a 1 hora de indução. Após 2 horas da adição do agente indutor há um aumento na expressão, mas decorridas 3 horas de indução não há um aumento significativo na banda de expressão. Aliquotas após 4 e 5 horas também foram coletadas, mas não houve qualquer alteração visível na intensidade da banda de expressão protéica (dados não mostrados). O padrão de expressão de Thi1 ou Thi1(A140V) foi similar no que diz respeito à concentração de agente indutor, temperatura e tempo de expressão, figura 3.2. 1 (b). Além da semelhança no padrão de expressão, outro ponto comum entre Thi1 e Thi1(A140V) foi a solubilidade. Tanto Thi1 como seu mutante natural aparecem majoritariamente na fração solúvel, como mostra a figura 3.2.2.

Figura 3.2. 2 - Análise de solubilidade de Thi1 e Thi1(A140V). Coluna 1: fração insolúvel de Thi1; Coluna 2: fração solúvel de Thi1; Coluna 3: fração insolúvel de Thi1(A140V); Coluna 4: fração solúvel de Thi1(A140V). MM representa marcador de peso molecular e a seta indica a posição esperada para as proteínas recombinantes.

3.3. Purificação de Thi1 e Thi1(A140V)

Uma possível forma de interação entre proteínas é via interações hidrofóbicas. As regiões não-polares na superfície protéica são protegidas por moléculas de água rearranjadas em uma estrutura ordenada, estrutura conhecida como clatrato. Quando duas regiões não-polares se unem, as moléculas de água, antes estruturadas formando uma espécie de “gaiola” ao redor destas regiões, são liberadas causando um aumento na entropia. Este aumento na entropia das moléculas de água em conjunto com a diminuição na solvatação das superfícies hidrofóbicas favorece a associação das moléculas protéicas entre si ⁵⁶. Baseado neste princípio, o protocolo de precipitação com sulfato de amônio, por ser relativamente simples e eficiente, tem sido empregado há décadas como um interessante passo na purificação de proteínas. Neste sentido, como se optou por produzir as proteínas Thi1 e Thi1(A140V) sem cauda de histidina ou proteína carreadora, a metodologia de precipitação com sulfato de amônio foi de grande utilidade como passo inicial de pré-purificação das proteínas de interesse. A porcentagem ótima de saturação determinada para as duas proteínas foi a mesma, 25 % de saturação. Nesta porcentagem de saturação Thi1 e Thi1(A140V) ficaram majoritariamente na fração insolúvel.

A finalização do processo de purificação das proteínas de interesse foi alcançada somente com aplicação de mais uma etapa, após a ressuspensão da fração insolúvel em solução tampão obtida na primeira etapa, a cromatografia de exclusão molecular. Esta metodologia se mostrou mais eficaz para a obtenção de Thi1 e Thi1(A140V) com maior grau de pureza que outros métodos cromatográficos testados inicialmente. Na figura 3.3. 1 (a) estão representados, os cromatogramas referentes ao perfil de eluição de Thi1 e Thi1(A140V). É evidente que ambas apresentam um perfil de eluição semelhante, nas frações iniciais há um pico, eluído na posição correspondente ao volume morto da coluna, o que indica presença de agregados protéicos e ou contaminantes de alta massa molecular que possuem massas superiores ao limite de exclusão da coluna. Em volumes de eluição maiores, em ambos os cromatogramas, nota-se a formação de um pico relativamente largo, o que indica a eluição proteínas com massas moleculares relativamente próximas. Entretanto a análise destas frações por SDS-PAGE 15% (figura 3.3. 1(b)) mostra que as proteínas presentes nas frações correspondentes aos volumes de eluição de 10 a 14 mL são majoritariamente Thi1 ou Thi1(A140V), apresentando um alto grau de pureza (aproximadamente 90%). Um fato interessante a ser destacado para esta etapa é o rendimento por litro de cultura, apesar de Thi1 e Thi1(A140V) serem expressas e solúveis, o rendimento total obtido ao final de cada purificação a partir de 1 litro de meio de cultura foi de cerca de 40 mg para Thi1 e 25 mg de Thi1(A140V). Esta diferença em termos de quantidade sempre foi observada durante todas as

purificações realizadas. Apesar desta constatação é importante frisar que a quantidade de proteínas obtidas ao final do processo de purificação pode ser considerada muito boa. Nota-se que os picos correspondentes a eluição tanto de Thi1 como Thi1(A140V) é relativamente largo compreendendo quatro frações. Este fato pode ser explicado devido à alta concentração protéica aplicada na coluna que pode provocar um alargamento no pico de eluição. Outro ponto a ser considerado é o fato que de a coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE Healthcare) utilizada neste experimento ter sido empacotada no laboratório e, portanto, apresentou uma resolução diferente da coluna Superdex 200 (HR 10/30, GE *Healthcare*) analítica pré-empacotada de fábrica.

Figura 3.3. 1- Análise da purificação de Thi1 e Thi1(A140V). (a) Perfil cromatográfico de Thi1 (azul) e Thi1(A140V) (verde) em coluna Superdex 200, a seta vermelha indica o pico correspondente as proteínas de interesse. (b) Padrão de migração de Thi1 e ou Thi1(A140V) em SDS-PAGE 15%. Coluna 1: fração 11; Coluna 2: fração 12; Coluna 3: fração 13; Coluna 4: fração 14. MM representa marcador de peso molecular e a seta indica a posição esperada para as proteínas de interesse.

3.4. Estudos de Oligomerização de Thi1 e Thi1(A140V)

A estrutura cristalográfica de Thi1, determinada por Godoi e colaboradores³⁸, bem como estudos da proteína em solução (cromatografia de exclusão molecular e espalhamento de luz) realizados por eles revelaram que a estrutura quaternária de Thi1 é composta por oito

subunidades monoméricas formando um octâmero de massa molecular de 244 kDa, com um raio hidrodinâmico (Rh) de 6,24 nm³⁸. Entretanto pouco se sabia sobre a proteína isolada do mutante de *A. thaliana*, auxotrófico para tiamina, que apresenta uma mutação pontual⁴⁰. A alanina 140 está localizada na superfície de um pequeno *loop*. Embora esta posição não esteja nas proximidades da região de interação do ligante de Thi1, ela está situada na interface entre quatro subunidades que formam cada um dos dois domínios que compõe o octâmero. Dessa forma suspeitava-se que um aumento de volume nesta região devido à mutação da alanina pela valina poderia interferir no processo de oligomerização da molécula. Com intuito de avaliar o estado de oligomerização de Thi1(A140V) foram realizados estudos comparativos entre Thi1 e Thi1(A140V) utilizando cromatografia de exclusão molecular, eletroforese em gel nativo e espectrometria de massas. O valor do raio hidrodinâmico (Rh), calculado para Thi1 anteriormente, foi utilizado como guia para a determinação dos estados oligoméricos de Thi1 truncada e Thi1(A140V).

Os experimentos de eletroforese em condição não desnaturante foram realizados de duas formas diferentes, uma utilizando o sistema comercial *Phast System* (GE Healthcare), onde a malha do gel é formada por gradiente crescente de poliacrilamida de 8 a 25%. O outro sistema empregado foi realizado em um gel em condições também não desnaturantes, mas com uma concentração de poliacrilamida fixa em 10 %. Em ambos os experimentos utilizou-se como padrão proteínas de massa molecular conhecida (*kit SDS-PAGE Molecular Weight Standards High Range*, GE Healthcare), listadas na tabela 5 (materiais e métodos).

Figura 3.4. 1– Eletroforese não desnaturante. (a) Análise em gel nativo com gradiente de poliacrilamida (8 – 25%), utilizando o sistema *Phast System* (GE Healthcare). MM – marcador de massas molecular; Coluna 1: Thi1; Coluna 2: Thi1(A140V). (b) Curva de calibração construída a partir de proteínas padrão com raio e massa molecular conhecidos, para o cálculo do raio hidrodinâmico de Thi1 e Thi1(A140V). (c) Análise em gel nativo com malha de poliacrilamida de 10 %. MM – marcador de peso molecular; Coluna 1: Thi1; Coluna 2: Thi1(A140V). (d) Curva de calibração construída a partir de proteínas padrão com raio e massa molecular conhecido, para o cálculo do raio hidrodinâmico de Thi1 e Thi1(A140V).

A análise do perfil migração de Thi1 e Thi1(A140V) mostrados na figura 3.4. 1, deixa claro que certamente a mutação de uma alanina para valina não interferiu na oligomerização de Thi1, pois independente da malha do gel utilizada, o padrão de migração das proteínas é o mesmo. Apesar de gel nativo não ser uma técnica que permita afirmar com exatidão o tamanho da molécula procurou-se exprimir de forma quantitativa as diferenças e semelhantes no perfil de cada proteína, calculando o raio hidrodinâmico de ambas. A partir dos raios hidrodinâmicos das proteínas padrões construiu-se um gráfico de $100\log(100.R_f)$ versus o raio hidrodinâmico de cada proteína padrão. A figura 3.4.1 (b) mostra o gráfico obtido com

gradiente de poliacrilamida (8 – 25 %). Neste, os valores obtidos foram muito similares: 4,67 nm para Thi1 e 4,72 nm para Thi1(A140V). Um comportamento semelhante foi obtido nos experimentos com uma porcentagem fixa de poliacrilamida em 10 %, como mostra a figura 3.4.1 (c). Pode-se observar que o padrão de migração das proteínas foi muito parecido entre si e também muito próximo ao padrão obtido para o gel com gradiente de poliacrilamida. O valor calculado para Thi1 foi de 4,74 nm e para Thi1(A140V) foi de 4,87 nm. É importante ressaltar que por mais que estes valores sejam discrepantes quando comparados com o valor calculado por Godoi e colaboradores, eles são válidos para uma comparação indireta do estado oligomérico entre Thi1 e Thi1A140. Além disso, temos que considerar também que o raio hidrodinâmico calculado anteriormente foi obtido a partir de outra metodologia (espalhamento de luz), e as proteínas utilizadas nestas análises são as formas truncadas. A diferença entre cada subunidade de Thi1 selvagem e suas formas truncadas é de 6,5 kDa (Thi1 antes digestão com papaína referenciada no trabalho de Godoi *et. al* ³⁸), o que leva a uma diminuição considerável no tamanho do octâmero.

A cromatografia de exclusão molecular também foi utilizada para avaliar o estado oligomérico de Thi1 e Thi1(A140V), por meio do cálculo de seus respectivos raio hidrodinâmico, ou Raio de Stokes, e massa molecular. Para a determinação da massa molecular aparente e conseqüente determinação do estado oligomérico de Thi1 e Thi1(A140V) bem como para a realização dos cálculos para encontrar o Raio de Stokes, utilizou-se proteínas que possuem massas moleculares e raio hidrodinâmico conhecidos, listadas na tabela 6 (materiais e métodos).

O peso molecular aparente de Thi1 e Thi1(A140V) foi obtido pela construção de uma curva de calibração usando o coeficiente de partição (K_{av}) pelo logaritmo do peso molecular de cada proteína padrão (tabela 4). A figura 3.4. 2 mostra o perfil de eluição de Thi1 e Thi1(A140V) e a curva de calibração. Os valores do peso molecular aparente foram de 191 kDa e 203 kDa, respectivamente para Thi1 e Thi1(A140V). Houve uma diferença substancial entre os valores calculados usando o perfil de migração de cada molécula e os valores teóricos esperados para cada oligômero. O peso molecular esperado para a forma octamérica de Thi1 e de Thi1(A140V) é de 238 kDa. A diferença entre os valores experimentais e teóricos ficaram entre 20 % para Thi1 e 15 % para Thi1(A140V). Esta diferença é aceitável e está dentro do erro esperado para a técnica utilizada, pois cromatografia de exclusão molecular é uma técnica de baixa resolução. Geralmente a cromatografia de exclusão molecular pode

apresentar uma diferença de 10 a 20 % no tamanho esperado, e dependendo da forma da proteína este valor pode atingir até 55 %⁵⁷. Já que o perfil de eluição de uma proteína pela matriz da coluna é dependente de seu volume hidrodinâmico, se a molécula for assimétrica seu volume de eluição poderá ser bem diferente de uma molécula que apresente a mesma massa, porém com uma forma diferente, uma proteína globular por exemplo.

Figura 3.4. 2– Determinação do estado oligomérico por cromatografia de exclusão molecular. (a) Perfil de eluição de Thi1 (azul) e Thi1(A140V) (verde), cromatografia de exclusão molecular realizado com coluna Superdex 200. (b) Curva de calibração utilizada para o cálculo do peso molecular aparente de Thi1 e Thi1(A140V), as proteínas padrão utilizadas estão identificadas no gráfico, assim como as proteínas Thi1 e Thi1(A140V) em suas respectivas posições devido ao seu perfil de eluição.

Outro parâmetro checado com intuito de comparar as propriedades hidrodinâmicas de Thi1 e Thi1(A140V) foi cálculo do Raio de Stokes, na figura 3.4. 3 é possível comparar o perfil de eluição de Thi1 e Thi1(A140V) com os raios hidrodinâmicos das proteínas padrão, é evidente que a fração correspondente a cada uma delas apresenta um pico simétrico e homogêneo indicando a presença de uma única espécie em cada amostra. A análise do perfil de eluição em conjunto com os valores calculados para os raios de cada molécula, para Thi1 igual a 4,97 nm e para Thi1(A140V) foi de 5,07 nm, permitem dizer que muito provavelmente as moléculas possuem o mesmo nível de organização quanto a sua estrutura quaternária. Estes resultados estão de pleno acordo com os resultados obtidos nos experimentos de eletroforese em condições não desnaturantes.

Figura 3.4. 3 – Determinação do Raio de Stokes de Thi1 e Thi1(A140V). (a) Cromatogramas superpostos mostrando os perfis de eluição de Thi1 (azul) e Thi1(A140V) (verde) da coluna de exclusão molecular Superdex 200. O segundo eixo Y indica os raios hidrodinâmicos das proteínas padrões utilizado para a calibração da coluna. (b) Curva de calibração da coluna utilizada para o cálculo do raio hidrodinâmico de Thi1 e Thi1(A140V).

