

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JAQUELINE PESCIUTTI EVANGELISTA

Selenoproteínas: Seril-tRNA Sintetase e as
selenoproteínas do *Trypanosoma brucei*

São Carlos
2014

JAQUELINE PESCIUTTI EVANGELISTA

Selenoproteínas: Seril-tRNA Sintetase e as
selenoproteínas do *Trypanosoma brucei*

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
Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2014

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 do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Evangelista, Jaqueline Pesciutti
Selenoproteínas: Seril-tRNA Sintetase e as
selenoproteínas do Trypanosoma brucei / Jaqueline
Pesciutti Evangelista; orientador Otavio Henrique
Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2014.
148 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Selenoproteínas. 2. Trypanosoma brucei. 3.
Interação proteína-tRNA. 4. Proteína de membrana. I.
Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

Àquela que no meio dessa trajetória, virou uma estrelinha e faz muita falta
aqui na terra, minha avó "Cida".

AGRADECIMENTOS

Uma tese de doutoramento é uma longa viagem, com muitos percalços pelo caminho. E para a realização deste trabalho obtive inúmeros contributos de naturezas diversas que não podem e nem devem deixar de serem realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Prof. Dr. Otavio H. Thiemann, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade, pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação e acima de tudo pela grande amizade cultivada durante estes anos de parceria.

À Dra. Isabel Moraes do Membrane Protein Laboratory, Diamond Light Source, Harwell Science and Innovation Campus - Didcot, Reino Unido, pela colaboração, disponibilidade e possibilidade de fazer um estágio em seu laboratório e aos membros do grupo que sempre foram muito prestativos.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, do Departamento de Química da Universidade de São Paulo, campus - Ribeirão Preto e em especial à sua aluna de doutorado Juliana Sakamoto Yoneda pela colaboração e disponibilidade nos experimentos realizados em seu laboratório.

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural Prof. Dr. Eduardo Horjales e Prof. Dr. Richard Garrat e a todos os funcionários Bianca, Fernando, Dr. Humberto, Luciana, Rejane e Dr. Susana (Sur) por todo o apoio, contribuição e ensinamentos que recebi durante minha permanência.

Aos membros desta banca por aceitarem este convite, o que certamente tornará este trabalho mais rico.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Estrutural que sempre me ajudaram diretamente ou indiretamente. Em especial aos alunos do "U do Otavio" e em particular à Nath por deixar eu "tentar orientá-la" durante sua iniciação científica. E às amigas especiais: Cy, Ju Torini, Livia Manzine e Simone.

À toda a equipe da biblioteca do IFSC, pelo trabalho na verificação da formatação do texto para que ele estivesse dentro das normas acadêmicas vigentes, também expresse meus agradecimentos.

À todos os funcionários do IFSC, de maneira especial aos da biblioteca, serviço de pós-graduação e da área financeira que sempre foram acessíveis quando procurei.

Aos meus pais, meus maiores mestres, Luiz e Maria do Carmo que dignamente me apresentaram à importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

Ao Samuel, meu marido, e Mariah, minha filha, que são meus grandes companheiros, amigos e meus amores pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem vocês nenhuma conquista valeria à pena.

À uma força maior que sempre me acompanha: Deus.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

RESUMO

EVANGELISTA, J. P. **Selenoproteínas: Seril-tRNA Sintetase e as selenoproteínas do *Trypanosoma brucei***. 2014. 148p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O aminoácido selenocisteína (Sec) representa a principal forma biológica de selênio sendo requerida uma complexa maquinaria molecular para sua síntese e incorporação co-traducional em selenoproteínas. A Seril-tRNA sintetase (SerRS) inicia essa via, aminoacilando o Ser-tRNA^{Sec} (SelC) com uma serina e também aminoacila os tRNAs^{Ser}. Sendo assim, um dos focos deste trabalho foi estudar a interação da SerRS de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) com os tRNAs^{Ser} e o SelC utilizando a técnica de anisotropia de fluorescência para determinar suas constantes de dissociação. Em *Kinetoplastidae*, além da via de síntese de selenocisteína, há três selenoproteínas: SelT, SelK e SelTryp. No entanto, pouco se sabe a respeito das mesmas, sendo o estudo destas selenoproteínas o outro foco deste trabalho. Os fragmentos de DNA que codificam estas selenoproteínas foram subclonados em vetor de expressão pET 28a e 29a para posterior uso em células de *Escherichia coli* (*E. coli*). Para as proteínas SelK e SelTryp os ensaios de expressão apresentaram resultados insuficientes para dar continuidade aos experimentos planejados, pois o rendimento foi baixo e a purificação não foi possível. Já com a proteína SelT, devido à grande dificuldade encontrada para torná-la solúvel, descobriu-se, no decorrer do trabalho, que tratava-se de uma proteína de membrana, ocasionando mudanças de alguns objetivos previamente propostos e conseqüentemente busca por novas estratégias. Conseguiu-se expressá-la na de forma solúvel e purificá-la por cromatografias. Ensaio realizado no SEC-MALLS mostraram uma estabilidade do complexo proteína-detergente. Com a *TbSerRS* é possível concluir que a organização de especificidade de ligação da enzima com seus ligantes se dá crescentemente: SelC>tRNA^{Ser7}>tRNA^{Ser3a}>tRNA^{Ser3b}. E com as selenoproteínas do *T. brucei* faz-se necessários novas construções para SelK e SelTryp e dar continuidade aos experimentos com a SelT tentando cristalizá-la, já que protocolo para a obtenção do complexo proteína-detergente está montado e estabilizado.

Palavras-chave: Selenoproteínas. Kinetoplastidae. Constante de dissociação.

ABSTRACT

EVANGELISTA, J. P. **Selenoproteins:** Seryl-tRNA synthetase and the selenoproteins of *Trypanosoma brucei*. 2014. 148p Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Selenocysteine (Sec) amino acid is the major biological form of selenium and requires a complex molecular machinery for its synthesis and co-translational incorporation into selenoproteins. The Seryl-tRNA synthetase (SerRS) starts this biosynthesis and matches the tRNA^{Sec} (SELC) with a serine and the tRNAs^{Ser}, therefore the focus of this study is on SerRS of *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) and tRNAs^{Ser} and SELC interactions, with fluorescence anisotropy technique to determine dissociation constants. Three selenoproteins, namely SelT, SelK and SelTryp, besides the route of selenocysteine synthesis there be in *Kinetoplastidae*. DNA fragments that coding for these selenoproteins were subcloned in 28a and 29a to use into *Escherichia coli* (*E. coli*) cells. For SelK and SelTryp proteins, the expression protocol did not show an unsatisfactory result to continue the experiments. Many difficulties were encountered in studies with SelT protein, mainly in attempts to make it soluble. Our analyses revealed SelT was a membrane protein, therefore it could cause changes in some objectives and search for new strategies. It could be expressed and purified in chromatography. SEC-MALLS assays showed a stability of the protein-detergent complex. With *Tb*SerRS is possible to conclude that the organization of binding specificity of the enzyme with its ligands occurs increasingly: SelC>tRNA^{Ser7}>tRNA^{Ser3a}>tRNA^{Ser3b}. And selenoproteins in *T. brucei*, it is necessary for new constructions to SelK and SelTryp to continue the experiments trying to crystallize SelT, since protocol for obtaining the protein-detergent complex is assembled and stabilized

Keywords: Selenoproteins. Kinetoplastidae. Dissociation constant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O comportamento duplo do selênio.....	29
Figura 2 - Comparações dos aminoácidos L-cisteína e L-selenocisteína.....	32
Figura 3 - Mecanismo de inserção de Sec em procariotos.....	34
Figura 4 - Mecanismo proposto para a inserção de Sec em eucariotos	35
Figura 5 - Aminoacilação do tRNA por aaRSs.....	36
Figura 6 - Modelos da estrutura secundária do elemento SECIS de eucariotos	38
Figura 7 - Representação das várias maneiras que as proteínas podem se associar a membrana.....	40
Figura 8 - Representação da reação de marcação.....	52
Figura 9 - Resultado da purificação da proteína TbSerRS	54
Figura 10 - Espectros de dicroísmo circular dos tRNAs.....	55
Figura 11 - Espectro de fluorescência extrínseca dos tRNAs marcados.	55
Figura 12 - Curva da anisotropia de fluorescência.....	56
Figura 13 - Curva da anisotropia de fluorescência.....	57
Figura 14 - Curva da anisotropia de fluorescência.	57
Figura 15 - Curva da anisotropia de fluorescência.....	58
Figura 16 - Curva da anisotropia de fluorescência.....	59
Figura 17 - Representação esquemática das selenoproteínas de <i>T. brucei</i>	64
Figura 18 - Representação do mapa e sequência do vetor pUC57	65
Figura 19 - Ciclo da PCR utilizado para a amplificação das regiões codificadoras....	66
Figura 20 - Gráfico obtido das predições de estruturas secundárias.....	73
Figura 21 - Predições obtidas para a SelK.....	74
Figura 22 - Predições obtidas para a SelT.....	74
Figura 23 - Predições obtidas para a SelT pelo programa SignalP	75
Figura 24 - Verificação da amplificação dos genes selk, selt e seltryp de <i>T. brucei</i> ..	76
Figura 25 - Análise da reação de digestão dos DNAs plasmidiais.....	76
Figura 26 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição.....	77
Figura 27 - Análise da reação de PCR de colônia	77
Figura 28 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição.....	78
Figura 29 - Análise reação de PCR de colônia.....	78
Figura 30 - Análise da expressão da SelK em extratos de <i>E. coli</i>	79

Figura 31 - Análise da expressão da SelTryp em extratos de cepas <i>E. coli</i> BL21.....	80
Figura 32 - Esquema representativo da composição e funcionamento do SEC-MALLS.	92
Figura 33 - Probabilidade das regiões transmembrânicas	93
Figura 34 - Mapa do vetor pTZ57R.....	96
Figura 35 - Análise da expressão da SelT em extratos de <i>E. coli</i>	97
Figura 36 - A) Perfil cromatográfico em coluna de afinidade por níquel. B) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da SelT em coluna de afinidade.	98
Figura 37 – A) Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Superdex 200. B) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da proteína SelT em coluna de exclusão molecular.	99
Figura 38 - Análise da produção de anticorpos anti-SelT por western blot.....	100
Figura 39 - Análise da produção de anticorpos anti-SelT por western blot.....	101
Figura 40 - Espalhamento dinâmico de luz.....	103
Figura 41 - Análise da expressão da SelT em extratos de <i>E. coli</i>	104
Figura 42 - Análise da expressão da SelT em extratos de BL21 de <i>E. coli</i>	105
Figura 43 - Análise da expressão da SelT em extratos de C43 de <i>E. coli</i>	105
Figura 44 - Análise da purificação em resina de afinidade por níquel da proteína SelT	106
Figura 45 - A) Cromatograma referente à passagem da amostra pela coluna de exclusão molecular Superdex200. B) Análise da purificação na superdex da proteína SelT em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%.	107
Figura 46 - Passagem da proteína no SEC-MALLS.	108
Figura 47 - Verificação da amplificação do gene selt de <i>T. brucei</i> sem regiões transmembrânicas.....	110
Figura 48 - Análise do PCR de colônia.	110
Figura 49 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais.....	111
Figura 50 - Análise do padrão de digestão	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Famílias das Selenoproteínas.....	31
Tabela 2- Valores de Kd e frequência de ocorrência do tRNAs.	59
Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação de amplificação dos genes das selenoproteínas.....	65
Tabela 4 - Resumo das construções testadas em diferentes cepas de <i>E. coli</i>	68
Tabela 5 - Resumo das variações de agente indutor e temperatura nas cepas utilizadas para expressão da proteína SelK.....	71
Tabela 6 - Resumo das variações de agente indutor e temperatura nas cepas utilizadas para expressão da proteína SelT.....	71
Tabela 7 - Resumo das variações de agente indutor e temperatura nas cepas utilizadas para expressão da proteína SelTryp.	71
Tabela 8 - Lista de tampões utilizados em testes com a proteína SelK.....	72
Tabela 9 - Tabela das porcentagens obtidas na análise comparativa dos códons raramente utilizados na expressão em <i>E. coli</i>	73
Tabela 10 - Massas moleculares das proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado no experimento de gel nativo.....	84
Tabela 11 - Proporções utilizadas para tentativas de formação de proteolipossomas de DPPC e SelT.....	88
Tabela 12 - Proporções utilizadas para tentativas de formação dos lipossomas de DPPC.....	88
Tabela 13 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene das selenoproteínas.....	94

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

aaRS – Aminoacil-tRNA sintetase

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – albumina sérica bovina

CD – Dicroísmo circular

Cys – Cisteína

dATP – Adenina desoxirribosídeo trifosfato

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

DLS - Diamond Light Source

DDM - n-Dodecyl- β -D-Maltoside

DM - n-Decyl- β -D-Maltopyranoside

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleosídeos trifosfatados

D.O. – Densidade ótica

DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina

DTT – Ditioneitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etileno diamino tetra acético

EFSec - Fator de alongação de tradução para inserção de selenocisteína em eucariotos

Fos-Choline-12 - n-Dodecylphosphocholine

FNIC - Food and Nutrition Information Center

g- Gravidade

GPx -Glutathione peroxidase

His – Histidina

IPTG – Isopropil β - D- tiogalactopiranosídeo

Ipar - Intensidade de luz polarizada com polarizadores emparalelos

Iper- Intensidade de luz polarizada com polarizadores perpendiculares

kDa – QuiloDalton

LB – Meio de cultura Luria Bertani

L. major – *Leishmania major*

LDAO - Lauryldimethylamine N-Oxide

Mg⁺² – Íon magnésio

mRNA – RNA mensageiro

MPL – Membrane Protein Laboratory

MW – Massa molecular

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato de sódio

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PSTK – Fosfoseril-tRNA sintetase

RCaH - Research Complex

RDA - Recommended Dietary Allowance

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAi – Interferência de RNA (RNA interference)

RNAse– Ribonuclease

SBP 1 e SBP2 – Proteínas ligadoras à SECIS (SECIS Binding Protein)

SEC-MALLS - Cromatografia de exclusão molecular acoplada à um detector multiangular de dispersão de luz SDS – Detergente dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Se – Selênio

Sec – Aminoácido selenocisteína

SECIS – Sequência de inserção a selenocisteína

SelA - Selenocisteína sintase

SelB - Fator de alongação de tradução para inserção de selenocisteína em procariotos

SELC - RNA transportador específico para a incorporação de Sec

SELD – Selenofosfato sintetase

SelK – Selenoproteína K

SepSecS - Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase

SelT - Selenoproteína T

SelTryp – Selenoproteína *Tryp*

SerRS – Seril-tRNA sintetase

TAE – Tampão de eletroforese composto por Tris acetato e EDTA

T. brucei – *Trypanosoma brucei*

Tris – Hidroximetil-aminometano

tRNA – RNA transportador

Trx - Tiorredoxina

UTR – Região não traduzida (Untranslated Region)

VC - Volumes de coluna

Xgal – Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Sumário

Capítulo 1 Selênio, a via de incorporação do aminoácido Selenocisteína e as Selenoproteínas.....	27
1 Introdução.....	29
1.1 Selênio.....	29
1.2 Selenoproteínas.....	30
1.3 Selenocisteína e sua inserção.....	32
1.3.1 As Aminoacil-tRNA Sintetases (aaRSs) e a Seril-tRNA Sintetase (SerRS)	35
1.4 Elemento SECIS	38
1.5 Selenoproteínas em <i>Kinetoplastidae</i>	38
1.5.1 Selenoproteína <i>Tryp</i> (<i>SelTryp</i>).....	39
1.5.2 Proteínas de membrana.....	40
1.5.3 Selenoproteína K (<i>SelK</i>)	41
1.5.4 Selenoproteína T (<i>SelT</i>)	42
Capítulo 2 Objetivos e Justificativas do Trabalho	44
2 Objetivos e Justificativas do Projeto.....	46
Capítulo 3 A proteína Seril-tRNASintetase.....	48
3.1 Materiais e Métodos.....	50
3.1.1 Expressão e purificação da proteína <i>TbSerRS</i>	50
3.1.2 Amplificação, transcrição <i>in vitro</i> e dicroísmo circular dos tRNAs (Ser-tRNA ^{Sec} e <i>SelC</i>).....	50
3.1.3 Anisotropia de Fluorescência.....	51
3.2 Resultados e Discussões	53
3.2.1 Expressão e purificação da proteína Seril-tRNA Sintetase.....	53

3.2.2 Amplificação, transcrição <i>in vitro</i> e dicroísmo circular dos tRNAs (Ser-tRNA ^{Sec} e SelC).....	54
3.2.3 Anisotropia de Fluorescência	55
Capítulo 4 As Selenoproteínas de <i>Trypanosoma brucei</i>	61
4.1 Materiais e Métodos	63
4.1.1 Análise das sequencias em programas de predições.....	63
4.1.2 Amplificação das regiões que codificam para as proteínas SelK, SelT e SelTryp.....	63
4.1.3 Subclonagem das regiões que codificam para as selenoproteínas SelK, SelT e SelTryp em vetores pET (28a e 29a).....	67
4.1.4 Expressão das proteínas SelK, SelT e SelTryp	69
4.1.4.1 Cepas de Expressão	69
4.1.4.1 a) BL21 (DE3).....	69
4.1.4.1 b) Rosetta (DE3).....	69
4.1.4.1 c) BL21 (DE3) pLysS	70
4.1.4.1 d) Arctic Express (DE3) pRare.....	70
4.2 Resultados e discussão	72
4.2.1 Análise das sequencias em programas de predições.....	72
4.2.2 Amplificação das regiões que codificam para as proteínas SelK, SelT e SelTryp.....	75
4.2.3 Subclonagem das regiões que codificam para as selenoproteínas SelK, SelT e SelTryp em vetores pET (28a e 29a).....	76
4.2.4 Expressão da proteína SelK.....	79
4.2.4 Expressão da proteína SelTryp	79
4.2.5 Expressão e purificação da proteína SelT	80
Capítulo 5 A Selenoproteína T (SelT) de <i>Trypanosoma brucei</i>	81
5.1 Materiais e Métodos	83

5.1.1	Expressão e purificação da proteína SelT.....	83
5.1.2	Estudo do estado de oligomerização da SelT através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes).....	84
5.1.3	Ensaio cristalográfico da proteína SelT.....	85
5.1.4	Produção de anticorpos policlonais	85
5.1.5	Western blot	86
5.1.6	Preparo de extrato protéico de <i>T. brucei</i>	86
5.1.7	Experimentos com proteolipossomas	87
5.1.7 a)	Formação de proteolipossomas	87
5.1.7 b)	Formação de lipossomas	88
5.1.7 c)	Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	89
5.1.8	Estágio no Membrane Protein Laboratory.....	90
5.1.8 a)	Alteração da Cepa de expressão.....	90
5.1.8 b)	Testes de detergentes para solubilização.....	91
5.1.8 c)	Purificação e ensaios no SEC-MALLS	91
5.1.9	Experimentos com SelT sem regiões transmembrânicas	93
5.1.9 a)	Amplificação.....	93
5.1.9 b)	Clonagem no vetor pTZ57R.....	95
5.1.9 c)	Subclonagem em vetores pET (28a e 29a)	97
5.2	Resultados e Discussões.....	97
5.2.1	Expressão e purificação da proteína SelT.....	97
5.2.2	Estudo do estado de oligomerização da SelT através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes).....	99
5.2.3	Ensaio cristalográfico da proteína SelT.....	99
5.2.4	Produção de anticorpos policlonais	100

5.2.5 Western blot.....	100
5.2.6 Preparo de extrato protéico de <i>T. brucei</i>	101
5.2.7 Experimentos com proteolipossomas.....	101
5.2.7 a) Formação de proteolipossomas	102
5.2.7 b) Formação de lipossomas.....	102
5.2.8 Estágio no Membrane Protein Laboratory	103
5.2.8 a) Alteração da Cepa de expressão	103
5.2.8 b) Testes de detergentes para solubilização	104
5.2.8 c) Purificação e ensaios no SEC-MALLS	106
5.2.9 Experimentos com SelT sem regiões transmembrânicas	109
5.2.9 a) Amplificação da região que codifica para a proteína SelT sem regiões transmembrânicas	109
5.2.9 b) Clonagem no vetor pTZ57R	110
5.2.9 c) Subclonagem em vetores pET (28a e 29a)	111
Capítulo 6 Conclusões e perspectivas futuras.....	114
6 Conclusões e perspectivas futuras	116
Referências	120
Anexo 1 – Boneco do artigo para submissão e publicação.....	128
Anexo 2 – Destaques em mídias da parceria IFSC/USP - MPL/Diamond	148

Capítulo 1 Selênio, a via de incorporação do aminoácido Selenocisteína e as Selenoproteínas

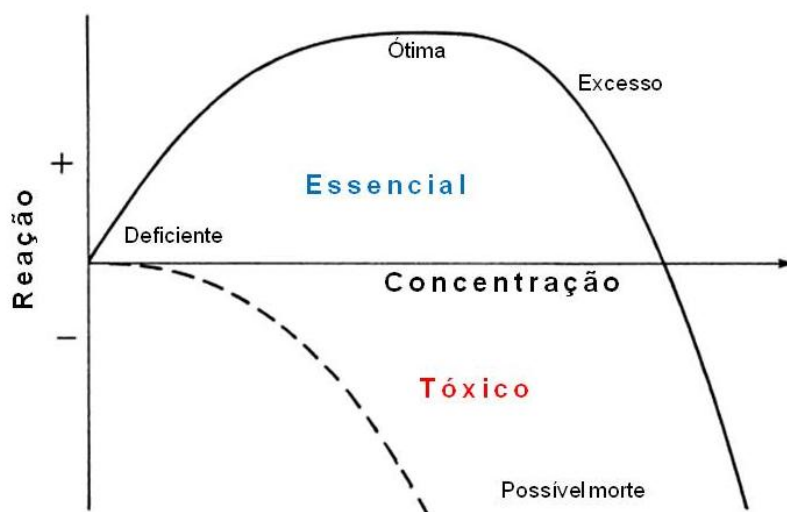
Neste capítulo introdutório serão apresentados os principais tópicos sobre o elemento selênio, desde sua descoberta até a via biossintética que permite sua incorporação em proteínas como Selenocisteína. Além disso, serão expostas as selenoproteínas de *Trypanosoma brucei*, foco desse trabalho.