A determinação do peso molecular aparente e do raio hidrodinâmico de Thi1 e Thi1(A140V) foram satisfatórios, pois possibilitaram o cálculo de valores de pesos moleculares relativamente próximos ao esperado para cada proteína. Além disso, a análise das propriedades hidrodinâmicas forneceu indícios de que ambas as proteínas apresentam o mesmo estado oligomérico, ou seja, a mutação pontual de uma alanina para uma valina não alterou ou interferiu o grau de oligomerização dessa molécula. Embora as técnicas utilizadas tenham revelado informações interessantes sobre os estados oligoméricos das proteínas, estas técnicas são consideradas de baixa resolução, pois são sensíveis à forma e propriedades físicas das proteínas. Neste sentido, para se obter uma confirmação da conformação octamérica, a espectrometria de massas foi empregada nos estudos de oligomerização de Thi1 e Thi1(A140V).

A espectrometria de massas apresenta um elevado padrão de exatidão e confiabilidade, fornecendo a massa exata da molécula através da razão massa carga. O ESI é um método de ionização relativamente suave que permite a ionização da amostra sem a necessidade de fragmentá-la (a não ser que esta seja induzida), possibilitando assim que complexos intactos formados por interações fracas sejam detectados ⁵⁸. A figura 3.4. 4 mostra os espectros de massas obtidos para Thi1 e Thi1(A140V) e os diferentes íons formados pela ionização das

moléculas podem ser visualizados nos espectros. Estes íons possibilitaram o cálculo da massa de cada oligômero com valor bem próximo ao esperado, sendo que os valores calculados estão listados na tabela 7. O valor médio da massa molecular de Thi1 e de Thi1(A140V) foi de 241,938 e 242,288, respectivamente. Estes valores diferiram apenas em 1,8 % do valor teórico esperado para forma octamérica de Thi1 e de Thi1(A140V). Assim é possível afirmar definitivamente que a mutação pontual não prejudicou ou interferiu diretamente na estrutura quaternária de Thi1(A140V), e esta se apresentou como um octâmero.

Figura 3.4. 4 – Espectros de massas ESI-MS de Thi1 e Thi1(A140V). (a) Espectro de massas de Thi1 representando os diferentes estados de ionização da molécula. (b) Espectro de massas de Thi1(A140V) representando os diferentes estados de ionização da molécula.

Tabela 7– Massas calculadas a partir dos espectros de ESI para Thi1 e Thi1(A140V)

Proteína	íon	Razão massa carga (m/z)	Massa Molecular
Thi1	35+	6915.4124	242004
	34+	7116.1280	241914
	33+	7332.4767	241938
	32+	7560.2827	241897
Thi1(A140V)	35+	6927.1904	242416
	34+	7129.5260	242369
	33+	7341.6769	242242
	32+	7570.3468	242219
	31+	7813.7365	242194

3.5 Caracterização biofísica de Thi1 e Thi1(A140V)

A espectroscopia aplicada à sistemas biológicos é uma valiosa ferramenta para o estudo e compreensão dos fenômenos biológicos. Dentro da vasta gama de espectroscopias é possível encontrar uma ou várias metodologias que possibilitem a análise de componentes individuais de um sistema biológico, tais como: proteínas, ácidos nucleicos e metabólitos. É possível ainda obter informações detalhadas sobre a estrutura da molécula e mesmo sobre seus mecanismos de ação ⁵⁹.

As técnicas espectroscópicas de alta resolução como RMN e difração de raio X são trabalhosas e podem requerer muito tempo para a determinação de uma estrutura protéica. Além disso, quanto maior ou mais flexível é a estrutura maior será o grau de complexidade exigido e mais tempo será gasto. Dessa forma, as técnicas de baixa resolução como absorção, fluorescência e dicroísmo circular são de grande valia para se obter informações estruturais e funcionais de proteínas ou outras biomoléculas. Conceitualmente, um experimento espectroscópico é extremamente simples. A radiação eletromagnética em um determinado comprimento de onda λ atinge a amostra e provoca uma perturbação, uma radiação que emerge da amostra pode ser medido por um detector. O fenômeno mais simples que ocorre

neste processo é a absorção e ou dissipação de parte da radiação incidente na amostra. Não somente a intensidade emergente, mas também a distribuição das frequências emergentes também podem ser fontes de informação. Em técnicas como CD e fluorescência polarizada, além da detecção da intensidade, há também o tipo e o grau de polarização da radiação emitida.

Na etapa de caracterização biofísica de Thi1 e de Thi1(A140V), as técnicas de CD e fluorescência foram essenciais para busca de indícios de uma possível alteração conformacional ou mesmo uma diminuição no grau de estabilidade protéica ocasionado pela mutação pontual.

3.5.1 Efeito da mutação pontual na estrutura secundária de Thi1

Cada região do espectro de CD reflete predominantemente a absorbância de um tipo particular de cromóforos fornecendo assim uma informação específica da composição da amostra. Em proteínas, os principais cromóforos responsáveis pela absorção na região ultravioleta distante (190-250 nm) são as ligações peptídicas, devido às transições eletrônicas fracas do tipo $n \rightarrow \pi^*$, centradas em 220 nm e transições fortes do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ próximo à 190 nm. A dependência da atividade ótica pela geometria da ligação peptídica é que fornece um espectro de CD característico para diferentes estruturas secundárias regulares presentes em peptídeos e proteínas⁶⁰⁻⁶¹.

Como os experimentos de cromatografia de exclusão molecular, eletroforese em condições não desnaturantes e espectrometria de massas revelou que tanto a Thi1 como seu mutante natural mantiveram a capacidade de oligomerização, o próximo passo foi avaliar se, apesar da forma octamérica, Thi1(A140V) apresentava um conteúdo de estrutura secundária diferente da proteína selvagem. Os experimentos de Far/UV CD mostraram que ambas as proteínas possuem um espectro muito similar, característico de estruturas com alto teor de α -hélice, apresentando dois mínimos bem evidentes próximo a 208 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e 220 nm ($n \rightarrow \pi^*$)⁶⁰, figura 3.5.1.

Figura 3.5. 1 – Espectros de CD de Thi1 e de Thi1(A140V). Os experimentos de CD foram realizados a 20°C em tampão Tris 20 mM pH 8 e NaCl 150 mM. A concentração protéica foi de 0,25 mg.mL⁻¹. O espectro em azul representa Thi1 e em verde Thi1(A140V).

As análises qualitativas dos espectros de CD realizadas fornecem indícios de que a mutação pontual não teve uma interferência maior no conteúdo de estrutura de Thi1. Entretanto, além destas análises qualitativas a utilização de alguns algoritmos (ContinII, CDSSTR ou SELCON), que permitem fazer uma análise mais quantitativa por meio da estimativa do conteúdo de estrutura secundária de cada proteína. Estes algoritmos são programados para fazer uma comparação entre os espectros obtidos experimentalmente e um banco de dados de espectros protéicos, composto por grupos distintos de proteínas globulares, de membrana ou proteínas com estruturas desordenadas⁶²⁻⁶³. Neste estudo comparativo entre Thi1 e Thi1(A140V), a avaliação do conteúdo de estrutura secundária por CD com estes algoritmos de predição foi de grande valia, já que a estrutura disponível da proteína selvagem fornece os valores exatos esperados do teor de α -hélice, sendo nove hélices compostas por 97 resíduos perfazendo um total de 34%, e folhas β , 13 folhas compostas por 67 resíduos somando 23 %.

A tabela 8 traz a percentagem do teor de estrutura secundária calculado para Thi1 e Thi1(A140V), utilizando os algoritmos ContinII, CDSSTR e SELCON. Nota-se que os valores na porcentagem de α -hélice e folhas β estivados pelos programas de deconvolução são

muito próximos aos valores disponibilizados pela estrutura cristalográfica de Thi1. Novamente estes resultados confirmam que em relação ao conteúdo de estrutura secundária não há qualquer diferença detectável por CD induzida pela mutação pontual de uma alanina por uma valina na posição 140 de Thi1.

Tabela 8— Estimativas de estrutura secundária para Thi1 e Thi1(A140V), pH 8,0.

Método	H (%)		β (%)		V (%)		D (%)	
	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)
ContínII	32,5	33,2	19,2	19,2	21,8	21,3	26,6	26,4
CDSSTR	33,9	33,5	19,5	20,4	19,2	18,7	27,1	27,5
Selcon 3	32,6	31,5	19,2	20,5	22,6	22,3	28,2	28,1
Média	33,0	32,7	19,3	20,0	21,2	20,7	27,3	27,3

(H) α -hélice; (β) folha β ; (V) volta; (D) desordenada.

3.5.2 Efeito da mutação pontual na estrutura terciária de Thi1

Thi1 é uma proteína rica em compostos aromáticos, cada monômero apresenta 8 resíduos de fenilalanina, 6 resíduos de tirosina e 2 resíduos de triptofano, figura 3.5.2. Além da presença destes aminoácidos aromáticos, sabe-se ainda que Thi1 é co-expressa com ligante ADT, que apresenta duas regiões formadas por anéis, uma porção pirimidina e a outra uma porção tiazólica. A presença destes resíduos aromáticos assim como o ligante ADT, foram utilizadas como sondas para avaliação da integridade da estrutura terciária de Thi1(A140V) por meio da utilização de técnicas espectroscópicas como CD no ultravioleta próximo e emissão de fluorescência.

Figura 3.5. 2 – Estrutura cristalográfica do monômero de Thi1. O ligante ADT, assim como os aminoácidos aromáticos estão em destaque na estrutura representados em diferentes cores com a cadeia laterais em evidência. Os resíduos de triptofano estão representados em vermelho, os de tirosina em ciano, os resíduos de fenilalanina em laranja, o zinco pela esfera cinza e o ADT em verde. A posição do resíduo de alanina que sofre a mutação em Thi1(A140V) está destacado em azul escuro.

Medidas de Near/UV CD (250 – 350 nm) podem relevar importantes informações sobre a estrutura terciária de proteínas. Os principais cromóforos responsáveis pelo sinal de Near/UV CD são os aminoácidos aromáticos, cofatores e ainda ligações dissulfeto quando presentes. A contribuição da fenilalanina nesta região pode ocorrer entre 255 – 270 nm, com picos freqüentemente observados próximos a 262 e 268 nm; a tirosina apresenta um máximo 275 – 282 nm, com um ombro de aproximadamente 6 nm deslocado para o vermelho; e por fim o triptofano com máximos em duas regiões distintas, entre 280 e 293 nm e próximo a 265 nm. As cadeias laterais dos resíduos aromáticos são particularmente sensíveis aos ambientes assimétricos, característicos da estrutura tridimensional de proteínas. Diversos fatores podem influenciar a forma e a intensidade do sinal, como o número e as posições de cada tipo dos

resíduos de aminoácidos aromáticos, sua mobilidade e a natureza do ambiente quanto às ligações de hidrogênio e a polarização⁶⁴⁻⁶⁶.

Ao contrário dos experimentos realizados na região do ultravioleta distante, os espectros de Near/UV CD de Thi1 e Thi1(A140V), apresentados na figura 3.5.3, revelaram diferenças marcantes tanto na intensidade das bandas na região dos aminoácidos aromáticos, assim como a presença de um pico largo no espectro de Thi1 na região de 293 a 304 nm, praticamente suprimido no espectro de Thi1(A140V). As bandas características dos resíduos de tirosina e triptofano aparecem nos espectros de Thi1 e Thi1(A140V) com máximos em posições usualmente atribuídos a estes cromóforos, para Thi1 em 278 e 286 nm e para Thi1(A140V) em 279 e 286 nm, diferindo apenas na intensidade do sinal. Estas mudanças observadas no espectro de Near/UV CD de Thi1(A140V) em comparação com o espectro de Thi1, podem indicar modificações sutis no microambiente dos resíduos aromáticos ou ainda pode ser resultado de uma perturbação na estrutura tridimensional ou mesmo na estrutura quaternária da proteína causado pela mutação.

Outro fator que deve ser levado em consideração na análise dos espectros de Near/UV CD é a presença da molécula ADT na estrutura de Thi1 e de Thi1(A140V). Uma análise da estrutura química desta molécula releva que além da presença de compostos aromáticos, o ADT também possui quatro carbonos quirais. Dessa forma, muito provavelmente a composição química do ADT permite que este ligante atue como um cromóforo intrínseco contribuindo para o espectro de Thi1 e ou de Thi1(A140V), nas regiões de 250 – 270 nm e 293 – 304 nm. Apesar da certeza da contribuição do ADT para o espectro de CD, é difícil fazer uma análise direta e objetiva que permita sugerir que esta molécula esteja ou não presente na proteína mutada, ou mesmo que a mutação tenha induzido a síntese de um composto similar ou diferente do ADT.

Figura 3.5. 3 – Espectro de Near/UV CD de Thi1 e Thi1(A140V). Os experimentos de Near/UV CD foram realizados a 20°C em tampão tris 20 mM pH 8 e NaCl 150 mM. A concentração protéica foi de 3,5 mg.mL⁻¹. Em azul está representado o espectro de Thi1 e em verde o sinal correspondente a Thi1(A140V).

Thi1 apresenta todos os principais fluoróforos presentes em sua estrutura primária (fenilalanina, tirosina e triptofano). Apesar de Thi1 apresentar vários resíduos de fenilalanina e tirosina, o fluoróforo dominante é o triptofano, pois como as distâncias entre os resíduos aromáticos no octâmero de Thi1 são muito pequenas, da ordem de 14 Å, isto favorece a ocorrência do fenômeno de transferência de energia interna para os resíduos de triptofanos. Além deste fato, ainda é possível eliminar a contribuição da fenilalanina e da tirosina fazendo uma foto-seleção por meio da excitação do triptofano em 295 nm, comprimento de onda maior do que o comprimento de onda de excitação dos demais resíduos aromático⁴⁹. Dessa forma os resíduos de triptofanos presentes em Thi1 e Thi1(A140V) podem ser considerados sondas intrínsecas sítio-específicas na estrutura protéica, já que os dois triptofanos estão localizados em regiões estruturais importantes. O W80 está localizado em uma região altamente desordenada no núcleo hidrofóbico de Thi1, nas proximidades do sítio de interação com o ligante ADT. Já o outro resíduo de triptofano, W160, está localizado exatamente entre a interface de dimerização de Thi1.

Confirmando os resultados obtidos com Near/UV CD, os espectros de emissão de fluorescência intrínseca, figura 3.5.4, mostraram uma diferença entre Thi1 e Thi1(A140V). A diferença mais acentuada verificada entre os espectros foi a intensidade de emissão da fluorescência, que pode ser atribuída principalmente a uma alteração no ambiente químico dos resíduos de triptofanos, já que as informações estruturais obtidas pela fluorescência do triptofano estão limitadas ao grau de exposição deste fluoróforo ao solvente e também a sua mobilidade local. Como em Thi1, em Thi1(A140V) um dos resíduos está localizado próximo ao núcleo hidrofóbico e o outro na interface de dimerização que apresenta alguns resíduos hidrofóbicos. Assim, pode-se inferir que a mutação certamente induziu alguma alteração estrutural no *loop* no qual ocorre (uma região altamente empacotada entre quatro subunidades do octâmero), aumentando a acessibilidade do solvente e acarretando a supressão da emissão do triptofano, com um leve deslocamento no máximo de emissão, de 331 para 334 nm.

Figura 3.5. 4 – Espectros de emissão de fluorescência de Thi1 e Thi1(A140V). Espectro em azul refere-se a Thi1 e em verde a Thi1(A140V). O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico, com as soluções protéicas numa concentração de 0,1 mg.mL⁻¹, em tampão Tris 20 mM pH 8 contendo NaCl 150 mM.

Apesar dos experimentos de fluorescência terem mostrado uma diferença na intensidade, o pequeno deslocamento no máximo de emissão não permitiu afirmar com exatidão se realmente houve uma alteração maior no microambiente dos fluoróforos. Assim para uma avaliação mais exata desta diferença na acessibilidade ao solvente, realizou-se experimentos de supressão de fluorescência. O princípio básico da supressão de fluorescência está no fato que as macromoléculas se movimentam constantemente, este movimento pode ser rotacional (em torno de um eixo preciso) ou mesmo apresentar uma flexibilidade local, movimentos internos. Estes movimentos internos permitem que diferentes moléculas, como as moléculas de solvente, se difundam pelo interior da macromolécula, esta difusão ao longo da macromolécula é dependente da dinâmica interna da mesma e é definida como acessibilidade ao solvente ⁶⁷.

Esta acessibilidade do solvente ao interior das moléculas é uma metodologia muito empregada no estudo de supressão da fluorescência em proteínas. A supressão da fluorescência permite a análise da acessibilidade de moléculas pequenas aos resíduos de triptofanos presentes na estrutura protéica, fornecendo assim informações sobre seu microambiente estrutural. Esta técnica envolve a quantificação da diminuição da intensidade de emissão em relação ao aumento da concentração de agente supressor. Há vários tipos de agentes supressores e dependendo da natureza e da especificidade da interação entre o fluoróforo e o agente supressor este processo também pode ocorrer de diversas formas, tais como colisões entre moléculas, formação de complexos, transferência de energia e outros ⁶⁸. A supressão colisional é definida pela relação:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (9)$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença do agente supressor, respectivamente, k_q a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida na ausência do supressor. A relação $k_q \tau_0$ é definida como K_{SV} , constante de Stern-Volmer ⁴⁹.

Acrilamida é uma molécula polar não carregada, que pode se difundir pelo *core* protéico e suprimir a emissão dos resíduos de triptofanos. O agente supressor deverá estar apto a colidir com o triptofano seja no interior ou na sua superfície da proteína. Entretanto,

nem sempre os resíduos de triptofano estão acessíveis as moléculas de acrilamida, principalmente se eles tiverem enterrados no *core* hidrofóbico. Para um resíduo de triptofano totalmente exposto ao solvente a acrilamida apresenta um alto valor de K_{SV} , da ordem de 25 M^{-1} ^{49; 69}.

A figura 3.5.5 mostra os resultados obtidos nos experimentos de supressão da fluorescência para Thi1 e Thi1(A140V), utilizando acrilamida. As constantes de supressão (K_{SV}), constantes estas que estão relacionadas ao grau de exposição e ou acessibilidade aos resíduos de triptofano, foram calculadas a partir dos gráficos de Stern-Volmer, figura 3.5.5 utilizando a equação 9. Os gráficos de Thi1 e Thi1(A140V) apresentaram uma certa linearidade indicando que certamente há uma única classe de fluoróforos igualmente acessíveis ao solvente em cada caso. Os valores de K_{SV} calculados para Thi1 e para Thi1(A140V) foram $1,52 \pm 0,08$ e $2,32 \pm 0,16 \text{ M}^{-1}$ respectivamente. Estes resultados confirmam os dados qualitativos observados nos experimentos de emissão de fluorescência mostrados na figura 3.5.4, indicando que realmente há uma maior acessibilidade do solvente ao microambiente dos fluoróforos na proteína mutada do que na proteína selvagem.

Tanto nos experimentos de emissão de fluorescência como nos experimentos de supressão de fluorescência apesar da diferença observada entre Thi1 e Thi1(A140V), é importante ressaltar que para avaliar e fazer uma distinção entre a contribuição dos resíduos de triptofanos há necessidade de realizar experimentos de fluorescência resolvida no tempo que permitirá a obtenção da constante de supressão bimolecular (k_q) de cada fluoróforo.

Figura 3.5. 5 – Gráfico de Stern-Volmer de supressão de acrilamida para Thi1 e Thi1(A140V). O gráfico de Thi1 está destacado em azul e o de Thi1(A140V) em verde. Os pontos apresentados estão com suas respectivas barras de erros. F_0 é a fluorescência na ausência de acrilamida, F é a fluorescência corrigida na presença do supressor. A concentração protéica das amostras foi de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em tampão Tris 20 mM pH 8 e NaCl 150 mM. As medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico e o comprimento de onda de excitação de 295 nm.

3.5.3 O efeito do pH na estabilidade de Thi1

Para uma proteína ser e permanecer estável em uma determinada conformação, ela depende da contribuição de várias interações polares e apolares. Algumas mudanças conformacionais podem ser induzidas pela alteração das propriedades físico-químicas do ambiente protéico, tais como temperatura, força iônica e variações no pH do meio ⁷⁰. Mudanças locais nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e também na cadeia principal induzidas pela alteração em algumas destas propriedades físico-químicas podem provocar rupturas ou mesmo um rearranjo das interações responsáveis pela manutenção da estrutura protéica. Neste sentido, uma análise comparativa das propriedades físico-químicas de Thi1 e Thi1(A140V), foi realizada por CD e fluorescência.

Em proteínas, a estabilidade dos elementos de estrutura secundária depende de diversos fatores, por exemplo, a estabilidade de uma α -hélice é determinada pelo número e pela força das ligações de hidrogênio no interior da hélice, pelas interações entre as cadeias

laterais ionizadas e pelas interações com outros elementos de estrutura secundária da proteína⁷¹⁷³. Portanto, uma alteração no valor de pH de uma solução tamponante pode afetar interações entre cadeias laterais carregadas induzindo uma alteração conformacional na estrutura secundária, terciária e quaternária⁷⁴. Os resultados obtidos por Far/UV CD apresentados na figura 3.5.6 e na tabela 7 revelaram que o comportamento de Thi1 e Thi1(A140V) frente a diferentes valores de pHs foram muito similares, não havendo alterações significativas no conteúdo de estrutura secundária quando comparados entre si, tanto em ambientes extremamente ácidos ou básicos. Ou seja, as mudanças conformacionais observadas tanto para Thi1 como para Thi1(A140V) apresentaram o mesmo padrão. Em pHs 4 e 4,5 ocorreu a precipitação protéica, já em pHs mais ácidos (2 e 3) ambas tiveram perda dos mínimos em 208 e 220 característicos de α -hélice e o surgimento de um mínimo em aproximadamente 216 nm característico de elementos de estrutura secundária do tipo β , fato este confirmado pela desconvolução, tabela 9, o que pode ser um indício de formação de agregados solúveis rico em elementos de estrutura secundária do tipo β ⁷⁵⁻⁷⁷. Entre os pHs 7,5 e 10,0 houve uma predominância do teor de α -hélices, entretanto em pH mais alcalinos (11,0 e 11,5) além da diminuição no valor da elipticidade em 220 nm houve um deslocamento da banda negativa de 208 nm para 204 nm, indicando uma provável contribuição de desnaturação protéica.

Figura 3.5. 6 – O efeito do pH sobre a estrutura secundária de Thi1. A concentração protéica utilizada foi de 0,25 mg.mL⁻¹, e o efeito de pH sobre a estrutura secundária foi avaliado utilizando tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm a 25°C. Em (a) e (b) estão representados os espectros de Far/UV CD para Thi1 e Thi1(A140V), respectivamente. Cada espectro em um determinado valor de pH está indicado em diferentes cores de acordo com a legenda interna. Em (c) e (d) estão representados a variação nos valores de elipticidade em 208 nm (c) e em 220 nm (d) para diferentes pHs, nestes gráficos os valores de elipticidade de Thi1 estão destacados em azul e Thi1(A140V) em verde, as linhas entre os pontos servem apenas para guiar os olhos do leitor .

Tabela 9 – Estimativa de estrutura secundária para Thi1 e Thi1(A140V) em diferentes pHs

Método	H (%)		β (%)		V (%)		D (%)	
pH 2,0	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)
ContinII	7,6	8,5	36,4	36,4	22,5	22,4	33,5	32,6
CDSSTR	5,2	6,5	37,6	36,8	23,6	23,2	32,5	32,3
Selcon 3	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	6,4	7,5	37,0	36,6	23,0	22,8	33,0	32,4
pH 5,5	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)
ContinII	22,5	23,3	27,4	25,6	21,9	21,5	28,2	29,8
CDSSTR	21,1	21,6	27,0	26,3	21,8	21,6	29,5	30,0
Selcon 3	21,8	24,6	28,4	21,7	20,8	21,1	25,8	28,3
Média	22,8	23,2	27,6	24,5	21,5	21,4	27,8	29,4
pH 7,5	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)
ContinII	26,9	27,1	24,0	23,1	22,0	21,4	27,1	28,5
CDSSTR	25,1	25,0	24,8	23,7	21,0	20,7	28,5	30,2
Selcon 3	25,6	26,0	23,1	22,4	21,9	21,7	27,9	28,6
Média	25,9	26,0	23,9	23,1	21,6	21,3	27,8	29,1
pH 11,0	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)
ContinII	15,8	19,3	28,8	27,5	22,2	21,4	33,2	31,9
CDSSTR	8,8	18,0	35,4	29,0	23,2	21,4	32,5	31,3
Selcon 3	15,0	17,2	29,8	28,5	21,4	20,3	31,2	24,1
Média	13,2	18,2	31,3	28,3	22,3	21,0	31,2	29,1
pH 11,5	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)	Thi1	Thi1(A140V)
ContinII	11,7	13,9	31,5	29,4	23,0	22,6	33,7	33,9
CDSSTR	7,8	7,4	33,5	34,8	22,5	22,4	34,9	35,3
Selcon 3	14,7	11,3	30,9	31,6	18,2	23,0	37,2	34,6
Média	11,4	10,9	31,9	31,9	21,2	22,7	35,3	34,6

(H) α -hélice; (β) folha β ; (V) volta; (D) desordenada.

O desenovelamento de proteínas induzido por pH ocorre pela protonação ou desprotonação de alguns grupos específicos (-OH, -COOH e NH₂). Dessa maneira diferentemente de experimentos de desenovelamento induzido por temperatura ou agentes

caotrópico, o desenovelamento de proteínas induzido por pH ocorre por meio da perturbação de apenas alguns resíduos e, conseqüentemente, nem sempre é possível obter o desenovelamento protéico completo⁷⁸.

O estudo da fluorescência intrínseca do triptofano pode trazer informações importantes sobre os efeitos da mutação pontual sobre a conformação e integridade da estrutura terciária de Thi1. Como Thi1 possui dois triptofanos por subunidade, o estudo da influência do pH na emissão de fluorescência de Thi1 e Thi1(A140V) poderia revelar possíveis diferenças no microambiente do triptofano e conseqüentemente na estrutura do octâmero como um todo. As figuras 3.5.7 (a) e (b) mostram as medidas de variação de pH monitoradas pela emissão do triptofano, sob excitação em 295 nm. A emissão de fluorescência em diferentes pHs revelou que houve um deslocamento sutil quanto ao máximo de emissão, já que a maior variação tanto para Thi1 como para Thi1(A140V) foi de 5 nm para o azul em um ambiente extremamente básico (pH 11,5).

Apesar do deslocamento do máximo de emissão não ter sido tão pronunciado é possível notar nas figuras 3.5.7 (a) e (b) que houve um alargamento dos espectros nos extremos de pH. Dessa forma, para uma análise mais exata dos dados, empregou-se o cálculo do centro de massa espectral, figura 3.5.7 (c). Sabe-se que a polaridade da vizinhança dos resíduos de triptofanos pode afetar as propriedades espectrais de sua emissão⁷⁹⁻⁸⁰. Estas propriedades espectrais podem ser desde variação no comprimento de onda de emissão até a supressão no máximo de emissão, assim o cálculo do centro de massa (CM) permite um estudo mais detalhado sobre ambos^{48; 81}.