1 Introdução

1.1 Selênio

O selênio é um micronutriente que apresenta comportamento duplo para a saúde humana (figura 1). Foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius e permaneceu durante décadas sendo considerado um elemento altamente tóxico e contaminante. Porém, na metade do século XX estudos revelaram seus benefícios para a vida na Terra.¹⁻⁴ O selênio foi identificado como elemento essencial, primeiramente em bactérias, em 1954, e posteriormente, em 1957 em mamíferos.⁵

Figura 1 - O comportamento duplo do selênio. A resposta biológica depende da concentração do nutriente que pode ser essencial (linha contínua) ou prejudicial (linha tracejada). Nota-se que dietas deficientes de selênio, a resposta biológica é prejudicial, podendo levar até a morte do indivíduo. Dietas com concentrações ótimas de selênio causam uma reação positiva para o organismo, sendo essencial e dietas com excesso de selênio, causam reação negativa, tornando-se um micronutriente tóxico.



Fonte: Adaptada de DEKKER.⁶

Dietas escassas em selênio podem causar dores musculares, fadiga, fraqueza muscular, falta de concentração, doença de Keshan que é uma cardiopatia potencialmente fatal e bastante incidente em crianças e a doença de Kashin-Beck, uma osteoartrite endêmica. Dietas com concentrações ideais de selênio, sendo o valor de ingestão deste elemento segundo a tabela de RDA (Recommended Dietary Allowance) para homens e mulheres de 55 μg (ou 0,7 μmol) por dia ¹², contribuem para aumento na resistência do sistema imunológico, diminuição dos riscos de

doenças cardiovasculares, atua como agente preventivo de câncer e ajuda na redução do envelhecimento. E finalmente, dietas com excesso de selênio podem causar distúrbios gastrointestinais e neurológicos além de falência renal.^{4,7,8,12}

Segundo a Food and Nutrition Information Center (FNIC), a dieta recomendada de selênio é baseada na quantidade necessária para maximizar a atividade da enzima Glutathione peroxidase (GPx), uma selenoproteína que protege o DNA contra processos oxidativos.⁹⁻¹¹ A principal via de assimilação deste micronutriente na dieta ocorre pela ingestão de alimentos ricos em selênio e dentre eles os que possuem maior teor são os grãos (castanha-do-Pará, trigo e arroz), carnes, frutos do mar, macarrão e pães.¹

O selênio presente na natureza pode ser encontrado em forma orgânica e inorgânica. Na forma orgânica, ocorre principalmente incorporado à proteínas que contêm os aminoácidos selenometionina e selenocisteína.¹³ Esta incorporação pode ocorrer através da adição pós-traducional do composto como um cofator dissociável, sendo que esta forma rara de selênio associado às proteínas é encontrada apenas em proteínas bacterianas que também contêm molibdênio. Entretanto, sua principal forma de incorporação em proteínas é sob a forma do 21º aminoácido, selenocisteína (Sec, U) incorporado co-traducionalmente ao polipeptídeo nascente em posições específicas do códon UGA, que normalmente é reconhecido como códon de parada ("stop-códon").¹⁴⁻¹⁸

1.2 Selenoproteínas

Selenoproteínas correspondem ao grupo de proteínas que contêm o aminoácido selenocisteína presente em sua cadeia polipeptídica. Tais proteínas são encontradas nos três domínios de vida: Eubacteria, Archae e Eukaria, sendo proteínas essenciais para a maioria dos organismos superiores. Porém, nem todas as espécies desses domínios possuem selenoproteínas, como é o caso de plantas superiores e fungos.⁸ As selenoproteínas foram descobertas através de abordagens de bioinformática e comprovadas por técnicas de biologia molecular. Na tabela 1 encontra-se a lista de suas famílias.

Tabela 1- Famílias das Selenoproteínas. A esquerda, selenoproteínas presentes em vertebrados ou em eucariotas unicelulares destacadas por caixas sombreadas em verde e à direita, selenoproteínas encontradas em procariontes.

		Nome da Proteína
Vertebrados		15 kDa Selenoprotein (Sep15)
		Sep15
		Iodothyronine Deiodinase (Dis)
		Selenoprotein H (SelH)
		Selenoprotein I (SelI)
		Selenoproteína J (SelJ)
		Selenoprotein N (SelN)
		Selenoprotein O (SelO)
		Selenoprotein P (SelP)
		Methionine-R-Sulfoxide Reductase (MsrB1, SelR, SelX)
		Selenoprotein S (SelS)
		Selenoprotein V (SelV)
		Selenophosphate Synthetase (SPS)
	Eucariotos unicelular	
		Selenoprotein K (SelK)
		Selenoprotein M (SelM)
		Selenoprotein T (SelT)
		Selenoprotein U (SelU)
		Selenoprotein W (SelW)
		Thioredoxin Reductases (TRs)
		Methionine-S- Sulfoxide Reductases (MsrA)
		Protein Disulfide Isomerase (PDIs)
Procaríotos		
		Proline Reductase (PrdB)
		Prx-like protein
		Thioredoxin (Trx)
		Formate dehydrogenase alpha chain (fdhA)
		Glycine reductase selenoprotein A (grdA)
		Glycine reductase selenoprotein B (grdB)
		AhpD-like protein
		Arsenate Reductase
		Molybdopterin biosynthesis protein (MoeB)
		Glutaredoxin (Grx)
		DsbA-like protein
		Glutathione S-transferase (GST)
		Thiol-disulfide isomerase-like protein
		CMD domain-containing protein
		Rhodanase-related sulfurtransferase
		OsmC-like protein
		DsrE-like protein
		DsbG-like protein
		HesB-like protein
		Formylmethanofuran dehydrogenase (FMDH)
	Methylviologen-reducing hydrogenase	
	Coenzyme F420-reducing hydrogenase	
	Heterodisulphide reductase	

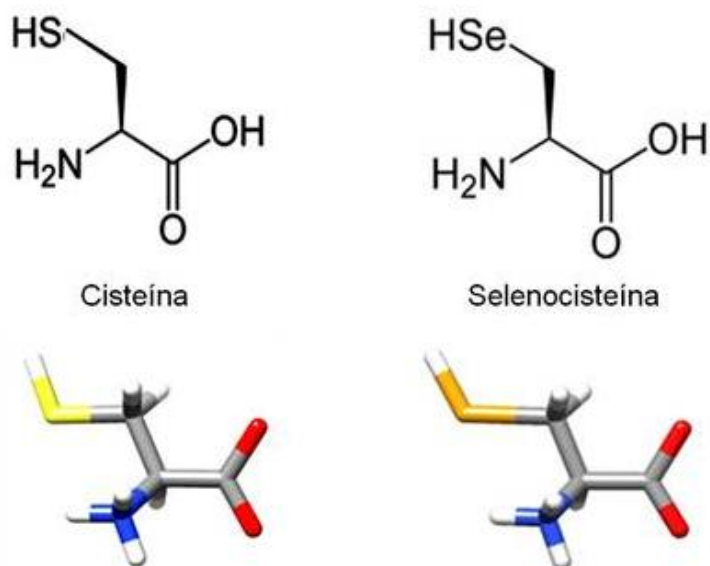
Fonte: GLADYSHEV;KRYUKOV;ZHANG.¹⁹⁻²¹

A maioria das selenoproteínas que tem função conhecida atua como enzimas de oxidação e o resíduo selenocisteína esta presente no seu sítio ativo. As selenoproteínas de mamíferos podem ser classificadas em dois grupos por conterem um ou mais resíduos do aminoácido selenocisteína (Sec) em sua cadeia polipeptídica.¹⁹ No primeiro grupo, Sec está em um sítio muito próximo à região C-terminal da proteína e no outro grupo, Sec está localizado próximo ao N-terminal.^{8, 22, 23} A partir de um estudo denominado de Selenoproteoma, realizado pelo grupo de Vadim Gladishev em 2009, foram identificados 25 genes de selenoproteínas em humanos e três genes em Kinetoplastidae, sendo estas as selenoproteínas T, K e *Tryp* (SelT, SelK e Sel*Tryp* respectivamente)²³ alvos deste trabalho.

1.3 Selenocisteína e sua inserção

O aminoácido selenocisteína (Sec) é análogo à cisteína (Cys), diferenciando-se por um átomo de selênio (Se) ao invés do enxofre (S), o que o torna a forma mais ativa do elemento selênio nos sistemas biológicos (figura 2).^{24,25} Estes dois elementos possuem propriedades muito semelhantes tais como: eletronegatividade, estado de oxidação e raio atômico. Uma grande diferença é o valor do pKa, onde o de Sec é de 5,2 para selenolato e o de Cys é de 8,3 para o tiolato, o que implica no estado de protonação das duas cadeias laterais destes aminoácidos quando presentes na forma livre em uma solução aquosa. Assim, a selenocisteína é mais facilmente oxidada do que a cisteína, possuindo potencial para reparar danos oxidativos e atuando em reações de oxidorredução, uma das principais funções das selenoproteínas.^{18,26}

Figura 2 - Comparações dos aminoácidos L-cisteína e L-selenocisteína. Primeiramente a representação em 2D e logo abaixo em 3D. A região em vermelho simboliza o oxigênio, azul o nitrogênio, amarelo o enxofre e laranja o selênio.



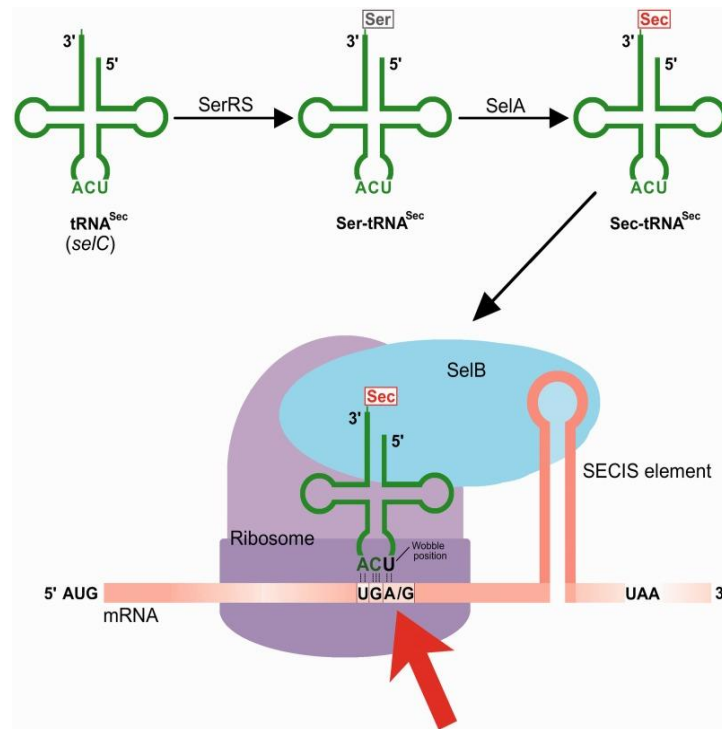
Fonte: Adaptada de COSTA.²⁷

Aspectos que tornam Sec um aminoácido único são: o códon para sua inserção e o fato de ser uma exceção ao paradigma de Crick. O códon UGA é geralmente um sinal de interrupção da síntese proteica, ou seja, um códon de terminação. Porém, nas selenoproteínas este é, juntamente com toda uma

maquinaria envolvida, um códon para a inserção do aminoácido Sec. Segundo o paradigma de Crick, todo aminoácido geneticamente codificado possui uma aminoacil-tRNA sintetase, enzima que faz a "leitura" do código genético, seleciona o correto aminoácido e o para com seu tRNA cognato. Para que isto ocorra é necessário ter aminoácidos sintetizados livres na célula, mas Sec torna-se a única exceção por não possuir uma biossíntese para sua formação na forma livre e também não possuir uma aminoacil-tRNA sintetase específica.^{28,29}

Apesar da biossíntese de selenocisteína ser um processo evolucionariamente conservado, existem algumas diferenças relevantes no mecanismo de síntese entre organismos procariotos e eucariotos. Em procariotos são requeridas: Selenocisteína Sintase (SelA), Fator de Elongação de Selenocisteína (SelB), Selenofosfato Sintetase (SelD), Seril-tRNA^{ser} Sintetase (SerRS) e também um tRNA próprio denominado tRNA de Inserção de Selenocisteína (SelC). O reconhecimento do códon UGA como inserção para Sec, dá-se através de uma região em forma de grampo no próprio mRNA denominado de elemento SECIS ("Seleno Cystein Insertion Sequence") e a aminoacilação do tRNA^{Sec} é realizada pela enzima SerRS.^{24,30} A primeira enzima participante da via é então a SerRS que vai aminoacilar o tRNA^{Sec} que em seguida é convertido para selenocisteil-tRNA^{Sec} pela SelA. Paralelamente a isso, SelD catalisa a formação de um composto de selênio reativo, o selenofosfato, que é utilizado na via. SelB vai fazer o reconhecimento do elemento SECIS e se ligar ao tRNA e ao ribossomo para que ocorra a inserção do aminoácido na posição correta. Esta inserção encontra-se resumida na figura abaixo.

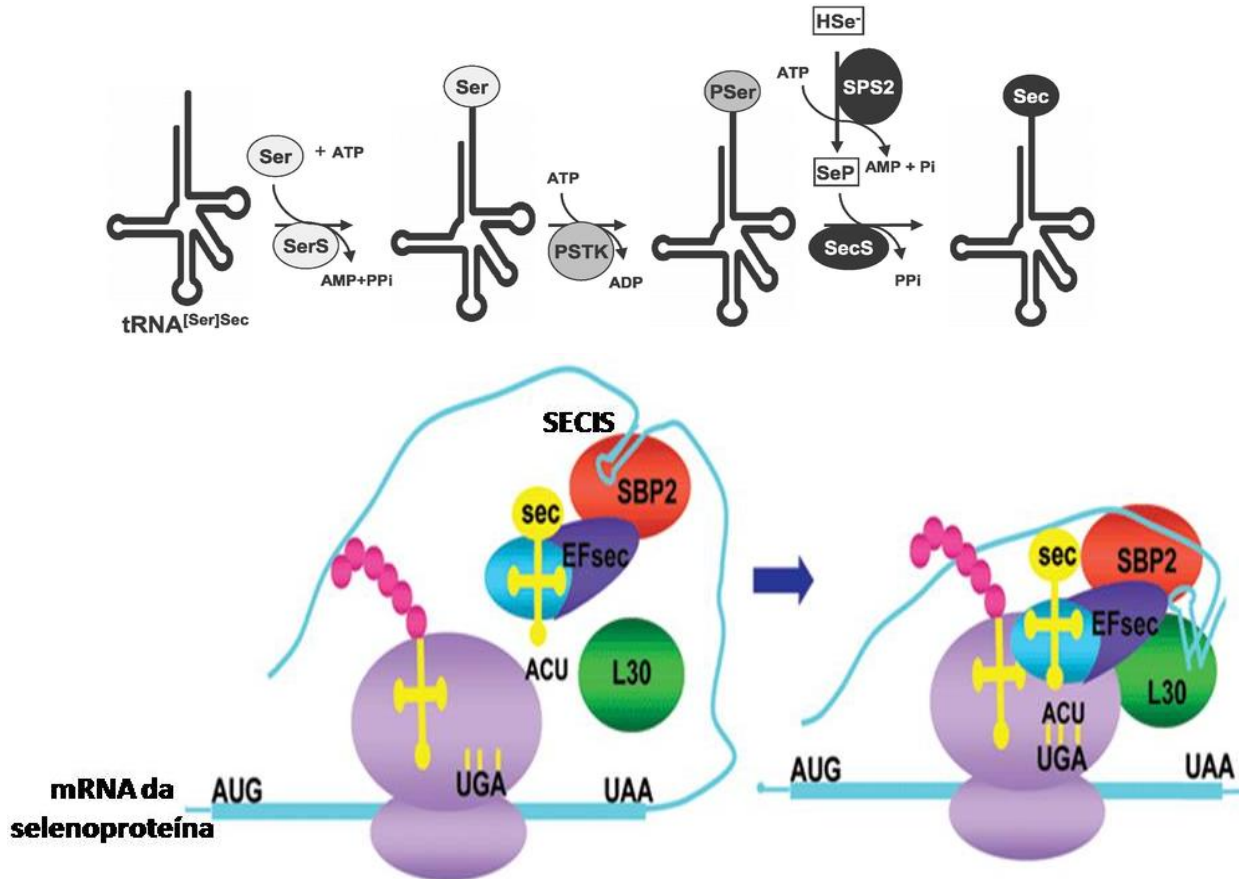
Figura 3 - Mecanismo de inserção de Sec em procariotos. Em roxo representando o ribossomo, tRNAs em amarelo, em rosa o peptídeo nascente e os códons em preto. SELB é mostrada como a porção oval em vermelho e azul, e em azul claro em forma de grampo o elemento SECIS.



Fonte: Adaptada de XU.³²

Já a elucidação da biossíntese de selenocisteína em eucariotos embora tenha tido grandes avanços na última década, necessita ainda de mais estudos para sua total compreensão. A síntese também se inicia com a aminoacilação do tRNA^{Sec} com um resíduo de serina pela Seril-tRNA Sintetase (SerRS) seguida de fosforilação do Ser-tRNA^{Sec} pela Fosfoseril-tRNA Kinase (PSTK) e a síntese de Sec pela Selenocisteína-Selenofosfato Sintetase (SecSepS). Duas Senelofosfato Sintetases (SPS1 e SPS2) contribuem para a conversão de selenito e ATP para forma selenofosfato. Outros fatores como a proteína SECp43, o fator de alongação EFSec, o SelC e o elemento SECIS fazem parte desta maquinaria.^{30,32} A figura 4 representa resumidamente este mecanismo.

Figura 4 - Mecanismo proposto para a inserção de Sec em eucariotos. Em roxo novamente representando o ribossomo, tRNAs em amarelo, em rosa o peptídeo nascente, azul claro em forma de grampo representa o elemento SECIS e os códons em preto. Outras proteínas que fazem parte desta via estão representadas vermelho, verde e azul escuro.

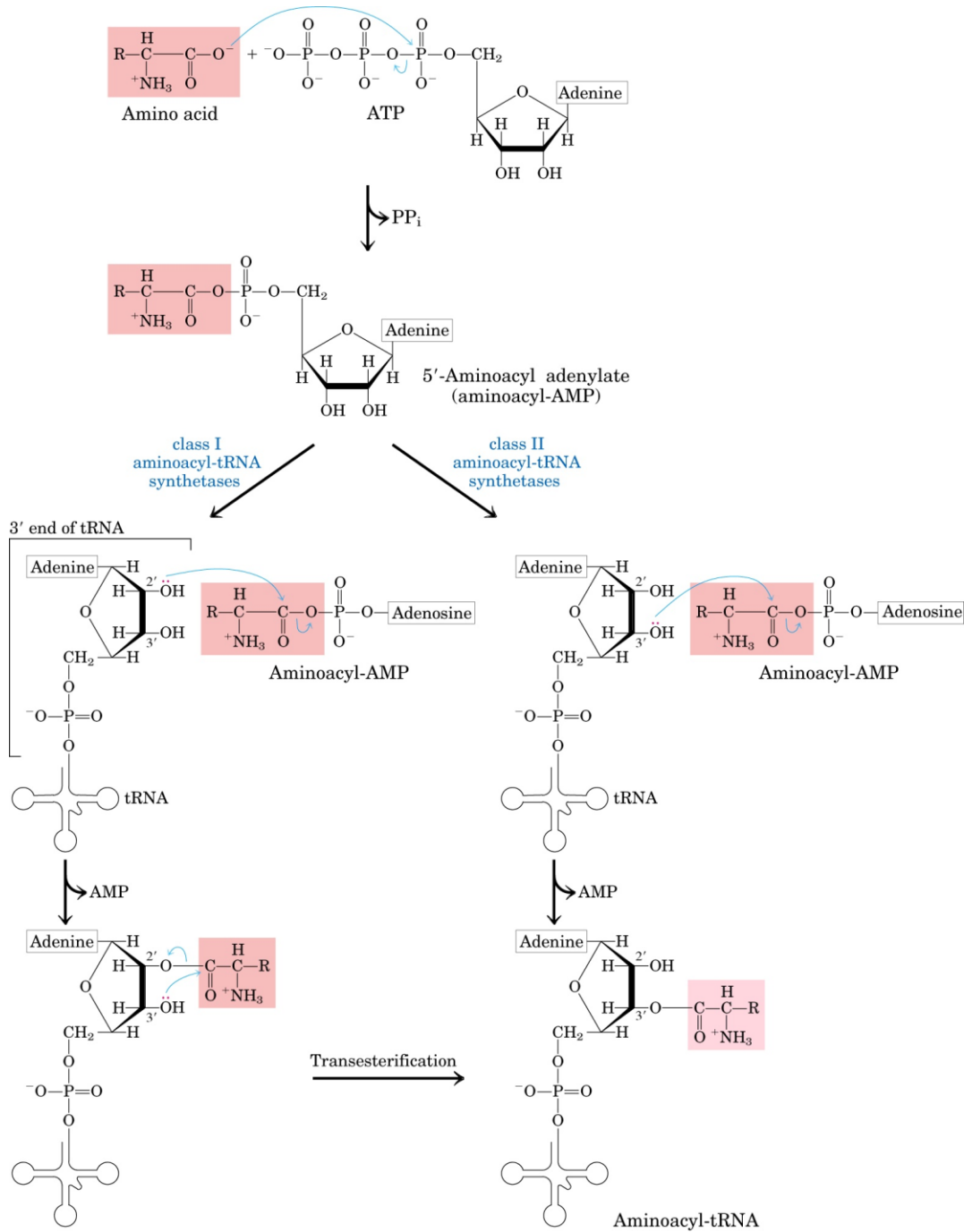


Fonte: Adaptada de BERRY.³¹

1.3.1 As Aminoacil-tRNA Sintetases (aaRSs) e a Seril-tRNA Sintetase (SerRS)

Compondo uma família de enzimas que asseguram a correta ligação entre um aminoácido e seu tRNA correspondente gerando um conjunto de tRNAs aminoacilados, as aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs) são fatores essenciais para o processo de síntese protéica.³³ Estão classificadas em dois grupos devido às diferenças na reação de aminoacilação (figura 5).