Na figura 3.5.7 é nítido que houve um aumento no valor de CM nos extremos de pHs, sendo um forte indicativo de perda das interações que mantêm a estrutura terciária de Thi1 e Thi1(A140V), posto que os ambientes próximos aos fluoróforos se tornaram mais acessíveis ao meio. A redução na emissão de fluorescência em valores de pH baixo ou alto não pode ser explicado simplesmente em termos de desnaturação parcial de uma proteína em um ambiente básico ou alcalino. Uma redução na intensidade de fluorescência e conseqüente aumento no CM de Thi1 e Thi1(A140V) para aproximadamente 350 nm em extremos de pH pode ter sido causado pela exposição do microambiente dos triptofanos ocorrendo a supressão da fluorescência pelo íon hidrogênio (supressão ácida) e neutralização dos grupos COO⁻ dos resíduos de aminoácidos ácidos nos arredores do triptofano⁷¹. Outro fato interessante notado na análise dos gráficos de CM, é que a medida que o pH aumenta Thi1(A140V) tende a

perder seus contatos terciários mais rapidamente que Thi1, o que sugere que o desenovelamento de Thi1(A140V) ocorra mais rapidamente em pH básico.

Figura 3.5. 7 – Influencia do pH sob estrutura terciária de Thi1 e Thi1(A140V), monitorado por emissão de fluorescência estática. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm, as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico e concentração de 0,1 mg.mL⁻¹, em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH. (a) e (b) representam os espectros de emissão de fluorescência para Thi1 e Thi1(A140V), respectivamente. (c) Centro de massa espectral (CM) em função do pH, para Thi1 (azul) e Thi1(A140V) (verde).

Fazendo uma sobreposição entre os valores de elipticidade em 220 nm e os valores de CM calculados (figura 3.5.8), nota-se que há uma concordância entre as mudanças que

ocorrem no conteúdo de estrutura secundária e as perdas dos contatos terciários tanto para Thi1 como para Thi1(A140V) a medida que o pH aumenta ou diminui. Muitas proteínas são estáveis em pH fisiológico e normalmente apresentam um determinado grau de desnaturação em meio ácido ou básico. Um fato interessante é que para algumas destas proteínas a medida que o valor do pH é reduzido elas podem adquirir conformações relativamente mais compactas (*molten globules*), enquanto outras podem formar complexos moleculares muito maiores como agregados protéicos, sendo que ambos podem apresentar um alto teor de estrutura secundária e até mesmo um certo grau de contatos terciários^{72; 82-84}, fato observado tanto em Thi1 como em Thi1A140V, aparentemente a polaridade do meio pode induzir a formação complexo moleculares maiores que apresenta elementos de estrutura secundária assim como contatos terciários.

Figura 3.5. 8 – Comparação da influência do pH na estrutura secundária ($[\theta]_{220}$) e terciária (CM) de Thi1. (a) e (b) Sobreposição da variação do mínimo em 220 nm com o centro de massa espectral (CM) calculado a partir dos espectros de emissão de fluorescência do triptofano em função da variação de pH, nas condições experimentais já citadas anteriormente. (a) Thi1, em preto variação no CM e em azul variação em θ_{220} . (b) Thi1(A140V), em preto variação no CM e em verde variação em θ_{220}

Medidas na anisotropia dos resíduos de triptofanos podem ser utilizadas para estabelecer o estado polimérico de proteínas, devido à dependência da anisotropia de fluorescência em relação à movimentação dos fluoróforos. Eventos que possam alterar o tempo de correlação rotacional poderão alterar a anisotropia da amostra. Em biomoléculas a anisotropia pode diminuir ou aumentar devido à difusão rotacional e a flexibilidade interna.

Estes efeitos têm sido explorados em estudos de desnaturação protéica, nos quais normalmente há um aumento na flexibilidade da cadeia polipeptídica, ou mesmo na associação com outras macromoléculas, o que pode alterar a velocidade de rotação dos sistemas. Assim, a anisotropia de fluorescência pode fornecer informações sobre tamanho e forma de proteínas e até mesmo a rigidez de vários microambientes moleculares^{49; 85}.

Para verificar se Thi1 e Thi1(A140V) apresentavam estrutura quaternária nos extremos de pH, semelhante a estrutura apresentada na faixa de pH de 5 a 9, foram realizadas medidas de anisotropia estática. Muitas proteínas globulares, se não todas, enoveladas em condições não desnaturantes podem ser convertidas em agregados solúveis pela desestabilização parcial de sua conformação, e isso, por de ser induzido por uma alteração no ambiente protéico tal como uma alteração no valor do pH⁸⁶⁻⁸⁷. A figura 3.5.9 traz os valores anisotrópicos obtidos em função da variação do pH. Nota-se que em ambientes ácidos há um aumento substancial no valor anisotrópico para ambas proteínas, indicando a presença de moléculas muito maiores. Este resultado pode ser explicado pelas interações eletrostáticas entre os resíduos carregados na superfície protéica, que desempenham um importante papel no sentido de conferir estabilidade para a estrutura enovelada. Com a diminuição dos valores de pH as proteínas ficam altamente carregadas, em função dos valores de pKa para dos grupos carboxílicos serem inferiores a 3⁸⁸. A predição da carga para o monômero de Thi1 e de Thi1(A140V) mostrado na figura 3.5.9 foi realizada através do programa *Protein Calculator* (<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>), confirmando que em pHs ácidos a proteína tem uma alta carga positiva. Assim uma alteração no valor de pH altera o estado de ionização destes resíduos, provocando repulsão de cargas intramoleculares e possíveis quebras de pontes salinas, fato este que desestabilizará a conformação nativa promovendo o desenovelamento protéico e ou favorecendo interações intermoleculares (agregação protéica)^{71; 83}. Contrariamente ao que foi observado em pHs ácidos, em ambientes extremos básicos, Thi1 e Thi1(A140V) apresentam uma organização estrutural próxima a apresentada em pH 6,5, sugerindo a presença de complexos moleculares de tamanhos semelhantes, indicando um desenovelamento parcial das proteínas, o que pode ter ocorrido em função de mudanças nas ligações covalentes, fenômeno que normalmente ocorre para altos valores de pH⁸⁹.

Figura 3.5. 9 – Anisotropia em função do pH para Thi1 e Thi1(A140V) e previsão da carga para cada monômero em diferentes pHs. (a) Valores de anisotropia em função da variação de pH. A concentração protéica utilizada foi de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ em tampão acetato-borato-fosfato 20 mM. As medidas foram realizadas a 25°C , em cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. Cada valor anisotrópico é a representação da média de 10 varreduras consecutivas. (b) Previsão da carga total para cada monômero de Thi1 e Thi1(A140V), deve-se ressaltar que a previsão de carga realizada a partir da sequência primária de aminoácidos assume que todos os resíduos apresentam valores de pKa equivalentes para os resíduos isolados.

3.5.4 Efeito da mutação pontual nas propriedades termodinâmicas de Thi1 frente a agente desnaturante e temperatura

A estabilidade termodinâmica de proteínas é um processo complexo que está diretamente relacionado com as condições de seu microambiente. O problema central é levar em consideração, de forma quantitativa, pequenas diferenças na energia livre entre um conjunto relativamente pequeno de conformações enoveladas e um grande grupo que são desenovelados rapidamente. Qualitativamente, a entropia conformacional e a hidratação de um estado desenovelado são balanceadas por interações específicas que estabilizam a molécula no estado enovelado. As principais forças físicas por trás deste balanço energético são o efeito hidrofóbico, forças de van der Waals, interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes⁹⁰. Entretanto, pouco se sabe sobre a contribuição individual dos aminoácidos para a estabilidade, assim como para a função de uma proteína específica. Desde que cada aminoácido influencia a energia livre de ambos estados enovelado e desenovelado, um estudo termodinâmico do processo de desenovelamento protéico é fundamental para entender um pouco mais sobre a estabilidade protéica.

Como foi dito, a estabilidade protéica é dependente das condições do ambiente e mesmo em condições altamente favoráveis, o estado enovelado é estabilizado por apenas 5 à 15 kcal/mole. Esta estreita faixa de energia livre responsável pela estabilização protéica é independente do tamanho da molécula ⁹¹. Embora a caracterização de estabilidade difira de sistema para sistema, uma substituição de um único resíduo pode ser capaz de alterar a estabilidade, devido à mudanças na carga, tamanho, polaridade, hidrofobicidade ou mesmo na capacidade de realizar ligações de hidrogênio. Isto indica que diferentes tipos de interações não covalentes, incluindo ligações de hidrogênio, contatos de van der Waals, contatos hidrofóbicos e interações iônicas podem ter contribuições equivalentes para a manutenção da estabilidade protéica ⁹⁰.

Estudos de desenovelamento térmico ou químico geralmente são realizados para determinar a estabilidade termodinâmica de proteínas (definida como a diferença na energia livre de Gibbs entre os estados enovelados e desenovelados ($\Delta G = G_d - G_e$). Durante os experimentos de desenovelamento térmico, a solução protéica é aquecida a uma velocidade constante e as alterações conformacionais podem ser monitoradas por espectroscopia ou calorimetria, neste caso CD e fluorescência. Normalmente, dos espectros resultantes pode-se extrair os parâmetros termodinâmicos tais como temperatura de transição (T_m), entalpia ($\Delta H(T_m)$), e a capacidade calorífica (ΔC_p), utilizados para determinação da estabilidade protéica ($\Delta G(T)$) ⁹¹⁻⁹². O fator determinante para o cálculo destes parâmetros é que a reação de desenovelamento seja uma transição termodinamicamente reversível, proposição válida também para estudos de desenovelamento químico.

Freqüentemente, reações de desenovelamento térmico são irreversíveis, devido à agregação da cadeia polipeptídica desenovelada. Além disso, é comum em muitas proteínas sob aquecimento o surgimento de conformações mal enoveladas que levam a formação de agregados fibrilares ricos em folhas β ^{75-76; 93}. Se a agregação ocorre após a transição de desenovelamento, esta reação necessariamente não exclui uma análise do equilíbrio termodinâmico de desenovelamento. Mas se o processo de agregação e desenovelamento ocorrerem concomitantemente, a transição naturalmente será irreversível e não poderá ser analisada por um equilíbrio termodinâmico ⁷⁵.

Sabe-se que mutações podem conferir estabilidade para uma proteína ou torná-las mais instáveis, ou ainda alterar suas funções bioquímicas. Entretanto, muitos trabalhos têm

mostrado que normalmente um mutante pontual mantém suas funções nativas, já que a maioria preserva a conformação da proteína nativa, um dos fatores essenciais para a manutenção de sua função. Assim, as mutações que podem ser viáveis devem ser termodinamicamente estáveis, ou seja, devem apresentar uma estabilidade mínima para a manutenção do enovelamento correto⁹⁴. Neste sentido, para investigar e comparar a estabilidade de Thi1 com seu mutante natural, foram realizados experimentos de desenovelamento térmico e químico (utilizando concentrações crescentes de guanidina). As mudanças conformacionais foram monitoradas pelo: sinal de CD em 220 nm, centro de massa espectral e comprimento de onda máximo, sendo esses dois últimos obtidos a partir dos espectros de emissão dos resíduos triptofanos de Thi1 e ou Thi1(A140V).

A figura 3.5.10 mostra os resultados de desnaturação induzidos pelo aumento da concentração de agente caotrópico. Pela análise dos espectros de CD, é possível observar que as proteínas são extremamente frágeis ao desnaturante químico, pois a partir de 0,1 M de cloreto de guanidina há uma diminuição no valor da elipticidade em 220 nm. Comparando os espectros de Thi1 (figura 3.5.10 (a)) e Thi1(A140V) (figura 3.5.10 (b)) para cada concentração é nítida a diferença entre eles, nota-se que Thi1 é relativamente mais resistente que Thi1(A140V), o que foi confirmado pela construção da curva de desenovelamento, fração de proteína desnaturada (f_D) em função do aumento da concentração de guanidina, figura 3.5.10 (c). Com intuito de calcular os parâmetros termodinâmicos a reversibilidade da reação foi testada através da remoção da guanidina por meio de diálise das amostras extensivamente, entretanto nenhuma das proteínas foi capaz de recuperar qualquer estrutura. Apesar da irreversibilidade da reação, uma análise indireta da estabilidade de Thi1 e Thi1(A140V) foi feita por meio de um ajuste sigmoidal da curvas de desnaturação (figura 3.5.10 (c)), que permitiu a obtenção dos valores de concentração de guanidina em que metade das proteínas se encontravam desenoveladas ($[guanidina]_{50}$). Estes valores foram de $0,42 \pm 0,01$ M para Thi1 e $0,24 \pm 0,05$ para Thi1(A140V), o que é um indicativo de que a estrutura secundária de Thi1(A140V) é muito mais sensível ao agente caotrópico e, por conseguinte possui sua estabilidade conformacional afetada pela mutação pontual.

Figura 3.5. 10 – Desenovelamento químico de Thi1 e Thi1(A140V) monitorado por Far/UV CD. A concentração protéica utilizada foi de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, e o efeito do agente desnaturante sobre a estrutura secundária foi avaliado mediante o aumento da concentração do agente desnaturante (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 0,9 e 1,0 M de cloreto de guanidina). As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm a 25°C . Em (a) e (b) estão representados os espectros de Far/UV CD para Thi1 e Thi1(A140V), respectivamente. Os espectros estão representados em diferentes cores de acordo com a legenda interna, indicando a concentração de guanidina. Em (c) estão representadas as variações nos valores de elipticidade em 220 nm, expressa em termos de fração de proteína desenovelada (f_D) em função da concentração de agente desnaturante. A curva referente a Thi1 está destacada em azul e a referente a Thi1(A140V) em verde.

Experimentos de desenovelamento químico monitorando a emissão de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano frente ao aumento de concentração de guanidina foram realizados, com intuito de avaliar se haveria alguma perturbação causada pela mutação pontual na estrutura terciária de Thi1. Os resultados mostrados na figura 3.5.11 (a) e (b) revelaram que muito provavelmente o processo de desenovelamento induzido por agente caotrópico, além de irreversível, deve apresentar vários intermediários de desenovelamento, já que a não

há uma relação direta entre as mudanças conformacionais na estrutura secundária com os contatos terciários de Thi1 e Thi1(A140V).