Figura 5 - Aminoacilação do tRNA por aaRSs, diferenciando a classe I (à esquerda), onde a aminoacilação ocorre no 2'-OH da classe II (a direita) com a aminoacilação ocorrendo no 3'-OH.



A classe I aminoacila o 2'-OH da ribose e possui dois motivos de sequências altamente conservados, já a classe II aminoacila o 3'-OH da ribose e apresenta três motivos de sequências altamente conservados. A reação de aminoacilação ocorre em duas etapas: primeiro o ATP reage com o aminoácido formando aminoacil-adenilato e difosfato e, posteriormente, em uma nova reação o aminoácido ativado é transferido para o tRNA para formar o aminoacil-tRNA e AMP. Nestas reações o aminoácido é ligado ao tRNA por uma ligação de alta energia e essa energia irá impulsionar a formação da ligação peptídica.³⁴

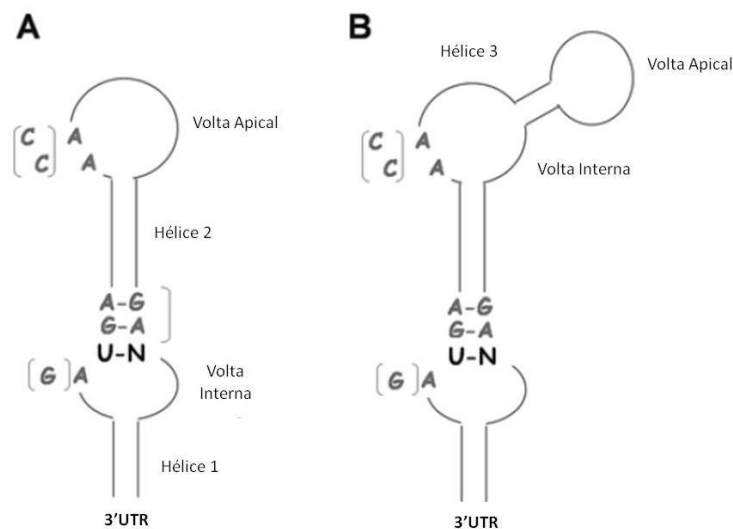
Uma diferença fundamental entre as classes é que elas interagem com o tRNA por lados opostos. As aaRSs de classe I reconhecem a sequência anticódon do tRNA para inserir o respectivo aminoácido, geralmente hidrofóbico, enquanto que as aaRSs de classe II não interagem com a região anticódon. A configuração estrutural do tRNA é mais importante do que a própria sequência, sendo que os principais pontos de interação ocorrem com a região anticódon e região acceptora. É devido a este fato que uma aaRS pode reconhecer mais de um tRNA para um dado aminoácido.³⁵

A função das aaRSs é um passo crucial para manter a fidelidade na biossíntese de proteínas, pois a formação do aminoacil-tRNA ocorre com alto grau de especificidade. Por este motivo estas enzimas tornam-se relevantes alvos de estudo desta interação proteína-RNA e, inserida neste grupo de sintetases, encontra-se a Seril-tRNA Sintetase (SerRS) que pertence à classe II das aminoacil-tRNA sintetases. SerRS aminoacila o tRNA^{Sec} com serina, sendo este o primeiro passo para a incorporação de selenocisteína em proteínas e também aminoacila os tRNAs carregadores específicos de serina (tRNA^{Ser}).³⁶ Existem cinco homólogos para o tRNA^{Ser}, com quatro diferentes anticódons (AGA, CGA, UGA e GCU) que codificam para seis códons de serina e estão divididos em dois grupos o que torna as SerRSs uma das poucas sintetases não - específicas no reconhecimento do anti-códon.³⁷

1.4 Elemento SECIS

Localizado na região 3' do mRNA, o elemento SECIS é uma estrutura em alça que auxilia as demais enzimas da via no reconhecimento do códon UGA e na inserção da selenocisteína. Essa estrutura apresenta quatro pareamentos não-Watson-Crick consecutivos, 2 voltas e 2 hélices. Em procarionotos, o elemento SECIS encontra-se seguido da sequência traduzida do mRNA, antes do códon de terminação para o final da tradução.³⁸ Já em arqueobactérias e eucariotos o SECIS está localizado dentro da região não-traduzida (3' UTR), que pode variar de 25 pares de base até kilobases de distância do códon de terminação da tradução.^{24,39,40} Em eucariotos existem 2 tipos de elemento SECIS, tipo I e tipo II que diferem apenas pela presença de uma terceira hélice e uma volta apical menor no tipo II (figura 6).

Figura 6 - Modelos da estrutura secundária do elemento SECIS de eucariotos. A) SECIS tipo I e B) SECIS tipo II.



Fonte: Adaptada de PAPP.⁴⁰

1.5 Selenoproteínas em *Kinetoplastidae*

Kinetoplastidae é uma ordem da família *Trypanosomatidae* que é considerada de grande importância médica e econômica, pois espécies dessa família provocam

doenças mutilantes, incapacitantes ou mortais. Exemplos dessas doenças em humanos são: Tripanossomíase Africana humana, popularmente conhecida como doença do sono, causada por infecção com *Trypanosoma brucei*; Doença de Chagas, causada por infecção com *Trypanosoma cruzi* e diferentes formas de Leishmanioses, causadas por infecção com diferentes espécies de *Leishmania*. Os parasitas são caracterizados por possuir, além das organelas características do domínio eucarioto, uma única mitocôndria, que se ramifica por toda a célula e uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário assume. A mitocôndria apresenta um DNA que se organiza na forma de minicírculos (30% do DNA total da célula) e maxicírculos. Esse DNA se concentra em uma determinada região da mitocôndria, denominada de cinetoplasto, motivo do nome dado a este grupo.⁵⁵

Kinetoplastidae (*Trypanosoma* e *Leishmania*) possui o selenoproteoma pequeno, além da biossíntese de Sec ser pouco explorada. Por meio de buscas computacionais e análise de transcritos, nosso grupo identificou homólogos de tRNA^{[Ser]^{Sec}} em todas as espécies de Kinetoplastida que possuem o genoma sequenciado e disponível²⁴ e um trabalho denominado selenoproteoma de Lobanov et. al., identificou três selenoproteínas em Kinetoplastida.²³ Duas delas, possuem identidade com famílias de selenoproteínas já descritas (SelK e SelT) e a terceira denominada *SelTryp*, representa uma nova família com indícios de ser uma selenoproteína específica de *Kinetoplastidae*. Esta via foi demonstrada ser essencial para a proteção das células de *Kinetoplastidae* a condições de estresse oxidativo, o que as tornam um alvo interessante para estudos.⁴¹

1.5.1 Selenoproteína *Tryp* (*SelTryp*)

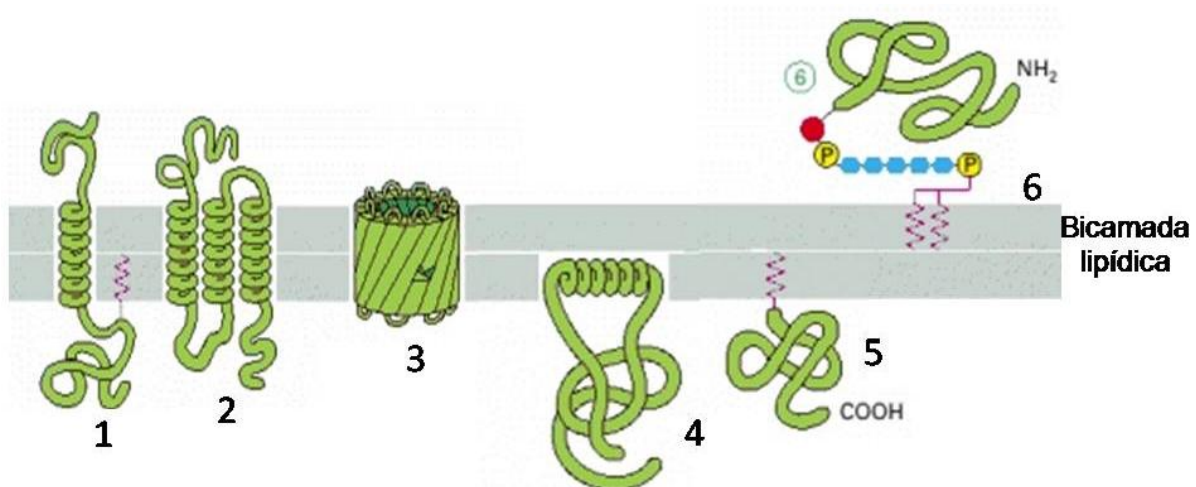
SelTryp é atualmente a maior das selenoproteínas de *T. brucei*, com massa molecular de aproximadamente 86kDa e com 779 resíduos de aminoácidos na sua cadeia polipeptídica, estando a Sec na posição 777^a e dentro de um motivo CxxU, frequentemente encontrado em selenoproteínas com função redox, sugerindo ser esta a função para a proteína.⁴¹ Análises da sua sequência revelaram uma distante homologia com selenoproteínas da família rodanase, caracterizadas pelo domínio

composto por 6 resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo com o motivo CXGGXR, sugerindo que *SelTryp* pertença à subfamília YceA. Essa subfamília é caracterizada por possuir um domínio descrito como transferases de enxofre, presente em enzimas que catalisam a transferência de um átomo de enxofre de tiosulfato para cianeto.⁴⁷ Também foi identificado que a região C-terminal não possui estrutura secundária definida, o que torna flexível a região onde a Sec se encontra.⁴¹ *SelTryp* é uma selenoproteína encontrada somente em *Kinetoplastidae* o que a torna específica do filo, mas com função indefinida até o momento.

1.5.2 Proteínas de membrana

Formadas por uma bicamada lipídica, as membranas biológicas são compostas também por proteínas. Estas, por sua vez, podem exercer várias funções como: atuar em mecanismos de transporte, funcionar como receptores de membranas, favorecer a adesão de células em tecidos, dentre outras. As proteínas de membrana se associam às membranas de diferentes maneiras e por isso podem ser classificadas em: integrais (integralmente conectadas à membrana celular) ou periféricas (ligadas fracamente à membrana, muitas vezes ancoras por ligações de hidrogênio),^{35,48,49} conforme mostra a figura abaixo.

Figura 7 - Representação das várias maneiras que as proteínas podem se associar a membrana. 1, 2 e 3 – proteínas integrais de membrana; 4, 5 e 6 – proteínas periféricas de membrana.



Dentro deste contexto, no decorrer do trabalho, descobrimos que a *TbSelK* e *TbSelT* caracterizam-se por ser proteínas de membrana, possuindo 1 e 3 três regiões transmembrânicas, respectivamente, o que as inserem neste exímio grupo.

1.5.3 Selenoproteína K (SelK)

SelK é uma pequena proteína que, em humanos foi predita com localização celular em retículo endoplasmático e membrana plasmática (NP_067060.2), possuindo 94 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 11kDa. Estudos apontam que ela pode estar envolvida no estresse do retículo endoplasmático, na regulação da homeostase no retículo endoplasmático diretamente relacionada na degradação de proteínas mal-enoveladas, porém sua função biológica ou bioquímica ainda não se encontra completamente determinada.⁴² Na estrutura de SelK, a Sec é o 61º aminoácido presente no domínio C- terminal, que encontra-se voltado para o citosol. O domínio N-terminal de SelK é curto e localizado no lúmen do retículo endoplasmático. Sabe-se que a cauda citosólica é ricamente composta de aminoácidos positivamente carregados, como glicina e prolina, o que seria um provável sítio de ligação para proteínas negativamente carregadas.⁴³ Já em *T. brucei*, SelK possui massa molecular aproximada de 10kDa e 89 resíduos de aminoácidos, sendo a Sec o 88º aminoácido: predições de localização celular mostram um motivo transmembrânico presente nesta proteína e ela apresenta um motivo composto do tipo CXXXU (um aminoácido cisteína, seguido de três aminoácidos quaisquer, seguidos do aminoácido selenocisteína) .

Muitos esforços visando decifrar a função da SelK tem sido feitos, tais como os estudos que demonstraram a diminuição da sensibilidade ao tratamento com peróxido de hidrogênio, quando superexpressa em cardiomiócitos, porém SelK não possui motivos redox como aqueles encontrados em selenoproteínas com função antioxidante.⁴⁴ Em *Drosophila melanogaster* também não foram encontrados tais motivos, de modo que contribuam para o potencial antioxidante deste organismo.⁴⁵ Por outro lado, estudos recentes sugerem que SelK tenha um importante papel no sistema imunológico, devido à sua alta expressão em tecidos linfóides.⁴⁶ No entanto a selenoproteína K ainda permanece com sua função desconhecida.

1.5.4 Selenoproteína T (SelT)

Já a proteína SelT humana (NP_057359.2) possui localização celular predominantemente no complexo de Golgi, mas também ocorre no retículo endoplasmático e citosol. É uma proteína com 22kDa, 195 resíduos de aminoácidos e alguns estudos aponta que ela pode estar envolvida na regulação da homeostase de cálcio, porém função não está completamente determinada.⁴² Possui o motivo CXXU, o que sugere uma função redox a essa proteína, e um peptídeo sinal. Em humanos este peptídeo sinal contém 19 resíduos de aminoácidos que podem estar envolvidos no direcionamento desta para o retículo endoplasmático. Porém, SelT pode ser localizada na membrana plasmática, complexo de Golgi e retículo endoplasmático.⁵⁰ A SelT de *T. brucei* possui 259 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 29kDa e sua predição de localização celular indica um potencial sinal de exportação para o retículo endoplasmático. Nesta proteína, o resíduo de Sec está localizado no meio da sequência de aminoácidos, na posição 108.

Diante do panorama apresentado com a importância do micronutriente selênio na dieta humana, da sua presença na cadeia lateral do aminoácido selenocisteína, da diferenciada forma de incorporação deste aminoácido na cadeia polipeptídica de proteínas nascentes e das selenoproteínas encontradas no protozoário *T. brucei*, causador de doenças negligenciadas, vimos que estas selenoproteínas são alvos interessantes para estudos, porque, conhecendo-as melhor, poderemos contribuir para a descoberta de suas funções, sua importância para o parasita e também podem ser estudadas a fim de que possam se tornar alvos de fármacos para tais doenças.

Capítulo 2 Objetivos e Justificativas do Trabalho

Serão apresentados os objetivos, geral e específicos, e as justificativas que nos motivaram a realizar os trabalhos durante o doutoramento, realizando os estudos das interações da SerRS de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) com as isoformas do tRNA^{Ser} e investigando as três selenoproteínas em Kinetoplastidas identificadas: SelT, SelK e SelTryp.

2 Objetivos e Justificativas do Projeto

As atividades desenvolvidas nesse trabalho inserem-se nos objetivos do projeto de pesquisa FAPESP 06/55685-4 intitulado: Biossíntese de selenocisteína - Estudos moleculares e estruturais, onde o grupo trabalhou e tem trabalhado para desvendar e elucidar essa biossíntese. Nesse contexto, identificou-se homólogos de tRNA^{[Ser]^{Sec}} em todas as espécies de Kinetoplastida,²⁴ caracterizou-se a proteína Sela de *E. coli*, revolucionando o descrito até o momento na literatura,^{51,52} cristalizou-se a SPS de *T. brucei* e *L. major*,⁵³ validou-se essa biossíntese em Trypanosomas,⁵⁴ desvendaram-se algumas etapas na biossíntese em *Naegleria gruberi*,¹⁷ dentre outros trabalhos em andamento. Especificamente, os objetivos para essa tese foram realizar os estudos de interação da *TbSerRS* e seus ligantes (tRNAs)⁵⁵ e caracterizar asselenoproteínas *SelT*, *SelK* e *SelTryp* de *T. brucei*. O estudo da síntese de selenocisteínas e a sua incorporação co-traducional em fase a códons originalmente tidos como de terminação (UGA), é uma via complexa que envolve muitas características particulares, quando comparada aos outros aminoácidos. É válido ressaltar a grande importância metabólica das selenoproteínas, que apresentam atividades enzimáticas dependentes do átomo de selênio em seu sítio ativo. Considerando-se que *Kinetoplastidae* representa organismos eucariotos ancestrais, possuindo metabolismos e genomas (nuclear e de mitocôndria) incomuns, é de grande interesse o estudo comparativo entre as proteínas humanas e seus homólogos em *Kinetoplastidae* na descoberta dos mecanismos empregados na síntese e incorporação de selenocisteína. As selenoproteínas de *Kinetoplastidae* (*SelT*, *SelK* e *SelTryp*) possuem baixa identidade com homólogos de outros organismos, o que pode revelar adaptações ao metabolismo do parasito que se revelam interessantes do ponto de vista evolutivo e fisiológico.

Capítulo 3 A proteína Seril-tRNASintetase

Serão descritas neste capítulo as metodologias utilizadas para a obtenção da proteína *TbSerRS* e dos tRNAs estudados, além do emprego da técnica de anisotropia de fluorescência para determinação das constantes de dissociação bem como o preparo dos materiais a serem utilizados nessas técnicas. Por fim, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nestas etapas.

3.1 Materiais e Métodos

3.1.1 Expressão e purificação da proteína *TbSerRS*

Os protocolos para obtenção da proteína *TbSerRS* com elevado grau de pureza para, dessa forma, utilizá-la nos experimentos de interação com os tRNAs foram seguidos de acordo com descritos por Evangelista.⁵⁵

Resumidamente, o protocolo de expressão da proteína *TbSerRS* se dá pela adição de um pré-inóculo contendo cepas *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com a construção pET28a-serrs que foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seu respectivo antibiótico kanamicina [30µg/mL] à um novo tubo de LB+kanamicina, na proporção 1:100, onde este permanece sob agitação de 250rpm a 37° C até atingida uma densidade ótica ($D.O_{600nm}$) de aproximadamente 0.6. Adicionou-se 0,1mM do indutor IPTG ao tubo de cultura para início da expressão que se prolongou por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação.

Terminado o período de indução a cultura é centrifugada, o precipitado dissolvido em tampão e a lise celular é realizada pela adição de lizozima, choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e depois foi sonicação. Então é separada a fração solúvel da insolúvel, e a primeira é submetida a etapas de purificação. Essas etapas são: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia em coluna fenil-sefarose e coluna de afinidade por níquel. A verificação da purificação ocorre por análise de SDS-PAGE 15%.

3.1.2 Amplificação, transcrição *in vitro* e dicroísmo circular dos tRNAs (*Ser-tRNA^{Sec}* e *SelC*)

Para os procedimentos de amplificação, transcrição *in vitro* e ensaios de dicroísmo circular dos tRNAs foi seguido também o protocolo descrito por Evangelista⁵⁵ onde, resumidamente, os genes do SELC e isoformas dos *tRNA^{Ser}* foram amplificados a partir dos oligonucleotídeos correspondentes, que possuem uma região interna complementar de 20 nucleotídeos, além de uma seqüência

promotora T7 RNA polimerase. Os fragmentos amplificados foram purificados do gel de agarose 2% utilizando o “Kit Eppendorf Perfect Gel Cleanup” e a reação de transcrição in vitro dos tRNAs, que utiliza como DNA molde os genes obtidos acima, foi realizada utilizando o “Kit Megashortscript – Ambion” desenvolvido para transcrição de pequenas seqüências de RNA.

Os tRNAs transcritos foram purificados utilizando-se fenol/clorofórmio seguido por precipitação com etanol, ressuspendidos em água livre de RNase e o enovelamento tridimensional dos tRNAs foi realizado. Os tRNAs foram submetidos à técnica de dicroísmo circular para confirmação de sua forma ativa (correto enovelamento), pois o pareamento das bases do tRNA para formação da estrutura secundária é acompanhado pela mudança na elipsidade.

3.1.3 Anisotropia de Fluorescência

Anisotropia de fluorescência consiste em uma técnica na qual é possível medir, de maneira indireta, o movimento das moléculas em solução através da emissão da luz de um fluoróforo excitado a um determinado comprimento de onda, sendo o movimento da molécula inversamente proporcional ao seu tamanho.⁵⁶ Desta maneira, esta técnica foi utilizada para investigar forças dominantes envolvidas na interação proteína-tRNA, tendo como objetivo determinar os valores das constantes de dissociação dos complexos formados.

Como a molécula de interesse não possuía fluorescência intrínseca adequada ao experimento, a técnica de fluorescência extrínseca, foi utilizada para estudar a ligação da proteína *TbSerRS* com os diferentes tRNAs estudados. As medidas para análise de interação proteína-tRNA foram realizadas utilizando o equipamento Photon Counting Spectrofluorometer PC - 1 (ISS, Champaign, IL) montado em geometria “L” para a esquerda.

Para a marcação dos tRNAs foi utilizado o kit “5' EndTagNucleicAcidLabelling System” (vector laboratories) que contém uma variedade de fluoróforos, capazes de se ligar covalentemente na extremidade 5' dos tRNAs. Nesse procedimento, a enzima T4 Polinucleotídeoquinase transfere o tiosfato a partir do ATP γ S para a extremidade 5'-OH do ácido nucléico e posteriormente um fluoróforo reagente ao

grupo tiol é quimicamente acoplado ao ácido nucléico.⁵⁷ A figura abaixo esquematiza a reação de marcação descrita.

Figura 8 - Representação da reação de marcação da extremidade 5' de ácidos nucléicos pelo kit “5' EndTagNucleicAcidLabelling System”.



Fonte: Adaptada do MANUAL⁵⁷.

Após a marcação dos tRNAs, purificou-se os produtos marcados seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. A verificação da marcação pela presença do fluoróforo ligado ao tRNA foi realizada empregando o comprimento de onda de 480 nm para excitação do fluoróforo e a emissão foi registrada nos comprimentos de onda de 500 a 600 nm, utilizando o equipamento Photon Counting Spectrofluorometer PC – 1, montado em geometria “L” para a direita e observando o pico de emissão em 520 nm referente ao fluoróforo utilizado (fluoresceína). As medidas de anisotropia de fluorescência da proteína *TbSerRS* com o tRNAs foram realizadas em tampão [50mM fosfato de potássio, pH 7,6; 10mM NaCl, 5mM DTT e 5% glicerol], a 25°C, utilizando o tRNA marcado com fluoresceína e a este foram adicionadas concentrações crescentes de proteína. O tRNA^{Ala} foi utilizado nas mesmas condições já citadas, como controle para ligação inespecífica. Para os ensaios de interação proteína-ligante, o comprimento de onda utilizado para a excitação do fluoróforo foi 480nm e o uso de um filtro de cutoff de 515nm (corte de 50% da intensidade em 515nm) foi importante para evitar que o espalhamento de luz interferisse na medida. Os valores de anisotropia foram calculados pelo próprio programa Vinci-ISS da seguinte maneira:

$$A = \left(\frac{I_{par} - I_{per}}{I_{par} + 2I_{per}} \right) \quad (1)$$

em que I_{par} é a intensidade de luz polarizada quando os polarizadores estão em paralelos e I_{per} é a intensidade de luz quando os polarizadores estão perpendiculares.

Para os ensaios de anisotropia, adicionou-se à cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico), 10nM de tRNA marcado e então titulou-se concentrações crescentes da proteína *TbSerRS* (0nM, 10nM, 20nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM, 750nM, 1000nM, 1500nM, 2000nM, 2500nM, 3000nM, 3500nM, 4000nM, 4500nM e 5000nM) através de adições sucessivas; porém, tomou-se o cuidado para que o volume final da titulação não excedesse em mais de 20% o volume inicial. Para cada experimento foram realizadas no mínimo 3 medidas em cada concentração protéica, e para se obter os resultados finais, logo mais apresentados, foram utilizadas amostras diferentes em dias diferentes.

Todos os dados de interação entre *TbSerRS*-tRNAs obtidos foram corrigidos para a diluição em relação à concentração de proteína ou ligante e analisados no programa SigmaPlot 2006 (versão 10.0). O cálculo da constante de dissociação foi realizado no mesmo programa segundo a equação:

$$f = ai + (af - ai) * \frac{x}{k+x} \quad (2)$$

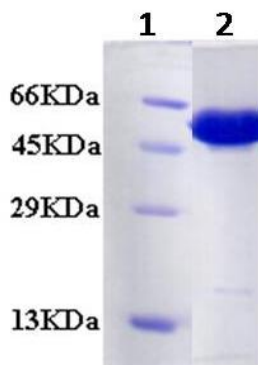
em que *ai* e *af* são os valores de anisotropia inicial e final respectivamente, e *k* o valor de K_d calculado. Parte desses experimentos foi realizada em parceria com a mestrandia do nosso grupo, Natália Karla Bellini, durante o seu estágio de iniciação científica e todos os planejamentos, análises dos dados e resultados das constantes de dissociação foram realizados em parceria com a Dra. Livia Regina Manzine do Instituto de Física de São Carlos.

3.2 Resultados e Discussões

3.2.1 Expressão e purificação da proteína Seril-tRNA Sintetase

Realizados os passos citados resumidamente em 3.1.1 e já descritos por Evangelista,⁵⁵ o perfil protéico resultante encontra-se representado na figura abaixo. Fração semelhante à mostrada foi utilizada nos experimentos de interação *TbSerRS*-tRNA.

Figura 9 - Resultado da purificação da proteína TbSerRS. 1) Padrão de massa molecular; 2) TbSerRS concentrada após as etapas de purificação utilizada nos experimentos de interação.

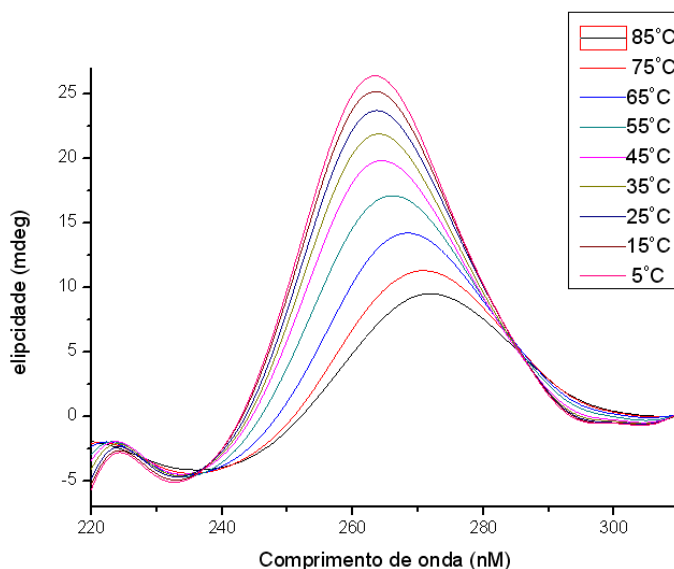


Fonte: Elaborada pela Autora.

3.2.2 Amplificação, transcrição *in vitro* e dicroísmo circular dos tRNAs (Ser-tRNA^{Sec} e SelC)

Novamente foi seguido o protocolo descrito por Evangelista,⁵⁵ para a obtenção dos tRNAs e, como avaliação da sua estrutura secundária para posterior utilização nos experimentos de interação proteína:tRNA, os tRNAs foram submetidos à técnica de dicroísmo circular. Essa análise permitiu a verificação do aumento nos valores de elipicidade sugerindo a ocorrência do pareamento das bases presentes no tRNA para a formação de sua estrutura secundária. O experimento iniciou-se com o aquecimento da amostra a 85°C com posterior resfriamento até 5°C, e os espectros medidos pelo equipamento a cada 10°C foram sobrepostos. A figura 10 é o perfil obtido para os espectros de dicroísmo circular, no caso, a figura refere-se ao tRNA^{Ser} 3B, porém o mesmo resultado foi obtido para os demais tRNAs e o SelC. Através dos dados obtidos, foi possível verificar um aumento na elipicidade no comprimento de onda de 260nm para todos os tRNAs, concluindo que os mesmos adquiriram uma conformação estrutural.

Figura 10 - Espectros de dicroísmo circular dos tRNAs. Mudanças conformacionais em função da temperatura são observadas no gráfico obtido relacionando elipicidade em função do comprimento de onda para uma variação de temperatura de 85°C até 5°C. Este resultado é eferente ao tRNA^{Ser} 3B, porém o mesmo perfil foi obtido para todos os tRNAs utilizados.

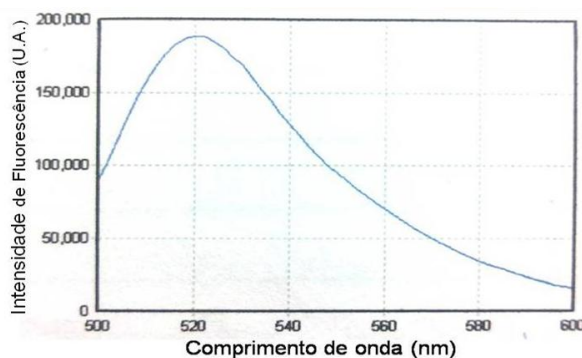


Fonte: EVANGELISTA.⁵⁵

3.2.3 Anisotropia de Fluorescência

Com os tRNAs marcados e enovelados assim como com a proteína pura, experimentos de interação TbSerRS – tRNAs foram realizados através da técnica de anisotropia de fluorescência. A figura 11 mostra a verificação da marcação dos tRNAs pela presença do fluoróforo realizada antes dos experimentos de interação.

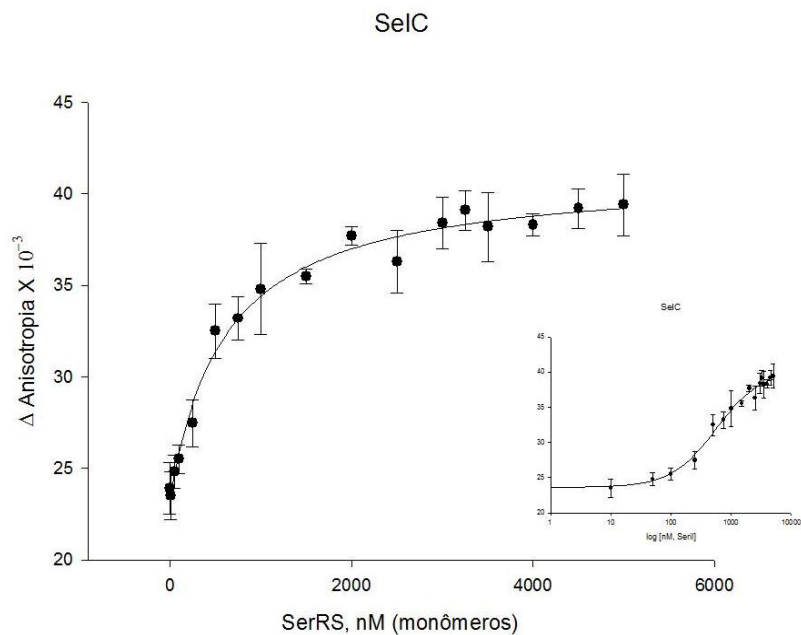
Figura 11 - Espectro de fluorescência extrínseca dos tRNAs marcados. Os espectros de emissão foram obtidos entre os comprimentos de onda de 500 a 600nm, observando o pico de emissão de 520nm referente ao fluoróforo utilizado. Este perfil foi obtido para todos os tRNAs estudados.



Fonte: Elaborada pela Autora.

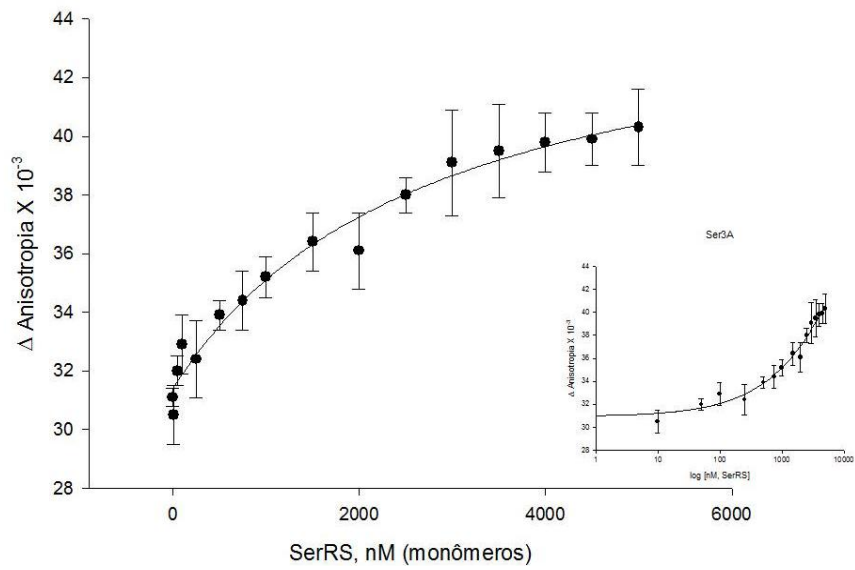
A fim de determinarmos a constante de dissociação (K_d) entre a proteína e os diferentes tRNAs, a concentração dos tRNAs marcados foi mantida fixa e variou-se a concentração da proteína de forma crescente. Os valores de anisotropia obtidos foram analisados no programa SigmaPlot e os gráficos abaixo foram obtidos para as interações entre a proteína e os diferentes tRNAs.

Figura 12 - Curva da anisotropia de fluorescência. Ligação da enzima SerRS e o ligante SelC.



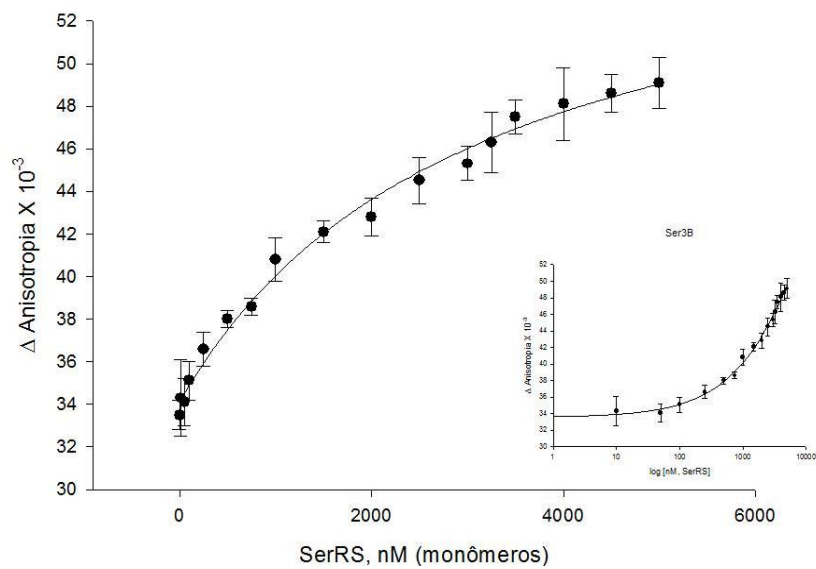
Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 13 - Curva da anisotropia de fluorescência. Ligação da enzima SerRS e o ligante tRNA^{Ser3A}.
Ser3A



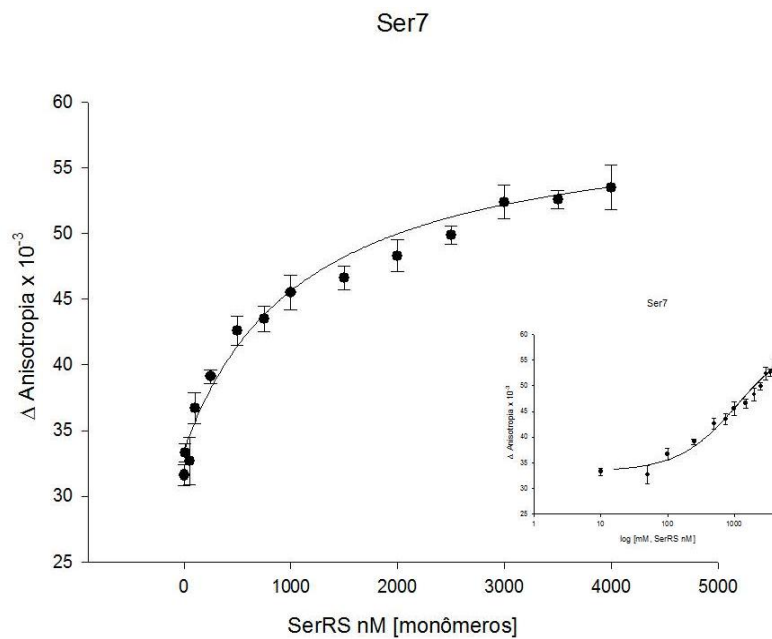
Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 14 - Curva da anisotropia de fluorescência. Ligação da enzima SerRS e o ligante tRNA^{Ser3B}.
Ser3B



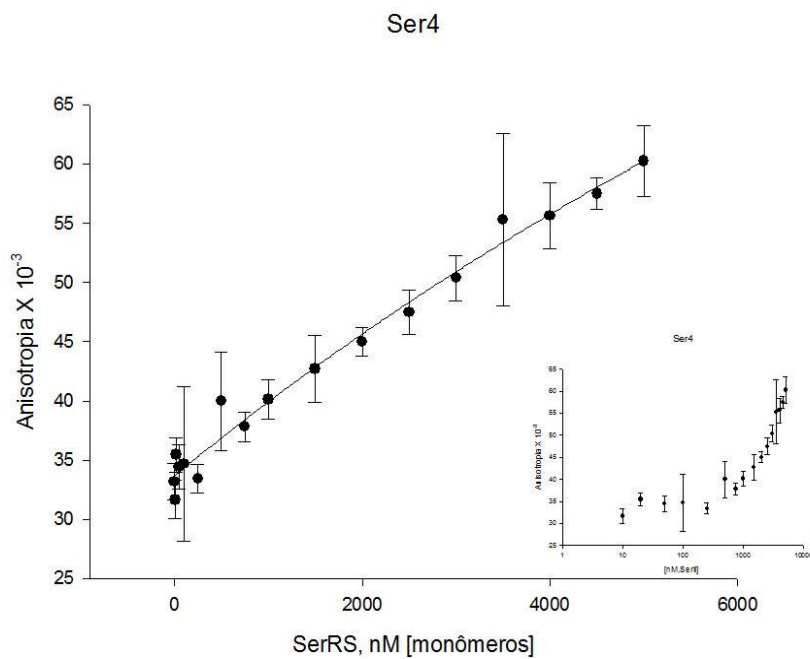
Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 15 - Curva da anisotropia de fluorescência. Ligação da enzima SerRS e o ligante tRNA^{Ser7}.

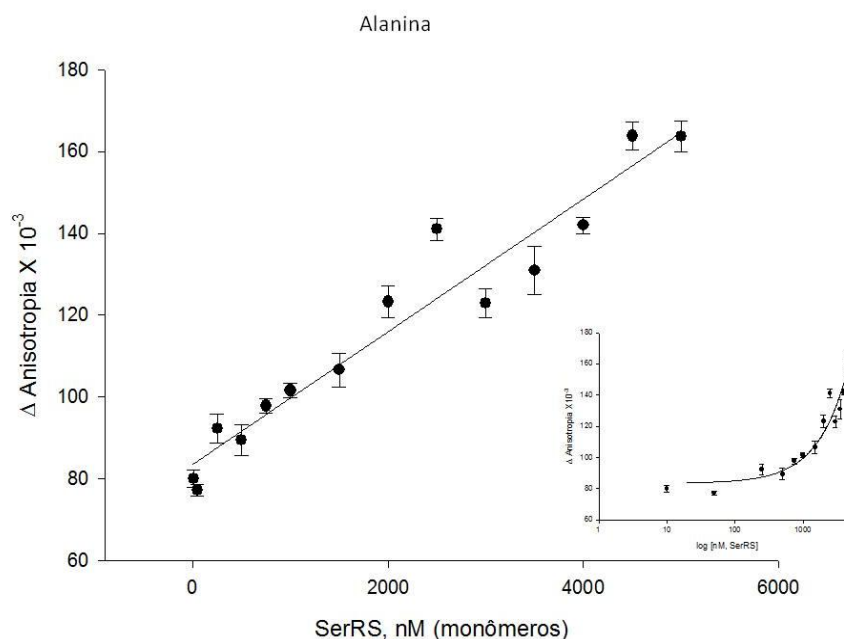


Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 15 - Curva da anisotropia de fluorescência. Ligação da enzima SerRS e o ligante tRNA^{Ser4}.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 16 - Curva da anisotropia de fluorescência. Ligação da enzima SerRS e o ligante tRNA^{Ala}

Fonte: Elaborada pela Autora.