Figura 3.5.11 – Desenovelamento químico monitorado por fluorescência intrínseca. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm, as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico, e concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. As alterações conformacionais nos contatos terciários foram avaliadas mediante o aumento da concentração do agente desnaturante (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,8, 0,9 e 1,0 M de guanidina). Em (a) estão representados os espectros de emissão frente à variação de concentração de guanidina, cada cor do espectro corresponde a uma concentração de guanidina conforme indicado na legenda interna. Em (b) está representado o centro de massa espectral (CM) em função de guanidina, para Thi1 (azul) e Thi1(A140V) (verde). (c) e (d) representam os espectros de emissão de fluorescência para Thi1 e Thi1(A140V), respectivamente. Os espectros foram normalizados, as setas indicam o deslocamento dos máximos de emissão.

A figura 3.5.11 (b) também deixa claro que durante o processo de desenovelamento químico, Thi1 e Thi1(A140V) têm os seus contatos terciários igualmente afetados, fato este

confirmado pela análise dos deslocamentos do máximo de emissão frente ao aumento de concentração de guanidina, destacados na figura 3.5.11 (c) e (d). Onde novamente a estrutura terciária parece ser igualmente afetada, toda a população dos resíduos de triptofanos igualmente exposta em 2M de agente desnaturante. Este resultado indica que tanto Thi1 como Thi1(A140V) estão desenoveladas, com a cadeia polipeptídica menos compacta, altamente solvatada e muito mais flexível ⁹⁵.

A estabilidade de Thi1 e Thi1(A140V) também foi avaliada por variação da temperatura e monitorada CD, figura 3.5.12. Como discutido anteriormente Thi1 e Thi1(A140V) possuem um espectro característico de proteínas com alto conteúdo de α -hélice, analisando os espectros de CD ao longo da rampa de aquecimento nota-se que os conteúdos de estrutura secundária começam a sofrer uma perturbação a partir de 54 °C, fato comum para as duas proteínas, figura 3.5.12 (a) e (b). A partir de 60 °C o perfil da curva de desnaturação térmica de Thi1 e Thi1(A140V), construída em termos de fração de proteína desnaturada calculada pela diminuição no valor de elipticidade em 220 nm, começa a diferir indicando que Thi1(A140V) é mais suscetível ao aumento de temperatura. Ao término de cada experimento de desnaturação térmica, como não houve precipitação protéica as amostras de Thi1 e Thi1(A140V) foram resfriadas a 20 °C e seu conteúdo de estrutura secundária foi avaliado por CD. Como já era esperado, a reação de desnaturação para ambas trata-se de um processo irreversível, já que tanto Thi1 e como seu mutante são moléculas octaméricas. Normalmente, para proteínas grandes ou que apresentam multidomínios ou oligômeros, é comum a ocorrência de agregados protéicos como uma reação secundária que compete com a reação de enovelamento. Assim, como consequência da irreversibilidade da reação, a determinação dos parâmetros termodinâmicos de desnaturação térmica torna-se inviável ⁷⁷.

Figura 3.5.12 - Desnaturação térmica de Thi1 e Thi1(A140V) monitorada por Far/UV CD. A concentração protéica utilizada foi de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, e o efeito da temperatura sobre a estrutura secundária foi avaliado mediante uma rampa de aquecimento de 20 até 86 °C, com uma variação de 2 °C, sendo a razão de aquecimento de $1^\circ \text{C.min}^{-1}$. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. (a) Espectros de Far/UV CD para Thi1, representados em diferentes cores de acordo com a legenda interna, indicando a temperatura de cada medida. (b) Curva de desnaturação construída a partir das variações nos valores de elipticidade em 220 nm, expressa em termos de fração de proteína desenovelada (f_D) em função da temperatura. A curva referente a Thi1 está destacada em azul e a referente a Thi1(A140V) em verde.

Em 1889, Arrhenius demonstrou que as velocidades de reações químicas são determinadas pela energia de ativação (E_a) e que a dependência da temperatura com a velocidade de reação pode ser expressa por analogia com a equação de van't Hoff. As equações de Arrhenius têm sido bastante utilizadas para correlacionar a dependência da temperatura com danos induzido pelo aquecimento em proteínas, células e tecidos. O aquecimento de materiais biológicos, mas especificamente de proteínas, podem induzir muitas alterações físicas e químicas, como alteração na viscosidade do meio, birrefringência, alteração no raio hidrodinâmico (estruturas mais compactas e ou agregados protéicos) e alteração na entalpia. As alterações induzidas pelo aquecimento podem envolver reações múltiplas ou mesmo reações que apresentem múltiplos passos. No entanto, modelos de reações de primeira ordem freqüentemente têm descrito o processo como um todo, já que a maioria das reações químicas obedece à equação de Arrhenius apresentando um gráfico linear de $\ln k$ versus $1/T$ ^{50; 96}.

A figura 3.5.12 (b) mostra o aumento da fração de proteínas desnaturadas em função do aumento de temperatura para Thi1 e Thi1(A140V). As curvas apresentam um comportamento do tipo sigmoidal, que pode ser ajustado ao processo irreversível de dois estados, o que permite a aplicação da teoria de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação do processo e o T_m . De acordo com o modelo de Lumry e Eyring, foi construído um gráfico de $\ln[\ln(1/f_n)]$ em função de $1/T$ e ajustado por uma equação linear (metodologia - equação (8)), dados não mostrados. A partir do coeficiente angular destes gráficos foi possível obter a energia de ativação para Thi1 (119 kJ.mol^{-1}) e para Thi1(A140V) (89 kJ.mol^{-1}) e por meio dos coeficientes lineares foi possível determinar a temperatura de transição (T_m) para Thi1 (350 K) e para Thi1(A140V) (346 K). Tanto os valores obtidos para energia de ativação do processo como os valores obtidos para temperatura de transição indicam que a mutação pontual confere a Thi1(A140V) uma menor estabilidade conformacional.

Embora não tenha sido possível a determinação da diferença na variação de energia livre entre as proteínas, os resultados obtidos nos estudos de desenovelamento permitiram calcular a concentração crítica de agente desnaturante necessária para induzir a desnaturação de Thi1 e Thi1(A140V), a energia de ativação de cada reação, bem como a temperatura de transição para ambas proteínas. Como forma de dar suporte a estes resultados, foi utilizado o programa CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/>)⁹⁷, o qual permite realizar a predição da estabilidade protéica frente a mutações pontuais. Para a predição da diferença na variação da energia livre entre a proteína selvagem e o mutante, o CUPSAT leva em consideração o ambiente estrutural específico do potencial atômico e o potencial dos ângulos de torção. A predição realizada para Thi1, a partir da estrutura cristalográfica disponível no PDB (1RP0), levou em consideração o desenovelamento induzido por agente desnaturante ou aumento de temperatura. O resultado obtido na predição da estabilidade estrutural frente a variação térmica mostrou que uma mutação a posição 140 é desfavorável basicamente para todos os resíduos de aminoácidos. Em contrapartida, a predição realizada para o desenovelamento induzido por agente desnaturante mostrou que apenas 5 diferentes resíduos poderiam gerar mutações favoráveis (glicina, glutamina, lisina, asparagina e histidina) substituindo a alanina. Dessa maneira, os resultados obtidos com a predição da estabilidade de Thi1 estão de acordo com os resultados experimentais e confirmam que a mutação de uma alanina por uma valina na posição 140 reduz a estabilidade de Thi1.

O estado desnaturado de uma proteína é colapsado em diferentes graus: contendo elementos de estrutura secundária e interações terciárias, especialmente interações hidrofóbicas que podem se formar e se desfazer rapidamente ⁹⁸. Deste modo, além da perturbação induzida pela temperatura sobre a estrutura secundária foi analisado ainda o efeito desta sobre os contatos terciários monitorando a emissão do triptofano, com intuito de avaliar comparativamente a integridade do oligômero de Thi1 e Thi1(A140V). A taxa de aquecimento utilizada foi semelhante a utilizada anteriormente nos experimentos de CD, entretanto a leituras foram feitas a cada 5 °C.

Figura 3.5. 13 – Emissão de fluorescência do triptofano frente a variação de temperatura. O comprimento de onda de excitação foi de 295 nm, as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 10 mm de caminho ótico, e concentração de 0,1 mg.mL⁻¹. As alterações conformacionais nos contatos terciários foram avaliadas mediante o aumento de temperatura. (a) Estão representados os espectros de emissão de fluorescência frente à variação térmica, cada cor do espectro corresponde a uma temperatura conforme indicado na legenda interna. (b) Curva de desnaturação construída a partir das variações no máximo de emissão, expressa em termos de fração de proteína desnaturada (f_D) em função da temperatura. Os pontos referentes à Thi1 estão destacados em azul e os referentes a Thi1(A140V) em verde.

Na figura 3.5.12 (a), nota-se não há mudanças significativas na posição do máximo de emissão frente ao aumento de temperatura e sim há uma redução na intensidade de fluorescência, proveniente da supressão dos resíduos de triptofano. O cálculo do centro de massa espectral (dados não mostrados) realizado para ambas as proteínas não revelaram diferenças significativas no ambiente do triptofano, em termos de deslocamento no

comprimento de onda, o que indica certa rigidez em seu microambiente. A figura 3.5.12 (b) foi construída levando-se em consideração que a redução no máximo de emissão indicaria a desnaturação protéica. Fazendo esta suposição, nota-se que Thi1(A140V) perderia seus contatos terciários mais rapidamente que Thi1. Todavia, a rigidez notada no microambiente do triptofano, sugere que o aumento de temperatura pode estar induzindo a formação de agregados protéicos que conservam alguns contatos terciários e também algum conteúdo de estrutura secundária.

Para validar esta hipótese, foram realizadas medidas de anisotropia de fluorescência intrínseca, excitando em 280 nm e em 295nm como mostrado na figura 3.5.14. Após o desenovelamento térmico, muitas proteínas não são capazes de se reenovelarem, devido à agregação, atribuída a associação parcial de moléculas desenoveladas. Desta forma, a formação de agregados estabiliza os oligômeros desenovelados reduzindo as interações energeticamente desfavoráveis entre as moléculas de água e as superfícies hidrofóbicas da proteína⁷¹. Portanto, os aumentos nos valores de anisotropia para Thi1(A140V) a partir de 50 °C, para ambos os comprimentos de onda de excitação, indicam que há uma diminuição na velocidade de rotação dos fluoróforos, o que provavelmente é consequência do aumento do raio hidrodinâmico de Thi1(A140V). Estes dados em conjunto com os demais resultados obtidos corroboram com o fato de que a mutação pontual de uma alanina para uma valina, confere menor estabilidade conformacional para Thi1.

Figura 3.5.14 – Anisotropia de fluorescência frente a variação de temperatura. Valores de anisotropia normalizados em relação ao valor máximo de anisotropia. A concentração protéica utilizada foi de $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$. As medidas foram realizadas em cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm. Cada valor anisotrópico é a representação da média de 10 varreduras consecutivas. (a) valores de anisotropia para excitação em 280 nm. (b) valores de anisotropia para excitação em 295 nm. Os pontos referentes à Thi1 estão destacados em azul e os referentes a Thi1(A140V) em verde.

3.6 Ensaios de cristalização de Thi1 e Thi1(A140V)

Com intuito de resolver a estrutura cristalográfica de Thi1(A140V) para avaliar o efeito da mutação pontual na estrutura de Thi1 e na sua interação com o ligante foram realizados diversos ensaios de cristalização usando vários fatoriais (ver metodologia). Também foram testadas diversas condições próximas as condições estabelecidas para a proteína selvagem no trabalho desenvolvido por Godoi et al.³⁸. É importante ressaltar que houve uma dificuldade de manter a fidelidade quanto às condições estabelecidas por Godoi *et al.*, pois um dos aditivos (heptano-1,2,3-triol) utilizado na condição de cristalização foi descontinuado. Além da triagem realizada, outro parâmetro variado foi a concentração protéica (4, 6, 10 e 20 mg.mL^{-1}). Dentre todas as condições testadas, a mais promissora foi a condição G12 do fatorial *Classic suite* I, composta por 0,1 M de acetato de sódio pH 4,6 e 8 % (w/v) de PEG 4000. Nesta condição, em aproximadamente 10 dias houve a formação de microcristais e também algumas placas de pequenas dimensões. Estas placas foram

submetidas à coleta de dados de difração de raios-X no LNLS (laboratório nacional de luz síncroton) pelo Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo, confirmando sua natureza protéica. Com esta confirmação, diversos esforços foram direcionados para o refinamento da condição de cristalização. Entretanto não houve melhora significativa no processo de cristalização de Thi1 e Thi1(A140V) e assim, em função do tempo, optou-se por direcionar o foco do trabalho para a análise e caracterização do ligante intrínseco de Thi1 e de seu mutante natural. Certamente, a resolução da estrutura de Thi1(A140V) continua sendo um desafio que merece atenção, pois novas idéias e/ou esclarecimentos poderão surgir na biossíntese da vitamina B1 em eucariotos em função deste resultado.

3.7 Caracterização do ligante intrínseco de Thi1 e de Thi1(A140V)

Apesar das diferenças na estabilidade estrutural de Thi1 e de Thi1(A140V), pouco se pode inferir ou correlacionar o efeito da mutação pontual com a função protéica. Muitas perguntas ainda ficaram em aberto, tais como: se a proteína mutada ainda é capaz de produzir a molécula ADT (provável intermediário da porção tiazólica de tiamina) e qual seria a integridade deste ligante. Neste sentido, diversos esforços foram direcionados para a identificação e caracterização do ligante de Thi1(A140V), sempre realizando um estudo comparativo com a molécula presente em Thi1. Conforme descrito em métodos, ambas proteínas foram aquecidas a 100 °C para desnaturação e liberação dos ligantes, figura 3.7.1.

Figura 3.7. 2 – Representação esquemática de extração do ligante de Thi1 ou Thi1(A140V). As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min. O precipitado formado foi separado do sobrenadante por meio de centrifugação por 10 min, a 16.000 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em um concentrador com limite nominal de peso molecular de 10 kDa. As amostras filtradas foram submetidas a caracterização espectroscópica.