Através dos gráficos obtidos foi possível determinar o K_d para cada tRNA e analisando o banco de dados do uso dos códons dos aminoácidos do *T. brucei*⁵⁸ pudemos relacioná-los aos tRNAs e correlacionar o valor de K_d obtido nas condições experimentais utilizadas com a frequência com que o códon é utilizado na síntese de proteínas do organismo. (Tabela 2).

Tabela 2- Valores de K_d e frequência de ocorrência do tRNAs.

tRNA	SeIC	tRNA ^{Ser3A}	tRNA ^{Ser3B}	tRNA ^{Ser7}
Constante de Dissociação(nM)	608,19 ± 86,41	2780,25 ± 756,46	3091,66 ± 498,93	1063,61 ± 312,38
R ²	0,9882	0,9770	0,9922	0,9582
Ocorrência (%)		1,26	2,08	0,90

Fonte: Elaborada pela Autora.

Os experimentos de interação SerRS-tRNAs permitiu analisar as ligações em termos de constante de dissociação e seletividade com os homólogos do tRNA^{Ser} e o SeIC. Os homólogos do tRNA^{Ser} estão divididos em dois grupos: grupo 1 – com códons AGY (Y podendo ser U ou C) e grupo 2 – com códons UCN (N podendo ser U, C, A, G).³⁷ Sabe-se que quanto menor o valor de K_d , maior a afinidade do ligante

pela proteína, ou seja, quanto maior a afinidade da SerRS pelo tRNA, menores concentrações de tRNA são necessárias para ocupar metade dos sítios de ligação da SerRS.⁵⁹ Como proteínas que interagem com RNA podem se ligar de modo não específico, a realização do ensaio de interação com tRNA^{Ala} torna-se importante para promover uma diferenciação no perfil de ligação da SerRS com os tRNAs de maneira específica e inespecífica, onde, neste último não é possível a determinação do K_d visto que não há tendência a platôs (figura 17). A interação proteína-tRNA, diferenciando ligações específicas e inespecíficas, foi comprovada por Manzine et al.⁵¹. Sendo a especificidade de ligação da SerRS ao tRNA uma das etapas críticas no processo de tradução protéica, entender e interpretar essa especificidade torna-se um processo fascinante. Com os resultados obtidos podemos sugerir a organização da especificidade de ligação da SerRS ao tRNA em ordem decrescente como segue: SelC>tRNA^{Ser7}>tRNA^{Ser3A}>tRNA^{Ser3B}. A mesma organização é observada quando feita em relação à ocorrência dos homólogos do tRNA^{Ser} dentro do organismo. O fato do valor de K_d obtido para o SelC ser menor do que para os demais tRNAs testados, ou seja, há uma maior afinidade desse tRNA pela proteína, pode ser claramente justificado por este ser um tRNA diferenciado e pouco presente nas células desse organismo, sendo de acordo com o descrito na literatura por Geislan e colaboradores em 2006, mas para o organismo *T. brucei*, onde foi verificado que TcSerRS possuía uma maior afinidade para o SelC do que para os homólogos do tRNA^{Ser}.

Nota-se também que tRNA com o anticódon pertencente ao grupo 1, possui uma maior afinidade podendo ser justificada por este grupo ter códon AGY para serina, podendo ser o Y apenas as bases U e C, enquanto os do grupo 2, UCN, o N pode assumir 4 diferentes bases, comprometendo a afinidade, tornando-a menos específica. Pelo fato do tRNA^{Ser4} apresentar um perfil de ligação inespecífica, como obtido para o tRNA^{Ala}, inferimos que o mesmo, apesar de ter apresentado mudança conformacional, conforme verificado pela técnica de dicroísmo circular não deve ter obtido sua estrutura secundária correta para que fosse possível formação do complexo proteína-ligante de forma específica.

Capítulo 4 As Selenoproteínas de *Trypanosoma brucei*

O capítulo abordará as metodologias empregadas para as análises computacionais, construções e obtenções das selenoproteínas de *T. brucei*, as principais técnicas e materiais utilizados, assim como a apresentação e discussão dos resultados obtidos para as mesmas.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Análise das sequencias em programas de predições

Antes de iniciarmos os experimentos em laboratório com as selenoproteínas do *T. brucei*, algumas análises das suas sequencias foram feitas em programas computacionais que resultam em predições para as proteínas.

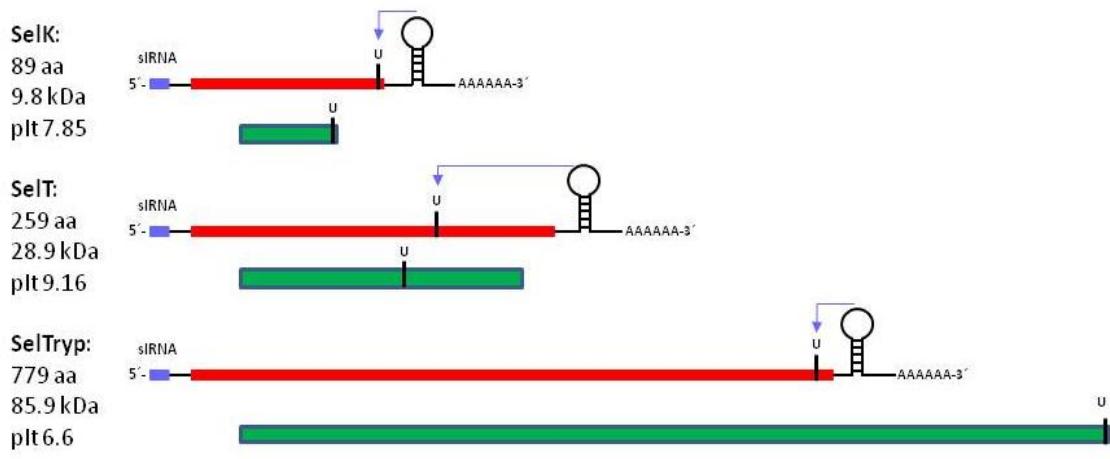
Utilizamos a tabela descrita na literatura para os códons como comumente utilizados em *E. coli* durante a tradução e comparamos com os códons presentes na sequencia das selenoproteinas SelK, SelT e SelTryp.

O PredictProtein foi utilizado a fim de verificar a porcentagem de identidade com as selenoproteinas de outros organismos, a predição para a estrutura secundária das selenoproteínas e a presença ou não de hélice transmembrantar, pois através de uma busca no banco de dados de sequencias conhecidas, o programa cria alinhamentos e prevê aspectos estruturais das proteínas em estudos. Em relação à presença ou não de regiões transmembrânicas, o mesmo foi predito nos programas Tmpred do ExPASy e TMRPres2D, onde, no último, foi possível simular a hélice dentro da bicamada lipídica. Foi analisada também a presença ou não de peptídeo sinal, e quando presente, a localização do possível sítio de glicosilação, através do programa SignalP.

4.1.2 Amplificação das regiões que codificam para as proteínas SelK, SelT e SelTryp

As regiões que codificam para as selenoproteínas SelK, SelT e SelTryp foram sintetizados pela empresa GenScript⁶⁰ já com códons otimizados para expressão heteróloga em *Escherichia coli* (*E. coli*) e com o aminoácido cisteína no lugar da selenocisteína. Na otimização dos códons foram substituídos aqueles códons raramente encontrados em *E. coli* pelos de maior frequência sem que houvesse alteração da proteína. Estas regiões encontravam-se clonadas no vetor pUC57. Segue abaixo a representação esquemática das selenoproteínas com a posição da localização de Sec (U) assim como a presença do elemento SECIS.

Figura 17 - Representação esquemática das selenoproteínas de *T. brucei*. Em vermelho está representado o RNA mensageiro, indicando a posição relativa do Sec (U) e do elemento SECIS. Em verde a representação da proteína resultante indicando a posição do Sec e à esquerda o número de resíduos, massa molecular e ponto isoelétrico teórico das respectivas proteínas.

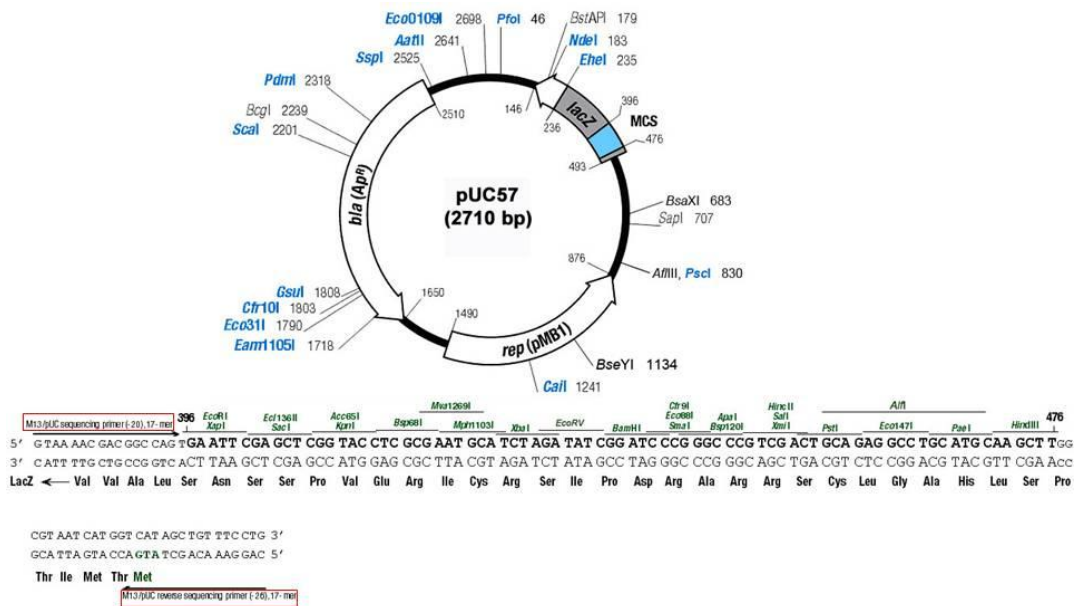


Fonte: THIEMANN*.

Para a verificação da presença dos genes no vetor pUC57, estes foram submetidos a amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR), a partir dos oligonucleotídeos M13 sense e antisense que se anelam ao vetor utilizado (figura 19). A reação foi realizada segundo condições descritas na tabela 3.

*Figura gentilmente cedida por Otavio H. Thiemann

Figura 18 - Representação do mapa e sequência do vetor pUC57. Destacado com retângulo vermelho a localização dos oligonucleotídeos M13 sense e antisense utilizados na reação de amplificação.



Fonte:GENSCRIPT. ⁶⁰

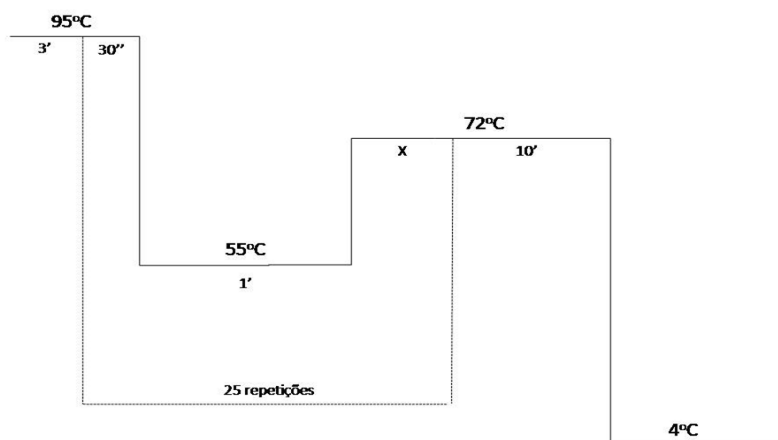
Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação de amplificação dos genes das selenoproteínas.

Mistura de reação de amplificação	Volume (µL)
Tampão sem Mg ⁺² [10X]	10
dNTP 10mM (N = A, G, C, T)	2
MgCl ₂ 50mM	6
Oligonucleotídeo 10pmol/µL (sense)	20
Oligonucleotídeo 10pmol/µL (antisense)	20
DNA molde 50µg/µL	1
Taq DNA Polimerase (5U/µL)	1
H ₂ O q.s.p.	100

Fonte: Elaborada pela Autora.

Em seguida a reação foi submetida a um programa de PCR (figura 20), executado no termocilcador PTC – 100TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Figura 19 - Ciclo da PCR utilizado para a amplificação das regiões codificadoras. Em X temos 30 segundos para o gene *selk*, 60 segundos para *selt* e 120 segundos para *seltryp*.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Os fragmentos de DNA obtidos nesta reação de PCR foram analisados através de corrida eletroforética em gel de agarose preparativo (BioRad) 1% com brometo de etídio (0,5µg/mL) em tampão TAE 1X (8mM Tris-acetato, 0,2mM EDTA pH=8,0). Após a confirmação pelo gel da presença de bandas referentes aos tamanhos esperados para as regiões codificadoras das selenoproteínas, os DNAs ligados ao pUC foram transformados em células competentes *E. coli* DH5α preparadas de acordo com o protocolo de⁶¹. As células foram previamente descongeladas em gelo por 30 minutos e adicionou-se 40ng de DNA. Em seguida, deu-se o choque térmico de 42°C por 90 minutos e gelo por 3 minutos. Adicionou-se 250µL de meio LB (Luria-Bertani) às células que permaneceram em agitação leve por 1 hora a 37°C. Decorrido este tempo, 100µL da mistura foram semeados em meio sólido LB ágar contendo 100µg/mL de ampicilina. Os 200µL de material transformado restantes foram semeados em outra placa nas mesmas condições. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Após esta reação de transformação, algumas colônias resultantes foram selecionadas, transferidas para meio LB líquido contendo o antibiótico de seleção para o vetor e posterior extração de seus DNAs plasmidiais assim como confirmação quanto à presença do plasmídeo recombinante. A extração dos DNAs plasmidiais foi feita utilizando-se o kit Minipreps Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) e a confirmação dos plasmídeos recombinantes foi realizada pela digestão dos DNAs plasmidiais com enzimas de restrição ou por PCR de

colônia. Para a reação de digestão, utilizou-se 0,5µg de DNA plasmidial, 1,0µL da enzima *NdeI* (10U/µL – BioLabs), 1,0µL da enzima *XhoI* (10U/µL - BioLabs), 5µL de tampão apropriado, 2µL de BSA (50mM – BioLabs) e completou-se a reação para 50µL com água milli-Q autoclavada incubando a mistura a 37°C por 4 horas. Para a checagem por PCR de colônia, os oligonucleotídeos e o programa utilizados foram iguais aos já supracitados. Ambos os testes foram analisados em gel de agarose 1% e os plasmídeos foram seqüenciados em nosso grupo pela técnica Dra. Susana A. Sculaccio, utilizando oligonucleotídeos 5' e 3' do vetor para posterior análise da seqüência. Finalmente, para constatação, as seqüências obtidas no seqüenciamento foram comparadas com as sintetizadas pela empresa GenScript para o genes de *selk*, *selt* e *seltryp*, utilizando o software DNASTAR.⁶²

4.1.3 Subclonagem das regiões que codificam para as selenoproteínas SelK, SelT e SelTryp em vetores pET (28a e 29a)

O sistema pET foi desenvolvido para a utilização em clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e apresenta um alto grau de eficiência. Decidiu-se trabalhar com ambos vetores pois, apesar de possuírem uma região que codifica uma calda com seis histidinas, no vetor pET 29a, essa região fica logo após o códon de terminação, ou seja, a proteína quando traduzida não possuirá essa calda, diferentemente do pET 28a, onde a região com as seis histidinas é no N-terminal. Essa calda pode facilitar nos trabalhos com as proteínas em alguns aspectos, como em etapas de purificação, mas pode também, não ser tão útil, como em etapas de cristalização, sendo interessante ter as proteínas subclonadas nos dois vetores. Inicialmente os insertos ligados ao vetor pUC57, após a verificação das corretas seqüências das selenoproteínas, foram submetidos à extração dos DNAs plasmidiais utilizando-se o kit Minipreps Wizard® Plus SV Minipreps (Promega). Então esses DNAs foram quantificados e digeridos utilizando-se as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*. Os fragmentos de DNA obtidos nesta reação de digestão foram analisados através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e purificados, a partir do gel de agarose, utilizando o “Kit Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf) de acordo com as condições do fabricante. O mesmo procedimento foi

realizado com os vetores pETs e todos os produtos foram quantificados para posterior ligação.

Os insertos digeridos foram então ligados aos vetores também digeridos com as mesmas enzimas. A reação de ligação contendo o DNA plasmidial digerido, DNA do inserto digerido, 1,0µL de enzima T4 DNA Ligase [3U/µL] e 1,5µL do seu respectivo tampão para uma concentração final de [1X] resultando em um volume final de 15µL de reação, foi de aproximadamente 16 horas a 16° C. Para tal ligação utilizou-se uma razão molar (plasmídio:vetor) adequada aos tamanhos dos genes trabalhados, calculada a partir da equação abaixo.

$$\frac{ng\ vetor * Kb\ insert}{Kb\ vetor} * proporção = xng\ inserto \quad (3)$$

As proporções utilizadas foram de (10:1) para selk, (5:1) para selt e (3:1) para seltryp. Uma nova transformação foi realizada com a cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. O protocolo de transformação utilizado foi o mesmo citado acima para DH5α de *E. coli* e mais uma vez, colônias recombinantes foram analisadas através da extração de seus DNAs plasmídias (PCR de colônia ou digestão do DNA) em gel de agarose para confirmar a presença do inserto estudado. Também foram testadas as cepas que se encontram descritas na tabela 4 com a finalidade verificar um possível aumento na expressão.

Tabela 4 - Resumo das construções testadas em diferentes cepas de *E. coli*.

Cepas	Construções					
	selk+pET28	selt+pET28	seltryp+pET28	selk+pET29	selt+pET29	seltryp+pET29
BL21(DE3)	X	X	X	X	X	X
ArcticExpress	X	X	X	X	X	X
pLysS	X		X			
Rosetta	X					

Fonte: Elaborada pela Autora.

4.1.4 Expressão das proteínas SelK, SelT e SelTryp

4.1.4.1 Cepas de Expressão

4.1.4.1 a) BL21 (DE3)

Um pré-inóculo de 5mL contendo cepas BL21 transformadas com as construções pET28a-selt e pET29a-selk foi cultivado em meio de cultura líquido LB por aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seu respectivo antibiótico kanamicina [30µg/mL]. Da mesma forma, controles negativos de cepas BL21 transformadas com pET28a ou pET29a foram cultivados. Depois de atingida a saturação do meio de cultura uma alíquota de cada um dos pré-inóculos foi transferida para um novo tubo de LB+kanamicina na proporção de 1:100, que permaneceu sob agitação de 200rpm a 37° C até atingida uma densidade ótica (Abs_{600nm}) de aproximadamente 0.6. Adicionou-se então o agente indutor Isopropil-tio-galactosídeo (IPTG) ao tubo de cultura para início da expressão que se prolongou por 20 horas sob temperatura de 20° C ou 4 horas a 37° C sempre sob agitação.

Terminado o período de indução a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 4658g. As células foram ressuspendidas em tampão de lise e adicionou-se 10 µg/mL de lisozima para facilitar o rompimento da parede celular. Em seguida, a amostra passou por uma sequência (6 repetições) de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho a 42°C e depois foi sonicada com 4 pulsos de 15 segundos cada, intensidade 4 (aproximadamente 110 Watts) e intervalos de 30 segundos entre os pulsos. A cultura sonicada foi centrifugada por 30 minutos à 20201g e todas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE.

4.1.4.1 b) Rosetta (DE3)

A cepa Rosetta (DE3) é derivada da cepa BL21 e destinada a aumentar a expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raros para expressão em *E. coli*¹⁵. Mesmo sendo o gene otimizado pela GenScript para expressão em *E. coli*, resolvemos também testar a expressão nessa cepa também. O mesmo

procedimento realizado para cepas BL21 (descrito em 4.3.1a) foi realizado para cepas Rosetta (DE3), sendo os antibióticos adequados kanamicina [30µg/mL] e cloranfenicol [34µg/mL]. Novamente todas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE.

4.1.4.1 c) BL21 (DE3) pLysS

A cepa BL21 (DE3) pLysS carrega o plasmídeo pLysS que expressa a lisozima T7 capaz de inibir os níveis basais da T7 RNA polimerase, antes da indução, estabilizando assim o vetor pET para codificar as proteínas de interesse.⁶⁴ Dessa forma estabilizando o vetor pET, utilizou-se essa cepa com o intuito de inibir a expressão basal que pode ocorrer antes da adição do agente indutor. O mesmo procedimento descrito em 4.3.1a foi realizado para cepas BL21 (DE3) pLysS e todas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE.

4.1.4.1 d) Arctic Express (DE3) pRare

As células Arctic Express (DE3) são derivadas da cepa BL21 e projetadas para aumentar o rendimento de proteína solúvel e melhorar seu processamento em temperaturas baixas, por co-expressarem chaperonas, que auxiliam no enovelamento protéico.⁶⁵ Já Arctic Express (DE3) pRare são células que além de possuir as características supracitadas, também possibilitam o aumento da expressão de proteínas eucarióticas que contêm códons raros para expressão em *E. coli*. Como alternativa para melhorar o rendimento protéico, testamos essas células que foram gentilmente cedidas pela Dr^a. Elisandra M. Rodrigues. O protocolo desenvolvido para a expressão foi igual ao citado em 4.3.1 a, porém a temperatura de expressão após a indução foi de 15 °C e os antibióticos específicos kanamicina [30µg/mL], cloranfenicol [34µg/mL] e gentamicina [20µg/mL]. Todas as amostras foram analisadas em SDS-PAGE e todas as variações nas condições de expressão encontram-se resumidas nas tabelas 5, 6 e 7.

Tabela 5 - Resumo das variações de agente indutor e temperatura nas cepas utilizadas para expressão da proteína SelK.

SelK		
Cepas	Variação do agente indutor (IPTG em mM)	Variação de temperatura (°C)
BL21 (DE3)	0,1 à 1	37 e 20
Rosetta (DE3)	0,5 a 1	37
BL21 (DE3) pLysS	0,5	37
ArcticExpress pRare	1	15

Fonte: Elaborada pela Autora.

Tabela 6 - Resumo das variações de agente indutor e temperatura nas cepas utilizadas para expressão da proteína SelT.

SelT		
Cepas	Variação do agente indutor (IPTG em mM)	Variação de temperatura (°C)
BL21 (DE3)	0,1 à 1	37 e 20
ArcticExpress pRare	1	15

Fonte: Elaborada pela Autora.

Tabela 7 - Resumo das variações de agente indutor e temperatura nas cepas utilizadas para expressão da proteína SelTryp.

SelTryp		
Cepas	Variação do agente indutor (IPTG em mM)	Variação de temperatura (°C)
BL21 (DE3)	0,1 à 1	37 e 20
BL21 (DE3) pLysS	0,5	37
ArcticExpress pRare	1	15

Fonte: Elaborada pela Autora.

Com relação à expressão da proteína SelK, foram também testadas modificações em relação no meio de cultura. Buscando um meio mais enriquecido, utilizamos o meio 2XYT e o meio de auto-indução tentando aumentar o rendimento da fração solúvel protéica. Diferentes tampões de lise também foram empregados com o intuito de tornar a proteína solúvel (tabela 8).

Tabela 8 - Lista de tampões utilizados em testes com a proteína SelK.

Tampões			
1	20mM Tris/HCl pH 7,5 150mM NaCl	6	20mM Bicarbonato de Sódio pH 9,5 150mM NaCl
2	20mM Tris/HCl pH 7,5 500mM NaCl	7	20mM Bicarbonato de Sódio pH 9,5 500mM NaCl
3	20mM Tris/HCl pH 7,5 150mM NaCl 0,1mM Arginina	8	20mM Bicarbonato de Sódio pH 9,5 150mM NaCl 0,1mM Arginina
4	20mM Tris/HCl pH 7,5 150mM NaCl 0,1mM Glicina	9	20mM Bicarbonato de Sódio pH 9,5 150mM NaCl 0,1mM Glicina
5	20mM Tris/HCl pH 7,5 150mM NaCl 0,2% Triton X-100	10	20mM Bicarbonato de Sódio pH 9,5 150mM NaCl 0,2% Triton X-100

Fonte: Elaborada pela Autora.

Como consequências dos resultados obtidos para todas as selenoproteínas testadas, que serão ulteriormente apresentados, nossos esforços foram preferencialmente focados na proteína SelT.

4.2 Resultados e discussão

4.2.1 Análise das sequencias em programas de predições

Pela análise comparativa dos códons comumente utilizados na tradução em *E. coli* com os códons presentes nas sequencias codificadoras para as selenoproteínas, podemos constatar uma porcentagem considerável de códons raros presentes na sequencia destas proteínas, o que nos traria problemas se fossem expressas heterólogas em *E. coli* sem nenhuma modificação. Como o resultado obtido, tabela 9, é um percentual alto, optamos por obter a região codificadora das proteínas SelK, SelT e SelTryp da empresa GenScript que se

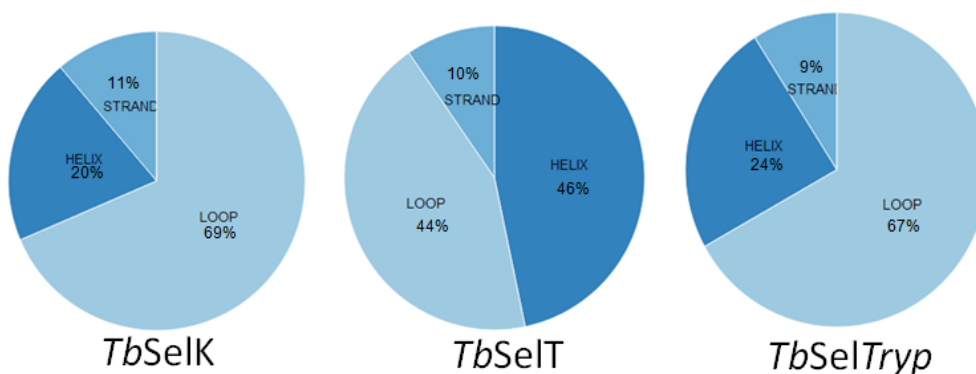
comprometeu além de otimizar esses códons raros, fazer uma mutação do aminoácido selenocisteína para um cisteína e assim podermos trabalhar com expressão heteróloga em *E. coli*.

Tabela 9 - Tabela das porcentagens obtidas na análise comparativa dos códons raramente utilizados na expressão em *E. coli*.

Proteína	Total de aminoácidos	Raros ou pouco frequentes	Porcentagem
SelK	89	27	30%
SelT	259	53	21%
SelTryp	779	194	25%

Pelo PredictProtein podemos verificar (figura 21) que as selenoproteínas possuem predições para estrutura secundária de altas porcentagens de regiões em loops, que são regiões muito flexíveis podendo trazer problemas futuros, como em etapas de cristalização.

Figura 20 - Gráfico obtido das predições de estruturas secundárias para as selenoproteínas no programa PredictProtein. É possível notar que as três selenoproteínas possuem alta porcentagem de regiões em forma de loops que são pouco estruturadas.



Já as predições de região transmembranar resultou que a SelK e a SelT possuíam essas regiões e a SelTryp não. SelK é uma proteína com predição de uma hélice transmembranar e SelT com três hélices transmembranar, como pode ser verificado nas figuras 22 (para SelK) e 23 (para SelT).

Figura 21 - Predições obtidas para a SelK para a presença de hélice transmembranar pelos programas PredictProtein, Tmpred e TMRPres2D, onde neste último é possível realizar uma simulação da posição da proteína na bicamada lipídica.

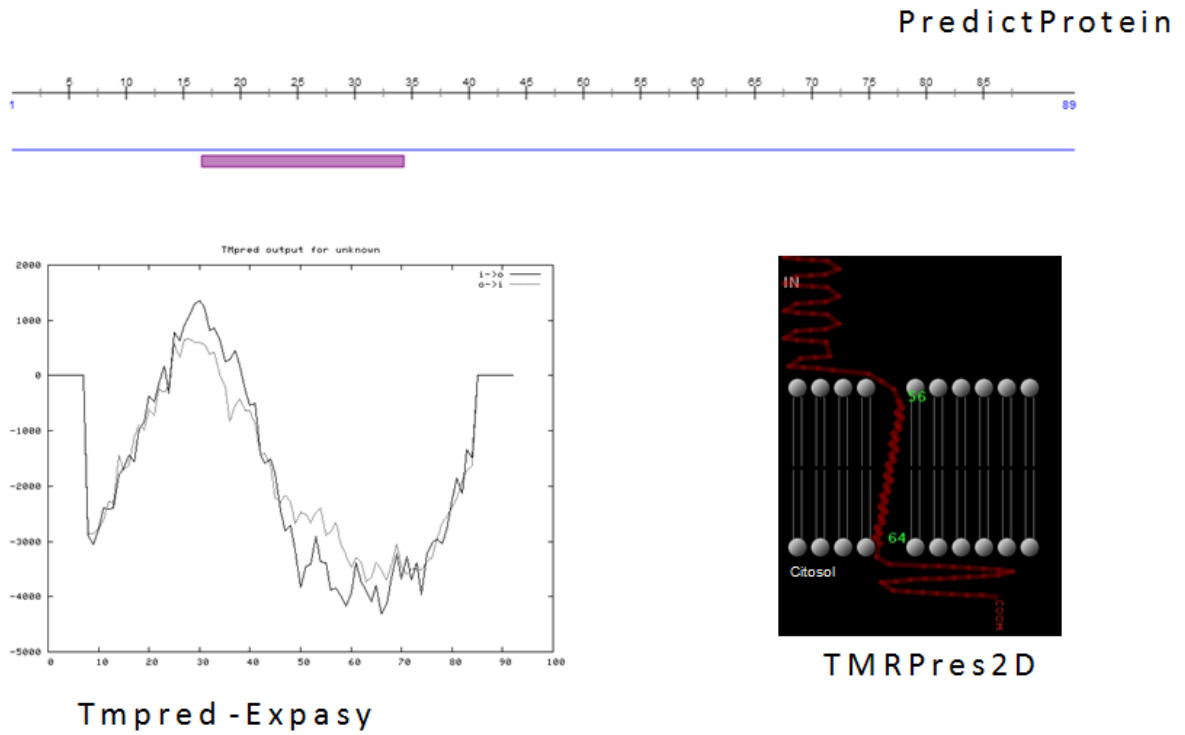
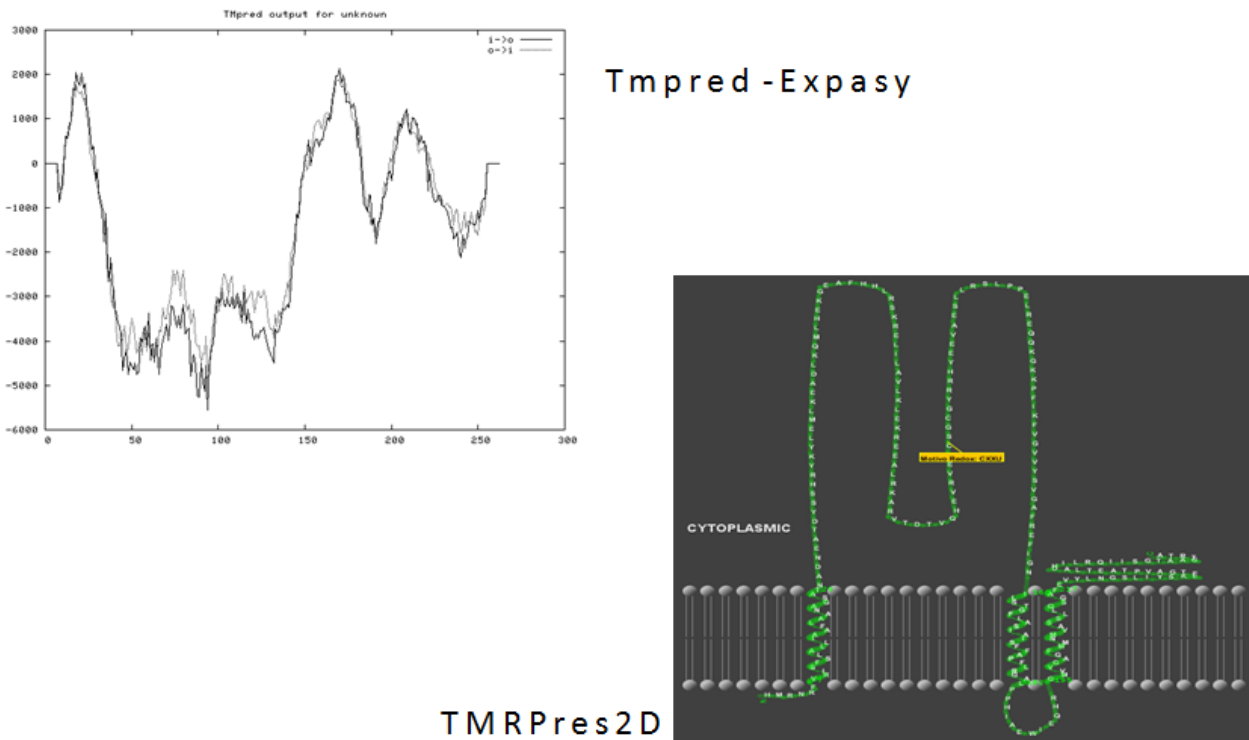
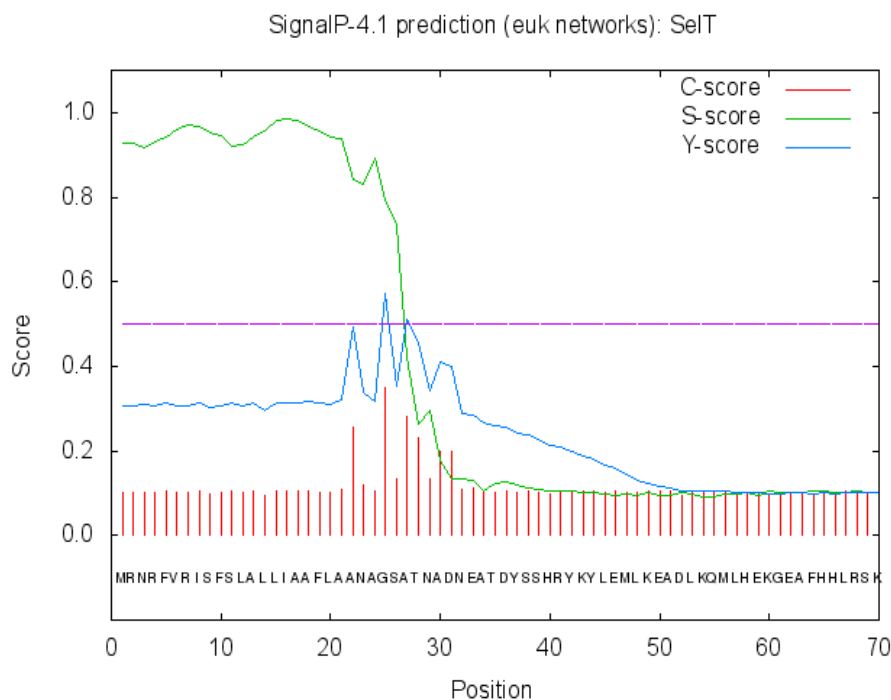


Figura 22 - Predições obtidas para a SelT para a presença de hélice transmembranar pelos programas Tmpred e TMRPres2D, onde neste último é possível realizar uma simulação da posição da proteína na bicamada lipídica. É interessante notar que a SelT possui predição para três hélices transmembranar.



Pelas predições no SignalP, apenas a SelT apresentou um peptídeo sinal do 1º ao 24º resíduo (figura 24) e então quando foi submetida a análise da predição para sítio de glicosilação o mesmo se mostrou presente na posição do 221º resíduo, uma asparagina.

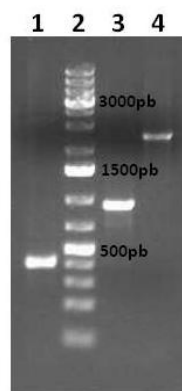
Figura 23 - Predições obtidas para a SelT pelo programa SignalP, nota-se a presença de um peptídeo sinal do 1º ao 24º resíduo.



4.2.2 Amplificação das regiões que codificam para as proteínas SelK, SelT e SelTryp

Para amplificação das regiões que codificam as proteínas em estudo foi empregada a técnica de PCR, com oligonucleotídeos específicos do vetor pUC57 e utilizando a enzima Taq DNA Polimerase. Segue o resultado da amplificação na figura abaixo.

Figura 24 - Verificação da amplificação dos genes *selk*, *selt* e *seltryp* de *T. brucei* em gel de agarose 1% em TAE [1X]. 1) reação de amplificação do gene *selk* (279pb); 2) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 3) reação de amplificação do gene *selt* (789pb); 4) reação de amplificação do gene *seltryp* (2349pb).

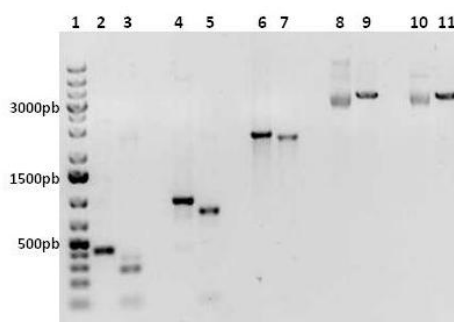


Fonte: Elaborada pela Autora.

4.2.3 Subclonagem das regiões que codificam para as selenoproteínas SelK, SelT e SelTryp em vetores pET (28a e 29a)

Foi realizada a digestão dos insertos *selk*, *selt* e *seltryp* assim como também dos vetores pET28a e pET29a com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* como mostra a figura 26 do gel de agarose.

Figura 25 - Análise da reação de digestão dos DNAs plasmidiais em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene *selk*; 3) reação de digestão de *selk* com as enzimas de restrição; 4) reação de amplificação do gene *selt*; 5) reação de digestão de *selt* com as enzimas de restrição; 6) reação de amplificação do gene *seltryp*; 7) reação de digestão de *seltryp* com as enzimas de restrição; 8) DNA do pET28a sem digerir; 9) reação de digestão do pET28a com as enzimas de restrição; 10) DNA do pET29a sem digerir; 11) reação de digestão do pET29a com as enzimas de restrição.

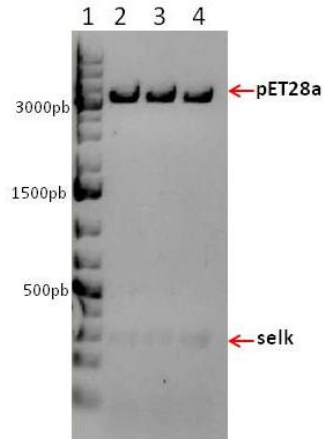


Fonte: Elaborada pela Autora.

Os insertos digeridos foram então recuperados do gel e ligados aos vetores também digeridos com sítios de clonagens complementares. A ligação foi

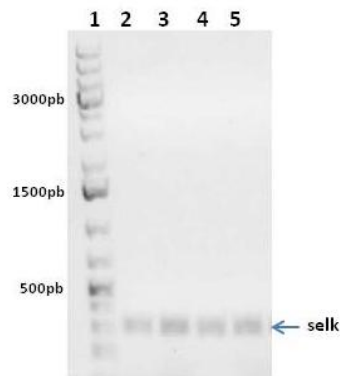
transformada em células competentes DH5 α e novamente verificou-se qual colônia era positiva como mostrado na figura seguinte, no qual todas são positivas.

Figura 26 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2), 3), 4), reação de digestão dos clones 1, 2, e 3 com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* do vetor pET28a com o inserto do gene *selk*.



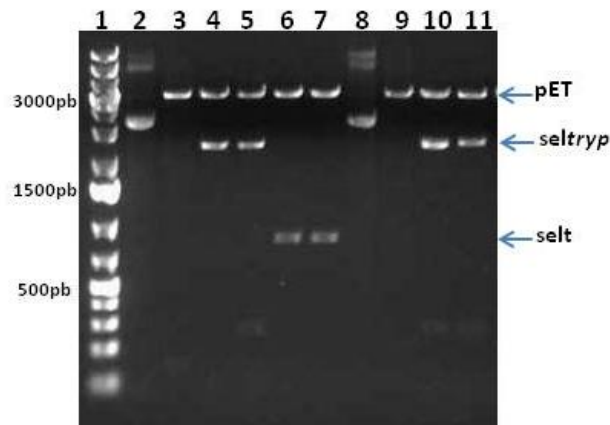
Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 27 - Análise da reação de PCR de colônia visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2), 3), 4)) reação de PCR das colônias 1, 2, 3 e 4, 5 e 6 da construção pET29a-*selk*.



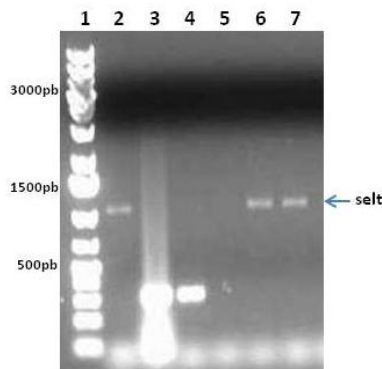
Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 28 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) DNA do pET28a sem digerir; 3) DNA do pET28a digerido com as enzimas de restrição; 4) e 5) reação de digestão dos clones 1e 2 do vetor pET28 com o inserto do gene *seltryp* com as enzimas de restrição; 6) e 7) reação de digestão dos clones 1e 2 do vetor pET28 com o inserto do gene *selt* com as enzimas de restrição; 8) DNA do pET29a sem digerir; 9) DNA do pET29a digerido com as enzimas de restrição; 10) e 11) reação de digestão dos clones 1e 2 do vetor pET29 com o inserto do gene *seltryp* com as enzimas de restrição.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 29 - Análise reação de PCR de colônia visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) a 7) reação de PCR das colônias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 da construção pET29a-selt, respectivamente.



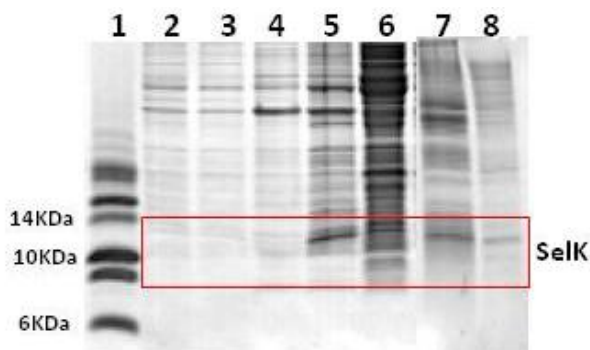
Fonte: Elaborada pela Autora.