Após a separação das proteínas desnaturadas da fração solúvel, esta contendo o ligante, as amostras foram analisadas em coluna C18 por HPLC, como mostra a figura 3.7.2. O tempo de retenção das amostras foi praticamente o mesmo e os perfis de eluição também foram muito parecidos. Estes eram constituídos basicamente por dois picos, o primeiro eluído

em 3,9 minutos e o segundo em 5,8 minutos. A única diferença entre os cromatogramas foi a proporção de cada pico. O primeiro pico do ligante de Thi1 apresentou uma intensidade menor que o pico correspondente para Thi1(A140V), entretanto o segundo pico foi relativamente mais intenso. Estes dados podem indicar a presença de outra molécula ou ser um produto de degradação do ligante. Porém, pelo fato dos ligantes não apresentaram uma boa afinidade à coluna, sendo eluídos precocemente no gradiente, não foi possível isolar os picos. Apesar deste fato, os experimentos de HPLC revelaram que tanto Thi1(A140V), como Thi1 são co-purificadas com algum ligante.

Figura 3.7. 3– Análise dos ligantes de Thi1 e Thi1(A140V) por HPLC. Em azul, perfil de eluição do ligante de Thi1 e em verde perfil de eluição do ligante de Thi1(A140V). A coluna utilizada foi uma C18 (25 cm x 4,6 mm, 6 μ m) e a eluição das amostras foi monitorada pela absorbância em 258 nm.

Após a verificação por HPLC que Thi1(A140V) também possuía um ligante intrínseco, a próxima etapa foi a realização de um estudo espectroscópico para avaliar as semelhanças deste ligante com o ADT presente em Thi1. Sabe-se que compostos aromáticos normalmente apresentam três transições eletrônicas que contribuem para os espectros de absorção. Na região de 180 a 190 nm e 200 a 240 nm as contribuições majoritárias são das transições eletrônicas fortes do tipo $n-\pi^*$ e na região entre 260 a 280 nm uma transição fraca do tipo $\pi-\pi^*$ ⁹⁹. Os espectros de absorção dos ligantes obtidos na região do UV (230 – 400 nm), apresentados na figura 3.7.3, revelaram diferenças intrigantes. No espectro do ligante

proveniente de Thi1 há a presença de um “ombro” que se inicia em aproximadamente 290 nm e termina em 310 nm, o que já era de se esperar como reportado nos estudos de caracterização do ligante da ortóloga de Thi1 de *S. cerevisiae*^{20; 22}. A ausência deste ombro no espectro de Thi1(A140V) pode ser um forte indicativo de que apesar de ser co-purificado com um Thi1(A140V), este pode apresentar a composição química diferente do ADT encontrado em Thi1.

Figura 3.7. 4– Espectro de absorção do ligante de Thi1. Os espectros de absorção obtidos entre 400 e 230 nm, a uma velocidade de varredura de 400 nm.min⁻¹, utilizando uma cubeta de caminho óptico de 1 cm. Em azul está representado o espectro do ligante proveniente de Thi1 e em verde o ligante de Thi1(A140V).

Além dos experimentos de absorção no UV, outras técnicas espectroscópicas foram empregadas para avaliar e caracterizar o ligante presente no mutante natural de Thi1. *Near/UV* CD tem sido extensivamente empregado para o estudo de macromoléculas biológicas, metabólitos e compostos orgânicos de uma forma geral. As propriedades quirópticas nesta região se restringem basicamente à contribuição dos anéis aromáticos presentes na substância e à disposição destes no espaço¹⁰⁰. A análise da estrutura cristalográfica do composto ADT, encontrado na estrutura de Thi1, revela a presença de quatro carbonos quirais e também a presença de regiões aromáticas, a porção pirimidina e a porção tiazólica, figura 3.7.4. Esta composição química esperada para os ligantes presentes

em Thi1 e Thi1(A140V) pode proporcionar uma conformação propícia para que haja uma atividade óptica, caso os quatro centros quirais presentes não estejam alinhados simetricamente¹⁰¹.

Figura 3.7.5— Representação da estrutura química da molécula de ADT. Os grupos funcionais estão destacados em diferentes cores.

Os espectros de CD apresentados na figura 3.7.5, mais uma vez confirmam a presença de uma molécula ligante no mutante natural de Thi1. Estes espectros, assim como os resultados obtidos anteriormente para os espectros de UV, revelam uma diferença nítida nas posições dos máximos e mínimos. Diversos estudos de CD com mononucleotídeos AMP, ADP e adenosina-5'-metileno difosfato mostraram que estes compostos apresentam bandas negativas centradas em 265 nm e 218 nm. As contribuições para o sinal de CD na região de 265 nm são provenientes das transições $\pi-\pi^*$ do anel da adenina, já na região de 218 nm as contribuições majoritárias são provenientes dos pares eletrônicos não ligantes dos átomos de N da purina apresentando transições do tipo $n-\pi^*$ ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Como o sinal de CD reflete a média entre os cromóforos e suas posições relativas, esperava-se que se os ligantes provenientes de Thi1 e Thi1(A140V) fossem iguais, eles apresentariam atividade óptica semelhante. Entretanto, pela análise dos espectros é possível observar que apesar dos ligantes apresentarem atividade óptica, as posições dos máximos e mínimos não são coincidentes,

embora ambos apresentem-se constituídos por cromóforos com transições eletrônicas semelhantes as encontradas em compostos derivados de ADP. As diferenças observadas entre o sinal de CD do ligante de Thi1 e de Thi1(A140V) podem ser devidas a uma alteração na composição química na região do anel de tiazol, já que as transições eletrônicas esperadas para a região da molécula composta por ADP estão presentes, ou simplesmente esteja relacionado a mudança conformacional das moléculas.

Figura 3.7. 6– Análise do ligante de Thi1 por Near/UV CD. (a) espectros de Near/UV CD, dos ligantes de Thi1 (azul) e de Thi1(A140V) (verde). (b) espectros de absorção adquiridos concomitantemente com os espectros de Near/UV CD. Os experimentos foram realizados em cubeta de quartzo com caminho ótico de 5 mm, a 25 °C, na região de 218 – 350 nm.

Medidas de FT-IR dos ligantes também foram realizadas com intuito de se obter mais informações sobre a composição química de cada ligante. Na figura 3.7.6 estão representados os espectros de FT-IR do ligante de Thi1 e de Thi1(A140V), sendo que os espectros estão apresentados em duas figuras dividido por regiões espectrais, a fim de facilitar a visualização. Nota-se que na região de 1800 até 400 cm^{-1} (figura 3.7.6 (a)) há pouca diferença entre os

espectros de Thi1 e Thi1(A140V). A diferença entre o sinal dos espectros fica mais evidente na região de 4000 a 2200 cm^{-1} .

Figura 3.7. 7 – Espectros de FT-IR dos ligantes de Thi1 em pastilhas de KBr. Em azul, espectros correspondentes a Thi1 e em verde a Thi1(A140V). (a) região espectral de 1800 a 400 cm^{-1} . (b) região espectral de 4000 a 2200 cm^{-1} .

As bandas de absorção majoritária na região de 3500 até 3100 são correspondentes a contribuições majoritárias das aminas aromáticas¹⁰⁵. Nota-se que o espectro correspondente

ao ligante de Thi1(A140V) apresenta bandas bem mais intensas do que o observado no espectro do ligante proveniente da proteína selvagem, porém ambos apresentam um pico que se sobressai em 3228 cm^{-1} . Além da contribuição dos grupos NH e NH_2 na região espectral entre 3700 a 2500 cm^{-1} , pode ocorrer uma sobreposição de bandas devido a contribuição dos grupos OH presentes na região do ligante, referente à adenosina difosfato (ADP). Além deste, outros picos característicos da adenosina que estão presentes nos espectros do ligante de Thi1 e de Thi1(A140V) são nas regiões de 1605 ($\text{C}=\text{N}$ e $\text{C}=\text{C}$), 1220 ($\text{C}-\text{N}$) e 1100 a 1000 ($\text{C}-\text{O}$), grupo hidroxila do açúcar¹⁰⁶. A presença de fortes bandas de absorção em regiões coincidentes com bandas de absorção do ADP confirma parte da identidade dos ligantes com esta molécula e também com o ligante esperado ADT. A tabela 10 mostra as bandas de absorção com os valores dos números de ondas característicos de cada grupo funcional, evidenciando que os ligantes apresentam basicamente os mesmos grupos funcionais, porém, como já mencionado anteriormente, com a diferença marcante da intensidade dos picos, na região de 3700 a 2500 cm^{-1} correspondente às aminas aromáticas, o que pode sugerir que o composto proveniente de Thi1(A140V) possui mais grupos funcionais do tipo NH_2 / NH.

Tabela 10 – Números de ondas esperados para alguns grupos funcionais e assinalamento estrutural com os ligantes de Thi1.

Grupos funcionais	Número de onda (cm^{-1})	Ligante de Thi1	Ligante de Thi1(A140V)
NH_2 / NH	3480 - 3160	3500 - 3100	3500 - 3100
OH	3575 - 2599	3200 - 2599	3200 - 2599
CH aromático	3070 - 3060	3070 - 3000	3070 - 3000
CH_3 / CH_2	2995 - 2835	2995 - 2835	2995 - 2835
$\text{C}=\text{C}$	1638 - 1588	1627	1627
$\text{C}=\text{N}$	1600 - 1500	1550	1550
$\text{C}-\text{N}$	1395 - 1225	1294	1294
$\text{C}-\text{C}$ / $\text{C}-\text{O}$	1140 - 1000	1132	1332 - 1118
CH	1090 - 1050	1052 - 1035	1052 - 1035

Todos os estudos espectroscópicos realizados deixaram claro que há uma diferença entre os ligantes de Thi1 e de Thi1(A140V), entretanto os resultados obtidos não foram o suficiente para afirmar quais eram as diferenças estruturais entre estas moléculas. Neste sentido, com intuito de esclarecer quais são as diferenças entre os compostos, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de alta resolução foi empregada na análise dos

ligantes. Estes experimentos foram realizados pela Profa. Dra. Claudia Elisabeth Munte do IFSC, assim como a análise dos resultados.

Os experimentos de RMN 1D ^1H e 2D TOCSY (*total correlation spectroscopy*) revelaram, diferentemente do esperado, a presença de uma multi-população de moléculas ligantes. Os espectros 1D, figuras 3.7.9, em conjunto com os espectros 2D, figuras 3.7.10 a 3.7.14, permitiram realizar o assinalamento da estrutura de pelo menos três destas moléculas. Com base no banco de dados *Madison-Qingdao Metabolomics Consortium* (<http://mmcd.nmrham.wisc.edu/>), figura 3.7.8, a primeira estrutura assinalada nos espectros 1D ^1H adquiridos foi a do ADP, figura 3.7.7 (b). Uma análise dos picos presentes nos espectros 1D (figura 3.7.9) revelam deslocamentos químicos praticamente iguais aos deslocamentos presentes no espectro 1D do ADP disponível no banco de dados (figura 3.7.8, referenciado como “linha”), apresentando inclusive picos correspondentes a uma segunda conformação da molécula de ADP, indicados nas figuras 3.7.8 e 3.7.9 (referenciado como “duas linhas”), fato comum para ambas as moléculas. Os experimentos TOCSY, figuras 3.7.11 e 3.7.12, validaram a presença da molécula de ADP nas amostras e também confirmaram a presença das duas populações distintas (figura 3.7.13, referenciados como linhas e duas linhas).

O terceiro composto assinalado foi o ligante ADT (ou AHZ), figura 3.7.7 (a), identificado inicialmente por Godoi et al.³⁸, o qual está presente tanto nas amostras provenientes de Thi1 como de Thi1(A140V). Sua estrutura foi assinalada baseada em dados de RMN ^1H e TOCSY, publicados por Chatterjee et al.²⁰. As moléculas de ADT presentes em ambas as proteínas apresentaram os mesmos deslocamentos químicos nos espectros 1D ^1H (figura 3.7.9), sem qualquer diferença estrutural aparente. A identidade dos ligantes foi validada pelos experimentos TOCSY, figura 3.7.10. Ambos apresentaram um sistema de spin, novamente com deslocamentos químicos correspondentes a dados já publicados para este composto.

A presença de uma quarta molécula pode ser observada nas amostras, mas a análise dos dados ainda não permitiu a identificação deste composto, carecendo de experimentos adicionais. Porém, é possível verificar que os deslocamentos químicos nos espectros 1D indicam a provável presença de uma molécula ligada a um composto que se assemelha a estrutura química do glicerol. Assim como as outras moléculas, este quarto composto apresenta um sistema de spin revelado pelos experimentos de TOCSY. No diagrama de correlação TOCSY fica ainda mais evidente a forte correlação entre os picos da molécula com

os picos que tem deslocamentos químicos (tabela 11) extremamente similares aos da molécula de glicerol.

Tabela 11 – Deslocamentos químicos do composto desconhecido.

Deslocamento químico	Acoplamento
Ligante Thi1/Thi(A140V)	
5,607 / 5,607	Dupleto de dupleto
4,091 / 4,091	Multipleteo
4,039 / 4,039	Multipleteo
4,204 / 4,204	Dupleto de dupleto
3,653 / 3,653	Dupleto de dupleto
3,770 / 3,770	Dupleto de dupleto

Figura 3.7. 8 – Estruturas químicas do ligante ADT e de ADP. (a) representação da estrutura do ligante ADT. (b) representação da molécula de ADP. As letras destacadas em vermelho representam a posição dos carbonos, os destaques referenciados pela “linha” (') simplesmente serve como um facilitador na identificação e diferenciação dos picos de ADP nos espectros de ^1H RMN.

Figura 3.7. 9 – Espectro 1D ^1H das moléculas ATP, ADT, AMP. Deslocamentos químicos para as moléculas de ATP, ADP e AMP forma adquiridos no bando de dados *Madison-Qingdao Metabolomics Consortium* (<http://mmcd.nmrfam.wisc.edu/>). As letras sobre os picos representam as posições dos carbonos com seus respectivos prótons de H identificados na figura 3.7.6, as letras destacadas pela apóstrofe indica os deslocamentos químicos do ADP (uma linha uma conformação e duas linhas uma segunda conformação).

Figura 3.7. 10– Espectros 1D ^1H dos ligantes de Thi1 e Thi1(A140V). Em azul, ligante de Thi1, identificado como (WT), em verde ligante de Thi1(A140V), identificado como (MUT), em vermelho o ADP. (a) deslocamentos químicos ocorridos na região de 5,6 a 8,6 ppm, (b) região de 3,4 a 4,7 ppm e em (c) região de 0 a 2,9 ppm. As letras sobre os picos representam as posições dos carbonos com seus respectivos prótons de H identificados na figura 3.7.6, as letras destacadas pela apóstrofe indica os deslocamentos químicos do ADP (uma linha uma conformação e duas linhas uma segunda conformação). G mostra os picos com deslocamentos químicos do glicerol, o asterisco são picos não identificados de moléculas pequenas, e a indicação prot são picos com deslocamentos químicos de prováveis restos protéicos.

Figura 3.7. 11 – Espectro TOCSY do ligante de Thi1, identificando as correlações encontradas para a molécula de ADT. As linhas traçadas entre os picos representam o sistema de spins, assinalado como a molécula de ADT representada no diagrama. A linha tracejada representa correlações esperadas, porém atenuadas pelo processo de supressão da água.

Figura 3.7. 12 - Espectro TOCSY do ligante de Thil(A140V), identificando as correlações encontradas para a molécula de ADP. As linhas traçadas entre os picos representam o sistema de spins, assinalado como a molécula de ADP representada no diagrama. As linhas tracejadas representam correlações esperadas, porém atenuadas pelo processo de supressão da água.

Figura 3.7. 13 - Espectro TOCSY do ligante de Thi1(A140V), identificando as correlações encontradas para a segunda conformação da molécula de ADP. As linhas traçadas entre os picos representam o sistema de spins, assinalado como a molécula de ADP representada no diagrama, porém com uma conformação diferente da do diagrama anterior. As linhas tracejadas representam correlações esperadas, porém atenuadas pelo processo de supressão da água.

Figura 3.7. 14 – Ampliação da região de contato entre o próton l e seus vizinhos k, j e i do diagrama de correlação TOCSY da região da adenina e ribose presentes no ligante Thi1(A140V). Em (a) as setas indicam a correlação entre os picos referentes aos prótons da ribose, representada em (b).

Figura 3.7. 15 - Espectro TOCSY do ligante de Thi1(A140V), identificando as correlações encontradas para a quarta molécula, não identificada. As linhas traçadas entre os picos representam o sistema de spins, porém o assinalamento deste composto não foi possível.

Os experimentos de RMN, ao contrário de uma das hipóteses elaborada a partir dos resultados da caracterização dos ligantes por absorção, CD e FT-IR, revelaram a presença dos mesmos ligantes, incluindo o ADT, mas em diferentes proporções. Assim, os experimentos de RMN mostraram a presença de basicamente os mesmos compostos nas amostras provenientes de Thi1 e Thi1(A140V), mas além disso, permitiram realizar a quantificação das diferentes populações em cada amostra. Isto foi feito a partir da integração dos picos, possibilitando quantificar e identificar qual a população dominante em Thi1 e Thi1(A140V). Assumindo que as moléculas identificadas com diferentes conformações do ADP sejam as mesmas, os valores calculados para a amostra proveniente de Thi1 foram de aproximadamente 49 % de moléculas de ADT, 28 % de ADP e 23 % do composto desconhecido. Já para a amostra do ligante proveniente de Thi1(A140V), os valores foram de 20 % de moléculas de ADT, 56 % de ADP e 24 % do composto desconhecido. Essa diferença de proporções revelada por RMN esclarece e concorda com os resultados de caracterização obtidos de pelas técnicas espectroscópicas, pois uma diminuição na população de ADT (na amostra proveniente de Thi1(A140V)) certamente irá alterar suas propriedades espectroscópicas, reduzindo o número de carbonos quirais que contribuem para o sinal de CD. Além disso, a presença de diferentes compostos com diferentes conformações (ADP) também contribuirão para mudanças nos espectros. Diferentemente do que se pensava no início do trabalho, a proteína Thi1(A140V) provavelmente apresenta atividade, já que o provável precursor da porção tiazólica da tiamina está presente na proteína. Entretanto, como nesta proteína a proporção de ADP é muito maior, praticamente o dobro, é possível que a mutação na posição 140 tenha reduzido a atividade de Thi1, ou ainda pode ter facilitado o processo de degradação da molécula de ADT, o que seria uma explicação para o aumento na quantidade de ADP.

CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho, Thi1 e seu mutante natural Thi1(A140V), o qual é responsável pela auxotrofia para tiamina numa linhagem mutante de *A. thaliana*, foram estudados com intuito de verificar a influência desta mutação. Ambas proteínas foram produzidas de forma recombinante em *E. coli* e purificadas para a realização de análises biofísicas. Diversos estudos foram realizados para avaliar se a mutação pontual desestabilizou a formação da estrutura quaternária de Thi1. Todos os experimentos de gel nativo e cromatografia de exclusão molecular sugeriram que a estrutura octamérica de Thi1 não sofreu alterações, já que o cálculo dos raios hidrodinâmicos realizados de ambas apresentaram valores similares entre si para as diferentes abordagens empregadas, assim como valores da massa molecular aparente (191 para Thi1 e 203 para Thi1(A140V)). Com relação à estabilidade, foi possível verificar uma diminuição de 4° C na temperatura de transição (T_m) para Thi1(A140V) nos estudos de desnaturação térmica, além da concentração de guanidina necessária para a desnaturação de 50% da proteínas ter sido quase o dobro para Thi1. Os dados de anisotropia de fluorescência obtidos a partir da desnaturação térmica também confirmaram maior instabilidade de Thi1(A140V) frente a Thi1. Tomados em conjunto, os resultados dos experimentos de fluorescência e Dicroísmo Circular (CD) mostraram diferenças relativas consideráveis na estabilidade das duas proteínas, sendo Thi1(A140V) mais instável em todos os experimentos e, assim, permitindo atribuir à mutação pontual a causa da instabilidade. Porém, estes resultados não possibilitaram inferir qual o comprometimento da atividade frente a mutação. Uma vez que não foram obtidos cristais do mutante, partiu-se para determinar a presença do ligante nesta proteína.

Com relação à caracterização do ligante de Thi1 e de Thi1(A140V), os espectros de CD confirmam a presença de uma molécula ligante no mutante natural de Thi1. Ainda, estes espectros, assim como os resultados obtidos por UV, revelaram uma diferença nítida nas posições dos máximos e mínimos, possivelmente devidas a uma alteração na composição química ou simplesmente relacionada a mudanças conformacionais das moléculas. Utilizando FT-IR, ficou evidenciado que os ligantes apresentavam basicamente os mesmos grupos funcionais, porém com a diferença marcante da intensidade dos picos na região correspondente às aminas aromáticas, sugerindo que o composto proveniente de Thi1(A140V)

possuía mais grupos funcionais do tipo NH_2 / NH . Os experimentos de RMN foram decisivos para revelar que na verdade o ligante purificado era formado de uma população de moléculas, presentes tanto em Thi1 como em Thi1(A140V). Foi possível obter o assinalamento da estrutura de três destas moléculas, sendo estas: o ADP, em duas conformações distintas, e o ligante ADT (ou AHZ). A presença de uma quarta molécula pode ser observada nas amostras, mas a análise dos dados ainda não permitiu a identificação deste composto, carecendo de experimentos adicionais. A presença dos mesmos compostos nas amostras provenientes de Thi1 e Thi1(A140V) foi assim confirmada. Adicionalmente, a porcentagem de ADT calculada para a amostra proveniente de Thi1 foi cerca de 2,5 vezes maior que para o mutante, enquanto de ADP foi duas vezes menor. Essa diferença concorda com os resultados de caracterização espectroscópica dos ligantes.

Como uma conclusão geral, pode-se dizer que a proteína Thi1(A140V) é mais instável em termos estruturais e provavelmente é ativa, dada a presença do ADT. Entretanto, como a proporção de ADP é muito maior, é possível que a mutação na posição 140 tenha reduzido a atividade de Thi1(A140V), ou ainda pode ter facilitado o processo de degradação da molécula de ADT, o que seria uma explicação para o aumento na quantidade de ADP. Desta forma, podemos especular que a auxotrofia do mutante *tz* para tiamina pode derivar da ineficiência de Thi1(A140V) em suprir as quantidades adequadas do intermediário da porção tiazólica (ADT) influenciando assim a via de síntese de tiamina. Experimentos complementares ainda são necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1 FATTAL-VALEVSKI, A. Thiamine (Vitamin B1). **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 12-20, Mar. 2011.

- 2 CARPENTER, K. J. A short history of nutritional science: part 3 (1912-1944). **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3023-32, Oct. 2003. ISSN 0022-3166.

- 3 FUNK, C. On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. **The Journal of Physiology**, v. 43, n. 5, p. 395–400, 1911.

- 4 GOYER, A. Thiamine in plants: aspects of its metabolism and functions. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14-15, p. 1615-24, Oct. 2010. ISSN 1873-3700.

- 5 WOODWARD, J. B. et al. A maize thiamine auxotroph is defective in shoot meristem maintenance. **The Plant Cell**, v. 22, n. 10, p. 3305-17, Oct 2010. ISSN 1532-298X.

- 6 MAKARCHIKOV, A. F. et al. Thiamine triphosphate and thiamine triphosphatase activities: from bacteria to mammals. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 7, p. 1477-88, July 2003. ISSN 1420-682X.

- 7 POHL, M.; SPRENGER, G. A.; MULLER, M. A new perspective on thiamine catalysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 335-42, Aug. 2004. ISSN 0958-1669.

- 8 SMITH, A. G. et al. Plants need their vitamins too. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 266-75, June 2007. ISSN 1369-5266.

-
- 9 DEPEINT, F. et al. Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 1-2, p. 94-112, Oct 27 2006. ISSN 0009-2797.
- 10 TIMM, D. E. et al. Crystal structure of thiamin pyrophosphokinase. **Journal of Molecular Biology**, v. 310, n. 1, p. 195-204, Jun 29 2001. ISSN 0022-2836.
- 11 ROJE, S. Vitamin B biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 1904-21, Jul 2007. ISSN 0031-9422.
- 12 JURGENSON, C. T.; BEGLEY, T. P.; EALICK, S. E. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 569-603, 2009. ISSN 1545-4509.
- 13 HAZRA, A.; CHATTERJEE, A.; BEGLEY, T. P. Biosynthesis of the thiamin thiazole in *Bacillus subtilis*: identification of the product of the thiazole synthase-catalyzed reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 9, p. 3225-9, Mar. 11 2009. ISSN 1520-5126.
- 14 BEGLEY, T. P. et al. Cofactor biosynthesis--still yielding fascinating new biological chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 2, p. 118-25, Apr. 2008. ISSN 1367-5931.
- 15 DORRESTEIN, P. C. et al. The biosynthesis of the thiazole phosphate moiety of thiamin (vitamin B1): the early steps catalyzed by thiazole synthase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 10, p. 3091-6, Mar. 17 2004. ISSN 0002-7863.
- 16 PARK, J. H. et al. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin pyrophosphate (vitamin B1). **Biochemistry**, v. 42, n. 42, p. 12430-8, Oct. 28 2003. ISSN 0006-2960.

17 SETTEMBRE, E.; BEGLEY, T. P.; EALICK, S. E. Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 6, p. 739-47, Dec. 2003. ISSN 0959-440X.

18 LI, M. et al. Thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the NAD⁺-dependent histone deacetylase Hst1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 13, p. 3329-41, July 2010. ISSN 1098-5549.

19 JURGENSON, C. T. et al. Structural insights into the function of the thiamin biosynthetic enzyme Thi4 from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 45, n. 37, p. 11061-70, Sept. 19 2006. ISSN 0006-2960.

20 CHATTERJEE, A. et al. Thiamin biosynthesis in eukaryotes: characterization of the enzyme-bound product of thiazole synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and its implications in thiazole biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 22, p. 7158-9, June 7 2006. ISSN 0002-7863.

21 CHATTERJEE, A. et al. Biosynthesis of thiamin thiazole: determination of the regiochemistry of the S/O acyl shift by using 1,4-dideoxy-D-xylulose-5-phosphate. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 21, p. 3507-10, May 19 2006. ISSN 1433-7851.

22 CHATTERJEE, A. et al. Biosynthesis of the thiamin-thiazole in eukaryotes: identification of a thiazole tautomer intermediate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 34, p. 11394-8, Aug. 27 2008. ISSN 1520-5126.

23 CHATTERJEE, A. et al. Biosynthesis of thiamin thiazole in eukaryotes: conversion of NAD to an advanced intermediate. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 10, p. 2914-22, Mar. 14 2007. ISSN 0002-7863.

-
- 24 LAWHORN, B. G.; MEHL, R. A.; BEGLEY, T. P. Biosynthesis of the thiamin pyrimidine: the reconstitution of a remarkable rearrangement reaction. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 2, n. 17, p. 2538-46, Sept. 7 2004. ISSN 1477-0520.
- 25 NOSAKA, K. Recent progress in understanding thiamin biosynthesis and its genetic regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 1, p. 30-40, Aug. 2006. ISSN 0175-7598.
- 26 KIM, Y. S. et al. A Brassica cDNA clone encoding a bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin-phosphate pyrophosphorylase involved in thiamin biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v. 37, n. 6, p. 955-66, Aug. 1998. ISSN 0167-4412.
- 27 DU, Q.; WANG, H.; XIE, J. Thiamin (vitamin B1) biosynthesis and regulation: a rich source of antimicrobial drug targets? **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 41-52, 2011. ISSN 1449-2288.
- 28 BELANGER, F. C. et al. Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. **Plant Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 809-21, Nov. 1995. ISSN 0167-4412.
- 29 MACHADO, C. R. et al. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 585-93, June 1996. ISSN 0167-4412.
- 30 WANG, G. et al. Dual function of rice OsDR8 gene in disease resistance and thiamine accumulation. **Plant Molecular Biology**, v. 60, n. 3, p. 437-49, Feb. 2006. ISSN 0167-4412.
- 31 CHABREGAS, S. M. et al. Dual targeting properties of the N-terminal signal sequence of *Arabidopsis thaliana* THI1 protein to mitochondria and chloroplasts. **Plant Molecular Biology**, v. 46, n. 6, p. 639-50, Aug. 2001. ISSN 0167-4412.