Dentre estes, foi escolhido um plasmídeo para cada construção que foi transformado em cepas *E. coli* citadas no item 4.1.1.

4.2.4 Expressão da proteína SelK

Os ensaios de expressão da proteína SelK demonstraram uma pequena porção solúvel, e dentre os testes realizados, o melhor resultado foi com a construção selk+pET28a na cepa Rosetta (DE3) induzidas com 0,5mM de IPTG por 4 horas a 37° C. O melhor tampão de lise foi 20mM Tris/HCl pH 7,5 e 300mM NaCl. O resultado pode ser visualizado no gel de poliacrilamida 18% (figura 31).

Figura 30 - Análise da expressão da SelK em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 18%. 1) Padrão de massa molecular; 2) Controle negativo antes da indução; 3) SelK antes da indução; 4) controle negativo - fração insolúvel; 5) SelK - fração insolúvel; 6) SelK - fração solúvel; 7); SelK - fração insolúvel 8) SelK - fração solúvel. (do 2 ao 6 na cepa BL21 e 7 e 8 da cepa Rosetta).



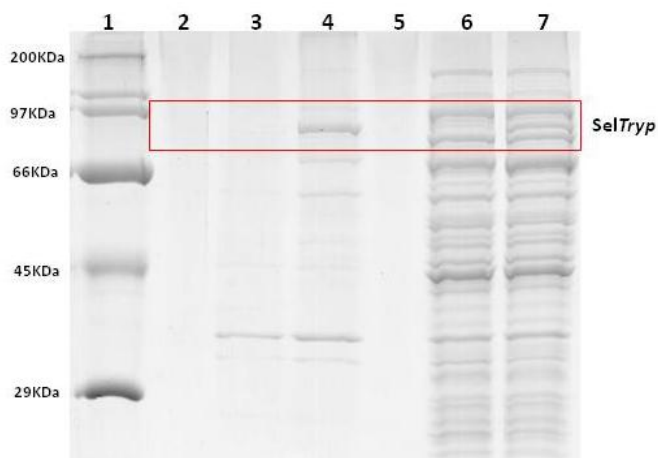
Fonte: Elaborada pela Autora.

Como pode ser observado, o rendimento da fração solúvel foi muito baixo mesmo após os inúmeros testes realizados para melhorá-lo, o que nos impossibilitou dar continuidade aos trabalhos com esta proteína.

4.2.4 Expressão da proteína SelTryp

Nos ensaios de expressão realizados com a proteína SelTryp, nota-se uma pequena banda na fração solúvel a partir da construção seltryp+pET29a expressas em cepas BL21(DE3) de *E. coli*. Estas foram induzidas com 0,5mM de IPTG por 4 horas a 37° C e o tampão utilizado para lise celular foi 20mM Tris/HCl pH 8,0 e 300mM NaCl. O resultado pode ser visualizado no gel de poliacrilamida 10% (figura 32).

Figura 31 - Análise da expressão da *SelTryp* em extratos de cepas *E. coli* BL21 em SDS-PAGE 10%. 1) Padrão de massa molecular; 2) vazio; 3) controle negativo - fração insolúvel; 4) *SelTryp* – fração insolúvel; 5) vazio; 6) controle negativo – fração insolúvel; 7) *SelTryp* – fração solúvel.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Este resultado foi obtido apenas uma vez e não foi possível reproduzi-lo, mesmo com a realização de várias tentativas de reprodução. Assim, a continuação dos experimentos com a proteína *SelTryp* tornou-se impraticável.

4.2.5 Expressão e purificação da proteína SelT

Como a SelT foi a selenoproteína que apresentou a maior quantidade de resultados promissores, o próximo capítulo detalhará todos os experimentos e resultados obtidos para esta proteína.

Capítulo 5 A Selenoproteína T (SeIT) de *Trypanosoma brucei*

Esse capítulo abordará as metodologias empregadas para os estudos realizados com a SeIT a partir de sua expressão, as principais técnicas, materiais utilizados, parcerias estabelecidas e também apresentará e discutirá os resultados obtidos.

5.1 Materiais e Métodos

5.1.1 Expressão e purificação da proteína SelT

Diante dos resultados obtidos e apresentados no capítulo anterior, decidiu-se dar prosseguimento à expressão da proteína SelT, na construção pET28a-selT transformada na cepa Arctic Expresss. Para a expressão da proteína, o mesmo procedimento utilizado em 4.1.3 foi repetido, porém com adição de 1mM de IPTG ao frasco de cultura para início da expressão que prolongou-se por 20 horas sob temperatura de 15° C e agitação. Terminado o período de indução a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 4658g. As células foram ressuspensas em 10mL de tampão (20mM Tris/HCl pH 8,1 e 300mM NaCl) e adicionou-se [10µg/mL] de lisozima permanecendo em repouso por 30 minutos para facilitar o rompimento da parede celular. Decorrido esse tempo, a amostra foi submetida a uma sequência (6 repetições) de choque térmico, por congelamento em nitrogênio líquido e depois foi sonicada com 4 pulsos de 15 segundos cada, intensidade 4 (aproximadamente 110 Watts) com intervalos de 30 segundos entre os pulsos. A cultura sonicada foi centrifugada por 30 minutos a 20201g. Para melhora na solubilidade protéica e sendo a SelT uma proteína de membrana, alguns detergentes foram testados sendo adicionados ao tampão. Estes detergentes foram: CHAPS [1%], Triton-X100 [0,1%], Tween-20 [0,01%] e Sarcosil [1%] e [0,2%].

Como a proteína de interesse, SelT, é expressa no vetor pET28a com uma cauda N-terminal portadora de 6 histidinas e esta, por sua vez tem uma alta afinidade para ligação em resinas de cromatografia contendo um íon metálico, o primeiro passo de purificação empregado foi a cromatografia por afinidade, utilizando-se a resina “Ni-NTA Superflow” (Qiagen) previamente equilibrada com o tampão B (20mM Tris/HCl pH 8,1; 300mM NaCl e 1% Sarcosil). Após, seguiu-se um gradiente linear de Imidazol (de 0 até 500mM) e a purificação foi monitorada a 280nm. As frações do pico referente à eluição de SelT foram então submetidas a um segundo passo de purificação que consistiu em cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200 (GE). Todas as frações referentes às etapas de purificação foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

5.1.2 Estudo do estado de oligomerização da SelT através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)

O estado de oligomerização da SelT foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes com o intuito de analisar a presença de dímeros de SelT, conformação esta já descrita para outros organismos.⁵⁰ Utilizamos o procedimento “Native PAGE - Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis” que é uma técnica utilizada para o estudo da composição e estrutura de proteínas nativas. Uma vez que a conformação das proteínas permanece intacta durante esta técnica, essa metodologia permite a separação por tamanho, carga resultante e conformação proteica. Para a realização deste estudo empregou-se o equipamento “PhastSystem” (Amersham Biosciences) e géis comerciais “PhastGel gradient media” 8-25% (Amersham Biosciences). O sistema de tampão empregado foi de tiras de tampão geleificado em agarose contendo 0,88M de L-alanina e 0,25M Tris, pH 8,8 fornecidas pelo fabricante do gel (Amersham Biosciences).

Aplicou-se no gel 4,0µL de SelT pura a 1,0mg/mL juntamente com as proteínas padrão que já possuem massas moleculares definidas (tabela 10). A eletroforese foi efetuada sob condições padrão do equipamento (descritas no manual) e as proteínas foram coradas com 0,1% de “Comassie Blue R”, em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%.

Tabela 10 - Massas moleculares das proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado no experimento de gel nativo.

Proteína	Massa Molecular (Da)
Tireoglobulina	669.000
Ferritina	440.000
Catalase	232.000
Lactato Desidrogenase	140.000
Albumina	66.000

Fonte: Elaborada pela Autora.

5.1.3 Ensaio cristalográfico da proteína SelT

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por difração de raios-X é um processo que possui como uma das etapas críticas, a obtenção de um mono cristal de proteína. Um cristal de proteína é formado por moléculas idênticas que se repetem num arranjo tridimensional ordenado e periódico. A formação de um cristal é dependente de vários parâmetros, como pH da solução, temperatura, concentração de proteína e a natureza do tampão e do agente precipitante.⁶⁶ Uma das metodologias utilizadas para a cristalização de proteínas é a difusão de vapor. Alcançadas as condições ideais para a proteína de interesse esta difusão de vapor ocorre lentamente, possibilitando o arranjo das moléculas de forma ordenada, resultando então na formação do cristal e não na formação de um precipitado amorfo.

Com o intuito de buscar uma condição promissora para a cristalização da SelT, foi feita uma varredura com vários tampões, contendo diferentes agentes precipitantes dos conjuntos comerciais de soluções. O robô de cristalização Honeybee (Genomic Solutions) foi empregado nesta triagem inicial com os Kits comerciais da Hampton Research – MembFac com o método de difusão de vapor com gota sentada (sitting drop), sendo o volume da gota composto por 1 μ L da solução protéica e 1 μ L de solução de poço. Os ensaios de cristalização foram realizados a temperatura de 18°C.

5.1.4 Produção de anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais possuem a capacidade de reconhecer e se ligar a antígenos determinados que formem epítomos e quando produzidos no soro de animais, podem ser utilizados como importantes ferramentas em técnicas biológicas como a imunolocalização. Esta técnica utiliza anticorpos específicos para localizar proteínas em um tecido ou organismo.⁶⁷

A proteína SelT recombinante e purificada foi utilizada para inoculação em 3 camundongos por via subcutânea, com 4 aplicações de 50 μ g de antígeno em intervalos de 15 dias, e retirada do soro 1 semana após a última inoculação. O mesmo procedimento foi realizado em 1 camundongo para controle negativo, no qual foi feita a inoculação apenas do tampão da proteína e o adjuvante. O antígeno

foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira inoculação, e em adjuvante incompleto nas inoculações subseqüentes.

5.1.5 Western blot

Essa técnica é amplamente utilizada para detectar proteínas provenientes de amostras homogêneas ou de extratos de tecidos biológicos, que envolve eletroforese em gel para separação, transferência para uma membrana e anticorpos específicos à proteína que são utilizados como sondas. Este método tem sido muito empregado no campo da parasitologia.⁶⁸

A proteína SeIT recombinante e pura, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) e transferida para membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Biosciences) usando um tampão (Tris-base 500mM pH 8,3, glicina 1M, SDS 0,1% e 10% de metanol). Para o bloqueio da reação na membrana foi utilizado solução de leite desnatado 5% em PBS-Tween 0,1% que permaneceu durante 12 horas a 4°C. Posteriormente a membrana foi lavada 1 vez em PBS [1x] e 0,05% tween 20, e incubada com o anticorpo primário diluído em PBS [1x] por 2 horas, em diferentes diluições. O mesmo procedimento de lavagem foi realizado, porém repetido por 3 vezes e a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo IgG (Sigma) na diluição 1:7000 (na mesma solução usada para diluição do anticorpo primário) por mais 2 horas. Foi realizado o procedimento de lavagem como supracitado e as membranas foram reveladas com o reagente ECLTM Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences), e filmes HyperfilmTM MP" (Amersham Biosciences) segundo instruções do fabricante.

5.1.6 Preparo de extrato protéico de *T. brucei*

Esta preparação foi realizada pela Dra. Fernanda C. Costa, conforme descrito por Costa.²⁷ Resumidamente o procedimento se dá pela centrifugação de $1,5 \times 10^8$ parasitas a 1500g por 10 minutos, ressuspensos em tampão PBS, com SDS 1% e Complete, EDTA-free Protease Inhibitor. As células são lisadas passando a suspensão de parasitas através de agulha, 5-6 vezes. O extrato é armazenado a -80°C, quantificado, misturado com tampão de amostra para SDS-PAGE 5X com β -

mercaptoetanol e fervido por 5 minutos. O mesmo procedimento descrito em 5.1.5 foi realizado, porém agora com o extrato protéico total de *T. brucei*.

5.1.7 Experimentos com proteolipossomas

Esses experimentos foram realizados no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em colaboração com o Prof. Dr. Pietro Ciancaglioni e a Dra. Juliana Sakamoto Yoneda.

5.1.7 a) Formação de proteolipossomas

Membranas celulares são constituídas principalmente de fosfolipídios e uma das técnicas no estudo com proteínas de membrana é a inserção destas em lipossomas, formando o proteolipossoma, uma das aproximações mais reais do meio celular em que a proteína se encontra.^{69,70}

Para a obtenção de um proteolipossoma de SeIT foi necessária a obtenção de um lipossoma composto por lipídeos presentes nas membranas dos trypanosomatídeos. O fosfolipídio Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foi dissolvido em clorofórmio para uma concentração final de 2mg/mL, submetido a uma passagem de nitrogênio e deixado 12 horas no dessecador para completa remoção do clorofórmio, o que permitiu a formação de um filme lipídico nas paredes do recipiente. O filme foi ressuspenso em tampão 20mM Tris/HCl pH 8,1; 300mM NaCl porém com alta concentração de detergente (10mg/mL de Sarcosil) e a mistura lipídio-detergente foi incubada a 60°C por uma hora com agitações em vortex a cada 10 minutos e sonicada por 1 minuto em um sonicador de ponta (VibraCell VC-600). Para preparação dos proteolipossomas, foi realizada a co-solubilização de proteína, lipídio e detergente em diferentes proporções, conforme mostra a tabela abaixo.

Tabela 11 - Proporções utilizadas para tentativas de formação de proteolipossomas de DPPC e SeIT.

Proporções		
DPPC (mg)	Proteína (mg)	Detergente (mg)
1	1	10
2	2	10
2	4	10

Fonte: Elaborada pela Autora.

SeIT já purificada foi incubada com a mistura lipídio-detergente por 10 minutos sob agitação em gelo. A remoção do detergente deu-se através a adição de diferentes concentrações da resina Calbiosorb (Calbiochem) em intervalos repetidos de 5, 15 e 45 minutos, seguido de centrifugação a 1400g por 10 minutos. Como última etapa, a mistura foi ultracentrifugada por 1 hora, a 100000g a 4 °C.

5.1.7 b) Formação de lipossomas

Lipossomas são vesículas microscópicas esféricas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolipídios.^{69,70} Nesse ensaio testamos a possibilidade de obter um lipossoma composto por lipídeos presentes nas membranas do *Trypanosoma*. Diferentes concentrações do fosfolipídio DPPC, mostrado na tabela abaixo, foram dissolvidos em clorofórmio e então submetidos a uma passagem de nitrogênio para a remoção deste último, o que permitiu a formação de um filme lipídico nas paredes do recipiente.

Tabela 12 - Proporções utilizadas para tentativas de formação dos lipossomas de DPPC.

Proporções	
DPPC [mg]	Detergente [mg]
20	10
30	10
40	10
40	5
40	1

Fonte: Elaborada pela Autora.

O filme foi ressuspensão em tampão 20mM Tris/HCl pH 8,1; 300mM NaCl e a mistura lipídio-detergente foi incubada a 60°C por uma hora com agitações em vortex a cada 10 minutos, sonicada com um sonicador de ponta (VibraCell VC-600) por 1 minuto. Esta mistura lipídio-detergente foi então ultracentrifugada a 100000g por 1 hora, a 4 °C.

5.1.7 c) Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Utilizando o equipamento da Beckman Coulter (modelo N5 Submicron Particle Size Analyser) foram realizadas medidas de espalhamento dinâmico de luz (“Dynamic Light Scattering” ou DLS), onde o diâmetro médio da vesícula é determinado a partir do coeficiente de difusão das vesículas, D , quando estas, em solução, encontram-se em movimento Browniano. A intensidade da luz espalhada é modulada através deste movimento resultando na ampliação da largura do laser. Através da análise da amplitude espectral da luz, pode-se calcular o tamanho da vesícula e o raio hidrodinâmico pode ser obtido pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (4)$$

em que K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura (Kelvin), η a viscosidade do solvente e R_H o raio hidrodinâmico da vesícula no caso.

Para a verificação da formação do proteolipossoma, o pellet obtido após a ultracentrifugação foi ressuspensão em tampão (20mM Tris pH 8,1 e 300mM NaCl) sem detergente até que a intensidade obtida estivesse entre 5×10^4 e 1×10^6 (faixa requerida pelo equipamento). Anteriormente às medidas, a amostra foi filtrada em filtro com poro de 0,8 μ m.

E para verificação da formação de lipossoma, o pellet obtido foi ressuspensão em tampão (20mM Tris pH 8,1 e 300mM NaCl) sem detergente, filtrado em filtro com poro de 0,8 μ m e submetido à análise por espalhamento dinâmico de luz.

5.1.8 Estágio no Membrane Protein Laboratory

As atividades descritas logo mais, foram desenvolvidas no Membrane Protein Laboratory (MPL) do Diamond Light Source (DLS) e Research Complex (RCaH) situados no Harwell campus no Reino Unido, em colaboração e supervisão da Dra. Isabel De Moraes.

5.1.8 a) Alteração da Cepa de expressão

Proteínas de membrana super expressas em *E. coli* são muitas vezes vistas como proteínas tóxicas ao organismo, levando ocasionalmente a corpos de inclusão. Diante disso fez-se necessário a alteração da cepa de expressão para a C43 (DE3), que é uma cepa que contém mutações genéticas fenotipicamente selecionadas para conferir tolerância a proteínas tóxicas.⁷¹ A cepa C41 (DE3) é derivada de BL21 (DE3) e tem, pelo menos, uma mutação que evita a morte celular por superexpressão de proteínas recombinantes tóxicas. Já a cepa C43 (DE3) é uma derivação da C41 (DE3) que pode expressar um conjunto diferente de proteínas tóxicas.⁷² Portanto, durante o estágio no MPL tivemos a oportunidade de testar a cepa C43 (DE3) e verificamos uma maior porção da proteína na parte solúvel em relação à cepa até então utilizada.

Pré-inóculos de 20mL cada, um contendo cepas BL21(DE3) transformadas com as construções pET28a-selt e outro contendo cepas C43 (DE3) transformadas com a mesma construção foram cultivados em meio de cultura líquido LB (Merck Millipore) por aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seu respectivo antibiótico kanamicina [30µg/mL]. Decorrido esse tempo, cada um dos pré-inóculos foi transferido para um novo frasco com 1 litro de LB+kanamicina na proporção de 1:100, que permaneceu sob agitação de 200rpm a 37° C até atingida uma densidade ótica (Abs_{600nm}) de aproximadamente 0.5. Adicionou-se o agente indutor Isopropil-tio-galactosídeo (IPTG) a cada frasco de cultura para início da expressão que se prolongou por 20 horas sob temperatura de 25° C (cepas C43) ou 4 horas a 37° C (cepas BL21) e agitação.

Terminado o período de indução as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 5000g. As células foram ressuspensas em tampão Fosfato-salino (PBS)

gelado com adição de DNase e inibidores de protease e incubou-se por 30 minutos sob agitação a 4°C. As amostras foram então submetidas ao Cell Disruptor e posteriormente foram centrifugadas a 20201g por 10 minutos. As frações solúveis provenientes desta etapa foram ultracentrifugadas 187000g durante 1 hora a 4°C e neste estágio, preservou-se os pellets para testes com distintos detergentes.

5.1.8 b) Testes de detergentes para solubilização

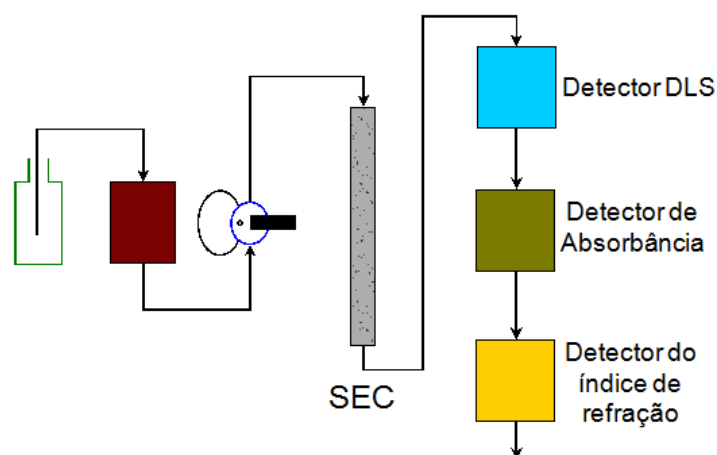
Os pellets foram ressuspensos em tampão PBS e separados em várias alíquotas para testes de solubilização com diferentes detergentes. Os detergentes utilizados foram: N-Lauroylsarcosine Sodium Salt (Sarcosil), n-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM), Lauryldimethylamine N-Oxide (LDAO), n-Dodecylphosphocholine (Fos-Choline-12) e n-Decyl- β -D-Maltopyranoside (DM). As amostras foram deixadas à 4°C por 2 horas sob agitação para completa homogeneização e então submetidas à ultracentrifugação a 187000g por 45 minutos a 4°C. Todas as porções provenientes desta última etapa foram analisadas em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%. Depois dos resultados obtidos, que posteriormente serão mostrados, concluiu-se a melhor cepa e detergente para empregar na expressão da SelT, e partiu-se para expressão em larga escala.