-
- 32 BETTENDORFF, L.; WINS, P. Thiamin diphosphate in biological chemistry: new aspects of thiamin metabolism, especially triphosphate derivatives acting other than as cofactors. **FEBS Journal**, v. 276, n. 11, p. 2917-25, June 2009. ISSN 1742-4658.
- 33 CHEAH, M. T. et al. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 497-500, May 24 2007. ISSN 1476-4687.
- 34 CROFT, M. T. et al. Thiamine biosynthesis in algae is regulated by riboswitches. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 52, p. 20770-5, Dec. 26 2007. ISSN 1091-6490.
- 35 THORE, S.; LEIBUNDGUT, M.; BAN, N. Structure of the eukaryotic thiamine pyrophosphate riboswitch with its regulatory ligand. **Science**, v. 312, n. 5777, p. 1208-11, May 26 2006. ISSN 1095-9203.
- 36 MACHADO, C. R. et al. Dual role for the yeast THI4 gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, n. 1, p. 114-21, Oct. 17 1997. ISSN 0022-2836.
- 37 RIBEIRO, D. T. et al. Functional characterization of the thil promoter region from *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1797-804, Jul 2005. ISSN 0022-0957.
- 38 GODOI, P. H. et al. Structure of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 from *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30957-66, Oct. 13 2006. ISSN 0021-9258.
- 39 ZHAO, W. et al. Tomato LeTHIC is a Fe-required HMP-P synthase involved in thiamine synthesis and regulated by multiple factors. **Plant and Cell Physiology**, Apr. 20 2011. ISSN 1471-9053.

- 40 PAPINI-TERZI, F. S. et al. Point mutation is responsible for Arabidopsis tz-201 mutant phenotype affecting thiamin biosynthesis. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 8, p. 856-60, Aug. 2003. ISSN 0032-0781.
- 41 STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 60-89, 1990. ISSN 0076-6879.
- 42 AUSUBEL, F. M. **Short protocols in molecular biology** : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. 5th ed. New York: Wiley, 2002. ISBN 0471250929 (cloth).
- 43 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug. 15 1970. ISSN 0028-0836.
- 44 GILL, S. C.; VON HIPPEL, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. **Analytical Biochemistry**, v. 182, n. 2, p. 319-26, Nov. 1 1989. ISSN 0003-2697.
- 45 GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. M (Ed). **The Proteomics protocols handbook**. Totowa: Humana Press, 2005.
- 46 HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry** : principles and applications. 3rd ed. Hoboken: Wiley , 2007. 489 p. ISBN 047003310X (hbk.).
- 47 CHEVREUX, G. et al. Electrospray ionization mass spectrometry studies of noncovalent myosin VI complexes reveal a new specific calmodulin binding site. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 8, p. 1367-76, Aug. 2005. ISSN 1044-0305.

48 CHAPEAUROUGE, A.; JOHANSSON, J. S.; FERREIRA, S. T. Folding intermediates of a model three-helix bundle protein. Pressure and cold denaturation studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14861-6, May 4 2001. ISSN 0021-9258 .

49 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd. New York: Springer, 2006. v. 26, 954 p. ISBN 9780387312781.

50 WRIGHT, N. T. On a relationship between the Arrhenius parameters from thermal damage studies. **Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme**, v. 125, n. 2, p. 300-304, Apr. 2003. ISSN 0148-0731.

51 SANCHEZ-RUIZ, J. M. et al. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. **Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 1648-52, Mar 8 1988. ISSN 0006-2960.

52 BRÄNDÉN, C.-I.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York: Garland Pub., 1991. v.15, 302 p. ISBN 0815303440.

53 LIU, M. L. et al. Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 132, n. 1, p. 125-129, May 1998. ISSN 1090-7807.

54 STATES, D. J., HABERKORN, R.A. & RUBEN, R.J. . A 2D NMR experiment with pure absorption phase in four quadrants. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 48, p. 286–295, 1982.

55 HIGGINS, S. J.; HAMES, B. D. **Protein expression : a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, 1999. xix,282p. ISBN 0199636249.

56 KING, T. P. Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilization. **Biochemistry**, v. 11, n. 3, p. 367-&, 1972. ISSN 0006-2960.

57 GOETZ, H. et al. Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 60, n. 3, p. 281-93, Sept. 30 2004. ISSN 0165-022X.

58 LOO, J. A. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-23, Jan.-Feb. 1997. ISSN 0277-7037.

59 HAMMES, G. G. **Spectroscopy for the biological sciences**. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2005. v.10, 172 p. ISBN 9780471713449 (pbk.).

60 RANJBAR, B.; GILL, P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 74, n. 2, p. 101-20, Aug. 2009. ISSN 1747-0285.

61 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-39, Aug. 10 2005. ISSN 0006-3002.

62 BEROVA, N.; NAKANISHI, K. O.; WOODY, R. **Circular dichroism : principles and applications**. 2nd. New York: Wiley-VCH, 2000. v.19, 877 p. ISBN 0471330035 (acid-free paper).

63 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 243-51, Dec. 15 2000. ISSN 0003-2697.

-
- 64 REMPEL, B. et al. Biomolecular interaction study of Cyclolinopeptide A with human serum albumin. **Journal of Biomedicine and Biotechnolog**, v. 2010, p. 737289, 2010. ISSN 1110-7251.
- 65 STRICKLAND, E. H. Aromatic contributions to circular dichroism spectra of proteins. **CRC Critical Reviews in Biochemistry**, v. 2, n. 1, p. 113-75, Jan. 1974. ISSN 0045-6411.
- 66 KAY, E.; STRICKLAND, E. H.; BILLUPS, C. Near ultraviolet circular dichroism and absorption spectra of chicken ovomucoid and acetylated derivatives at 297 and 77 degrees K. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 3, p. 797-802, Feb. 10 1974. ISSN 0021-9258.
- 67 ALBANI, J. R. **Principles and applications of fluorescence spectroscopy**. Oxford ; Ames, Iowa: Blackwell Science, 2007. v.8, 255p. ISBN 9781405138918.
- 68 MATYUS, L.; SZOLLOSI, J.; JENEI, A. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 83, n. 3, p. 223-36, Jun. 1 2006. ISSN 1011-1344.
- 69 MERRILL, A. R.; PALMER, L. R.; SZABO, A. G. Acrylamide quenching of the intrinsic fluorescence of tryptophan residues genetically engineered into the soluble colicin E1 channel peptide. Structural characterization of the insertion-competent state. **Biochemistry**, v. 32, n. 27, p. 6974-81, July 13 1993. ISSN 0006-2960 .
- 70 TOKURIKI, N. et al. How Protein stability and new functions trade off. **Plos Computational Biology**, v. 4, n. 2, p. -, Feb. 2008. ISSN 1553-734X.

-
- 71 KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Chemical, thermal and pH-induced equilibrium unfolding studies of *Fusarium solani* lectin. **IUBMB Life**, v. 59, n. 1, p. 34-43, Jan. 2007. ISSN 1521-6543 .
- 72 DEBNATH, D. K.; MUKHOPADHYAY, K.; BASAK, S. Acid-induced denaturation and refolding of prothrombin. **Biophysical Chemistry**, v. 116, n. 2, p. 159-65, July 1 2005. ISSN 0301-4622.
- 73 CIEPLAK, M.; HOANG, T. X.; ROBBINS, M. O. Thermal folding and mechanical unfolding pathways of protein secondary structures. **Proteins**, v. 49, n. 1, p. 104-13, Oct. 1 2002. ISSN 1097-0134 .
- 74 MARTIN, S. R.; SCHILSTRA, M. J. Circular dichroism and its application to the study of biomolecules. **Methods in Cell Biology**, v. 84, p. 263-93, 2008. ISSN 0091-679X.
- 75 BENJWAL, S. et al. Monitoring protein aggregation during thermal unfolding in circular dichroism experiments. **Protein Science**, v. 15, n. 3, p. 635-9, Mar. 2006. ISSN 0961-8368 .
- 76 FANDRICH, M. Structure and formation of amyloid fibrils. **Acta Histochemica**, v. 105, n. 4, p. 379, 2003. ISSN 0065-1281 .
- 77 JAENICKE, R.; BOHM, G. The stability of proteins in extreme environments. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 6, p. 738-48, Dec. 1998. ISSN 0959-440X.
- 78 EFTINK, M. R.; IONESCU, R. Thermodynamics of protein unfolding: questions pertinent to testing the validity of the two-state model. **Biophysical Chemistry**, v. 64, n. 1-3, p. 175-97, Feb. 28 1997. ISSN 0301-4622 .

79 RENARD, D. et al. Effects of pH and salt environment on the association of beta-lactoglobulin revealed by intrinsic fluorescence studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 22, n. 1, p. 41-9, Feb. 1998. ISSN 0141-8130 .

80 MACGREGOR, R. B.; WEBER, G. Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy. **Nature**, v. 319, n. 6048, p. 70-3, Jan. 2-8 1986. ISSN 0028-0836 .

81 LIMA, L. M. et al. New insights into conformational and functional stability of human alpha-thrombin probed by high hydrostatic pressure. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 17, p. 3580-7, Sep. 2004. ISSN 0014-2956.

82 GOTO, Y.; TAKAHASHI, N.; FINK, A. L. Mechanism of acid-induced folding of proteins. **Biochemistry**, v. 29, n. 14, p. 3480-8, Apr. 10 1990. ISSN 0006-2960 .

83 GOTO, Y.; CALCIANO, L. J.; FINK, A. L. Acid-induced folding of proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 2, p. 573-7, Jan. 1990. ISSN 0027-8424 .

84 FINK, A. L. et al. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states. **Biochemistry**, v. 33, n. 41, p. 12504-11, Oct. 18 1994. ISSN 0006-2960 .

85 SAUER, K. **Biochemical spectroscopy**. San Diego ; London: Academic Press, 1995. v.27,816p. ISBN 0121821471.

86 EAKIN, C. M.; MIRANKER, A. D. From chance to frequent encounters: origins of beta2-microglobulin fibrillogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1753, n. 1, p. 92-9, Nov. 10 2005. ISSN 0006-3002 .

87 UVERSKY, V. N.; FINK, A. L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1698, n. 2, p. 131-53, May 6 2004. ISSN 0006-3002 .

88 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th. New York: W.H. Freeman, 2008. ISBN 9780716771081.

89 PACE, C. N. The stability of globular proteins. **CRC critical reviews in biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 1-43, May 1975. ISSN 0045-6411.

90 ALBER, T. Mutational effects on protein stability. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 58, n. 1, p. 765-98, 1989. ISSN 0066-4154 .

91 PRIVALOV, P. L. Stability of proteins: small globular proteins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 33, p. 167-241, 1979. ISSN 0065-3233.

92 SHIRLEY, B. A. et al. Conformational stability and activity of ribonuclease T1 and mutants. Gln25----Lys, Glu58----Ala, and the double mutant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 20, p. 11621-5, July 15 1989. ISSN 0021-9258.

93 KUSUMOTO, Y. et al. Temperature dependence of amyloid beta-protein fibrillization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 21, p. 12277-82, Oct. 13 1998. ISSN 0027-8424.

94 BLOOM, J. D. et al. Protein stability promotes evolvability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 15, p. 5869-74, Apr. 11 2006. ISSN 0027-8424.

95 TANFORD, C. Protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, v. 23, p. 121-282, 1968. ISSN 0065-3233.

-
- 96 OLIVEBERG, M.; TAN, Y. J.; FERSHT, A. R. Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 19, p. 8926-9, Sept. 12 1995. ISSN 0027-8424.
- 97 PARTHIBAN, V.; GROMIHA, M. M.; SCHOMBURG, D. CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p. W239-W242, July 1 2006. ISSN 0305-1048.
- 98 FERSHT, A. R.; DAGGETT, V. Protein folding and unfolding at atomic resolution. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 573-82, Feb. 22 2002. ISSN 0092-8674.
- 99 SLADE, D.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 66, n. 18, p. 2177-215, Sept. 2005. ISSN 0031-9422.
- 100 SEVOSTYANOVA, I. A.; KOCHETOV, G. A. Optical characteristics of thiamine in model systems and in holoenzyme. **Biochemistry (Mosc)**, v. 69, n. 9, p. 963-70, Sept. 2004. ISSN 0006-2979.
- 101 ALLENMARK, S. G. Chiroptical methods in the stereochemical analysis of natural products. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 2, p. 145-55, Apr. 2000. ISSN 0265-0568.
- 102 ROGERS, D. M.; HIRST, J. D. First-principles calculations of protein circular dichroism in the near ultraviolet. **Biochemistry**, v. 43, n. 34, p. 11092-102, Aug. 31 2004. ISSN 0006-2960.
- 103 PETTEGREW, J. W.; MILES, D. W.; EYRING, H. Circular dichroism of adenosine dinucleotides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 5, p. 1785-8, May 1977. ISSN 0027-8424.

104 JOPPICH-KUHN, R.; LUISI, P. L. Circular dichroic properties and conformation of thionicotinamide dinucleotides. **European Journal of Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 587-92, Feb. 1978. ISSN 0014-2956.

105 IDE, S.; ATAC, A.; YURDAKUL, S. Spectroscopic and structural studies on dichlorobis(nicotinamide)zinc(II). **Journal of Molecular Structure**, v. 605, n. 1, p. 103-107, Feb. 27 2002. ISSN 0022-2860.

106 WARDKHAN, W. W. et al. New approaches for the synthesis of thiazoles and their fused derivatives with antimicrobial activities. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 55, n. 5, p. 1133-1144, Oct. 2008. ISSN 0009-4536.