5.1.8 c) Purificação e ensaios no SEC-MALLS

A expressão da proteína SelT foi realizada em 12 litros de meio LB e o protocolo especificado em 4.4.4a foi reproduzido mantendo a indução por 20 horas em temperatura de 25° C. A fração precipitada proveniente da primeira ultracentrifugação, que é composta de membranas celulares foi ressuspensa em tampão (20mM Tris pH 8,1, 300mM NaCl e 1% DDM) e permaneceu sob agitação a 4°C por 2 horas, para a completa homogeneização. Decorrido este período a amostra foi ultracentrifugada novamente e a fração solúvel foi utilizada nos próximos passos. Seguiu-se com as etapas de purificação que consistiram em primeiramente uma resina de níquel onde foram realizadas duas etapas de lavagens em uma de eluição. A primeira lavagem foi realizada com 2 volumes de coluna (VC) com tampão B (20mM Tris pH 8,1, 300mM NaCl, 10mM Imidazol e 0,3% DDM), a segunda com 10 VC com tampão C (20mM Tris pH 8,1, 300mM NaCl, 50mM Imidazol e 0,3%

DDM) e a eluição com 3 VC com tampão D (20mM Tris pH 8,1, 300mM NaCl, 250mM Imidazol e 0,3% DDM). A amostra referente à eluição foi então concentrada e submetida ao segundo passo de purificação por uma cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 (GE). As alíquotas referentes à proteína de interesse foram reunidas, concentradas até 1mg/mL e submetidas à cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multiangular de dispersão de luz (SEC-MALLS), onde a amostra passa por detectores que fazem a sua avaliação em relação ao detergente e tampão no qual a proteína se encontra.⁷³ Esta técnica consiste em uma cromatografia de exclusão molecular (SEC), onde é feita a separação com base nos tamanhos e formas moleculares, acoplado a um detector de dispersão de luz com múltiplos ângulos (SEC-MALLS).⁷⁴ Figura abaixo.

Figura 32 - Esquema representativo da composição e funcionamento do SEC-MALLS. Em azul, verde e amarelo pode ser verificado os três detectores presnetes neste equipamento.



Fonte: Elaborada pela Autora.

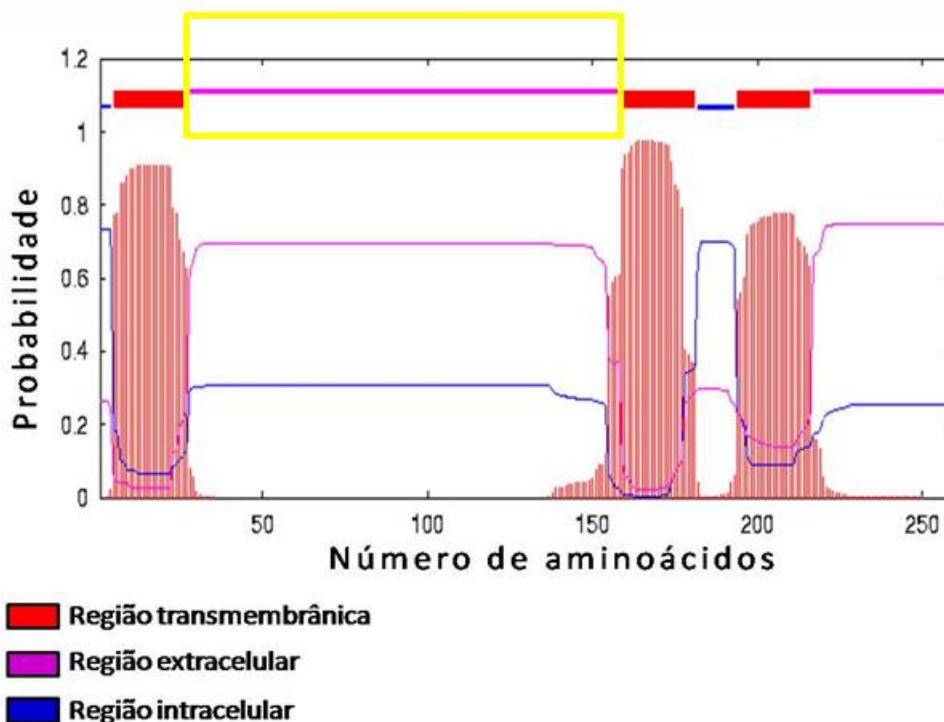
A quantidade de luz dispersa que é medida a cada ângulo é proporcional a massa molecular e a concentração da molécula em análise e também é possível monitorar a interação solvente-soluto, motivo pelo qual esta técnica é muito utilizada em proteínas de membrana.⁷⁴ Em todas as etapas foram retiradas alíquotas e aplicadas em géis SDS-PAGE Tris-Glicina 12% para verificar os resultados, futuramente apresentados.

5.1.9 Experimentos com SelT sem regiões transmembrânicas

5.1.9 a) Amplificação

Após uma predição da sequência que codifica para a proteína SelT utilizando a ferramenta online TMHMM – hélices transmembrânicas em proteínas disponibilizada pelo Center for Biological Sequence Analysis,⁷⁵ foram desenhados oligonucleotídeos que cobrissem somente a porção sem regiões transmembrânicas da proteína (figura 34), para posterior amplificação da mesma.

Figura 33 - Probabilidade das regiões transmembrânicas pelo número de aminoácidos da proteína SelT. Em vermelho as regiões transmembrânicas, em rosa regiões extracelular e em azul as regiões intracelulares. Destacado pelo retângulo amarelo a região que codifica para a proteína SelT sem regiões transmembrânicas.



Fonte: TMHMM.⁷⁵

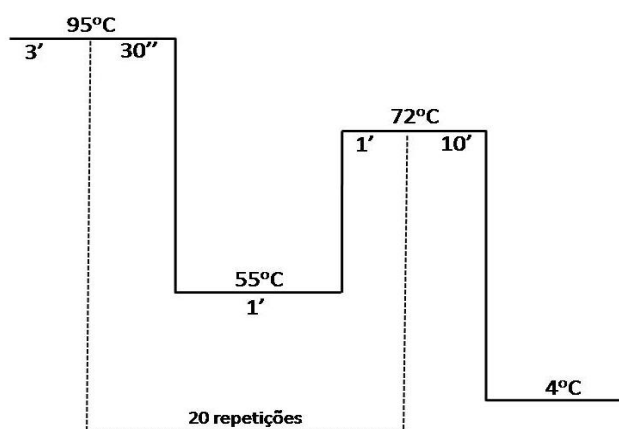
Baseada na figura acima optamos por amplificar a região correspondente aos resíduos de aminoácidos de posição 30^o a 159^o (destacado pelo retângulo amarelo) e a reação para esta amplificação foi realizada segundo condições descritas na tabela abaixo.

Tabela 13 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene das selenoproteínas.

Mistura de reação de amplificação	Volume (μL)
Tampão sem Mg^{+2} [10X]	10
dNTP 10mM (N = A, G, C, T)	2
MgCl_2 50mM	6
Oligonucleotídeo 10pmol/ μL (sense)	20
Oligonucleotídeo 10pmol/ μL (antisense)	20
DNA molde 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1
Taq DNA Polimerase (5U/ μL)	1
H_2O q.s.p.	100

Fonte: Elaborada pela Autora.

A reação foi submetida a um programa de PCR conforme a figura 35, realizada no termociclador PTC – 100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Figura 35 – Ciclo da reação de PCR utilizado para a amplificação do gene para selt sem regiões transmembrânicas.

Fonte: Elaborada pela Autora.

O fragmento de DNA obtido após esta reação de PCR, foi analisado em gel de agarose preparativo (BioRad) 1% marcado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão TAE 1X (8mM Tris-acetato, 0,2mM EDTA pH 8,0) e purificado a partir deste gel utilizando-se o kit “Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf) de acordo com as condições do fabricante. O produto foi quantificado e adenilado de acordo com as condições descritas na tabela 14.

Tabela 14 – Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene selt sem regiões transmembrânicas.

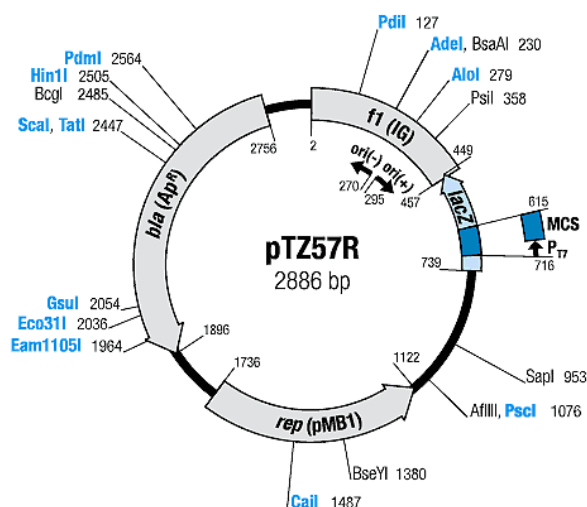
Mistura de reação de adenilação	Volume (μL)
Tampão sem Mg^{+2} [10X]	3
dATP 10mM	3
MgCl_2 25mM	3
DNA amplificado (25ng/mL)	9
Taq DNA Polimerase (5U/ μL)	2
H_2O q.s.p.	30

Fonte: Elaborada pela Autora.

A reação permaneceu por 30 minutos a 70°C e posteriormente, foi feita uma extração com fenol/clorofórmio para retirar a enzima restante da adenilação. Usou-se 2 volumes de etanol absoluto a -20°C e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 4,7 para a precipitação do fragmento de interesse. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, deixado secar e solubilizado em $12\mu\text{L}$ de água. Esse DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260nm e empregado na reação de ligação com o vetor de clonagem.

5.1.9 b) Clonagem no vetor pTZ57R

O vetor pTZ57R (Fermentas) (figura 36) é um conveniente sistema para clonagem de produtos de PCR, pois possui em suas extremidades uma timidina 3' terminal que permite a ligação do produto de PCR diretamente no plasmídeo sem o emprego de enzimas de restrição.

Figura 34 - Mapa do vetor pTZ57R.

Fonte: MANUAL.⁶³

Portanto, para a clonagem da região que codifica para a SelT porém sem regiões transmembrânicas, o fragmento adenilado foi ligado ao vetor pTZ57R de acordo com a reação descrita na tabela 15.

Tabela 15 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene selt ao vetor de clonagem pTZ57R.

Mistura da reação de ligação	Volume (µL)
Tampão [10X]	1,5
DNA adenilado 22ng/µL	5
Vetor pTZ (55ng/µL)	1,5
T4-DNA Ligase	1
PEG 4000	1,5
H ₂ O q.s.p.	15

Fonte: Elaborada pela Autora.

Seguindo as recomendações do fabricante, a reação foi incubada a 22°C por 16 horas, e em seguida foi realizada a transformação do vetor contendo o inserto de interesse em células competentes de *E. coli* DH5α conforme supracitado em 4.1. Para a confirmação dos plasmídeos recombinantes foi realizada PCR de colônia com os oligonucleotídeos e o programa já citado anteriormente. Posteriormente foi

realizada a análise em gel de agarose 1% para verificação da clonagem em prosseguimento dos experimentos.

5.1.9 c) Subclonagem em vetores pET (28a e 29a)

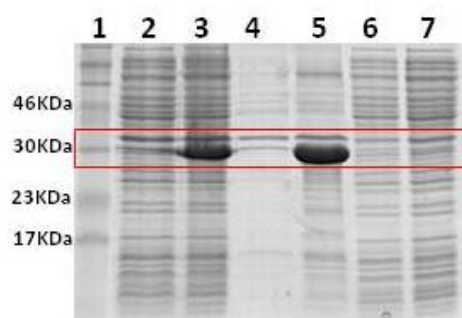
Conforme descrito no item 4.2, após confirmação da clonagem em vetor pTZ57R, seguiu-se para a fase de subclonagem em vetores do sistema pET. Para isso, os DNAs plasmidiais extraídos foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* e os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1%. Como o resultado obtido, não foi o esperado, foram realizadas algumas alterações, como digestões separadas com cada enzima, para investigar o ocorrido, logo mais descrito.

5.2 Resultados e Discussões

5.2.1 Expressão e purificação da proteína SelT

A construção *selt*+pET28a expressa em cepas BL21(DE3) de *E. coli* mostrou um rendimento adequado para dar continuidade aos experimentos pretendidos (figura 37).

Figura 35 - Análise da expressão da SelT em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) Padrão de massa molecular; 2) Controle negativo antes da indução; 3) SelT antes da indução; 4) Controle negativo - fração insolúvel; 5) SelT - fração insolúvel; 6) controle negativo - fração solúvel; 7) SelT - fração solúvel.

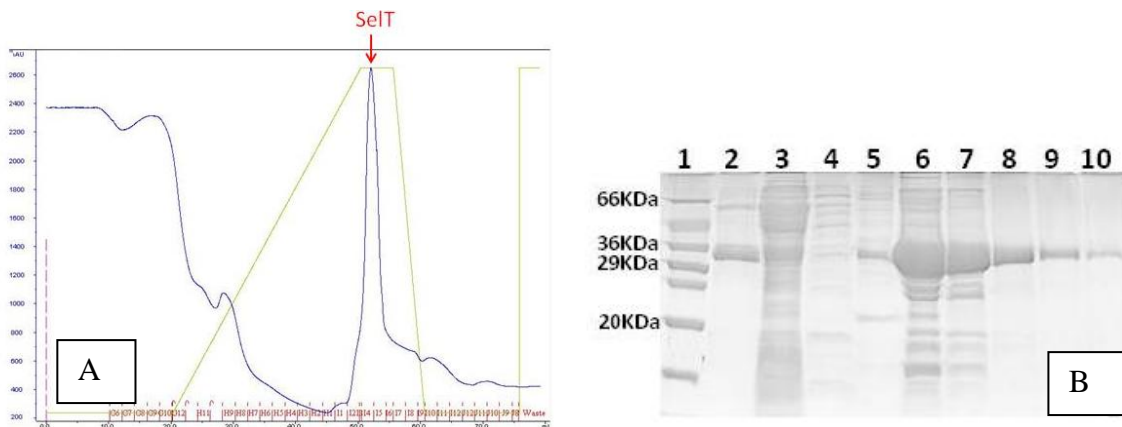


Fonte: Elaborada pela Autora.

Com a finalidade de manter proteínas de membranas em um estado funcional fora da bicamada, é essencial a utilização de detergentes³⁰, conseqüentemente, então quando 1% do detergente Sarcosil foi adicionado ao tampão, grande parte da

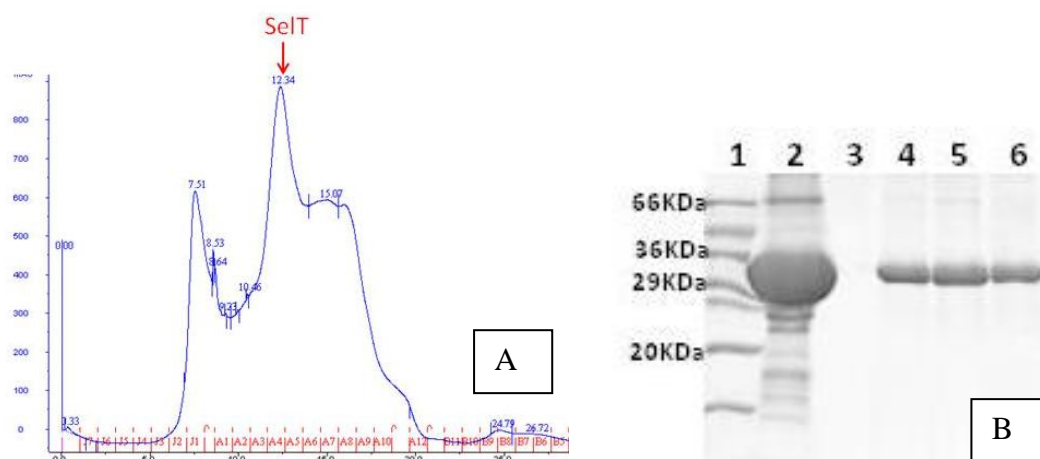
proteína passou a se encontrar na fração solúvel. Uma vez expressa a proteína SelT na fração solúvel, foi necessário purificá-la. A purificação em larga escala foi feita a partir de 500 mL de cultura crescida em meio LB, após indução com 0,5mM de IPTG que permaneceu por 4 horas a 37° C sob agitação. A lise das células foi realizada por adição de lisozima e choque térmico seguido do processo de sonicação. O sobrenadante proveniente da lise celular foi submetido à duas etapas de purificação: afinidade por níquel (figura 38A) e cromatografia de exclusão molecular (figura 39A). Em cada etapa de purificação, todas as frações foram submetidas à análise em gel SDS-PAGE (figuras 38B e 39B).

Figura 36 - A) Perfil cromatográfico em coluna de afinidade por níquel. A seta vermelha indica o pico referente à frações contendo a SelT. B) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da SelT em coluna de afinidade. 1) Padrão de massa molecular; 2) SelT – fração insolúvel; 3) SelT – fração solúvel; 4) e 5) alíquotas referentes à diferentes picos da purificação; 6) e 7) alíquotas referente ao pico da SelT, destacado pela seta na figura 35; 8), 9) e 10) alíquotas dos picos seguintes na purificação.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 37 – A) Perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Superdex 200. A seta vermelha indica o pico referente à frações contendo a proteína SelT. B) Análise em SDS-PAGE 15% da purificação da proteína SelT em coluna de exclusão molecular. 1) Padrão de massa molecular; 2) SelT antes da purificação; 3) vazio; 4) 5) e 6) alíquotas referente a SelT purificada, correspondendo à diferentes alíquotas do pico destacado pela seta.



Fonte: Elaborada pela Autora.

A partir da análise em SDS-PAGE do resultado obtido, concluímos que os passos empregados para purificação da proteína de interesse foram satisfatórios, pois como mostrado na figura 39B a amostra eluída é constituída de apenas uma banda, no caso da proteína SelT.

5.2.2 Estudo do estado de oligomerização da SelT através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes) não apresentou resultados conclusivos devido à presença do detergente junto à amostra, o que tornou essa técnica inadequada para a análise do estado oligomérico da proteína SelT.

5.2.3 Ensaios cristalográficos da proteína SelT

Variando a concentração protéica de 5 a 10mg/mL com os kits comerciais da Hampton Research – MembFac, no qual constam 48 condições, que variam o pH de 4 a 9, contendo diferentes agentes precipitantes como :voláteis, não-voláteis, sais e uma mistura deles, próprios para proteínas de membrana, foram obtidos alguns

cristais que foram submetidos à difração de raio-X no equipado: 007HF Microfocus do IFSC-USP em colaboração Dr. Humberto D´Muniz Pereira, porém revelaram-se tratar de cristais de sal e não protéicos.

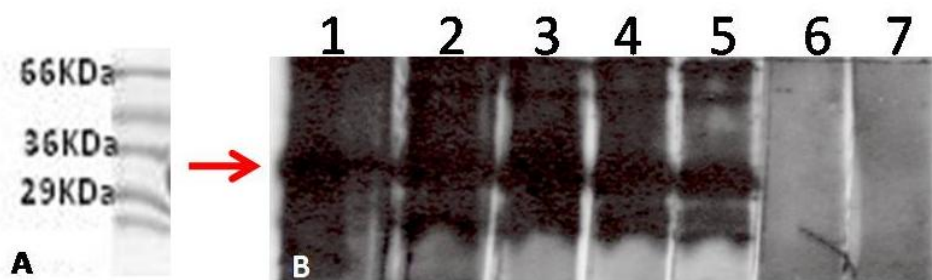
5.2.4 Produção de anticorpos policlonais

A produção de anticorpos policlonais da proteína SelT em camundongos se mostrou eficiente e foi possível sua utilização no passo subsequente.

5.2.5 Western blot

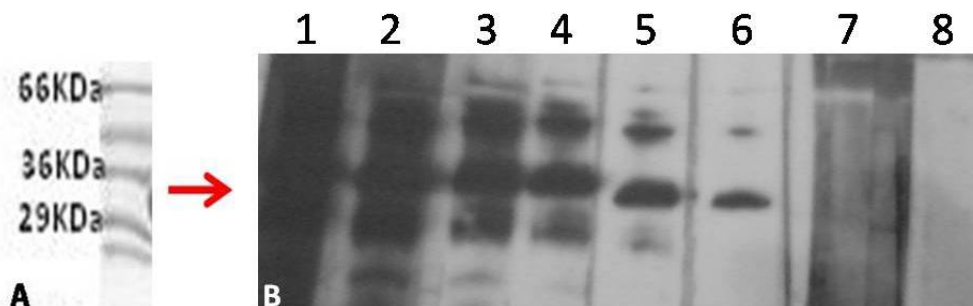
Para testarmos anticorpos policlonais contra a própria proteína SelT pura, utilizamos a técnica de western blot e o resultado obtido é apresentado na figura abaixo. Foram utilizadas as diluições 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 e 1:6000 para a proteína SelT e 1:500 e 1:2000 para o controle negativo (figura 40) e as diluições 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000 e 1:16000 para a proteína SelT e 1:500 e 1:2000 para o controle negativo (figura 41). Com este resultado ficou evidente que mesmo na maior diluição utilizada (1:16000) ainda é visível uma banda na altura da proteína SelT, portanto o anticorpo anti-SelT possuía qualidade para ser utilizado em teste de imunolocalização.

Figura 38 - Análise da produção de anticorpos anti-SelT por western blot. A) Marcador de Massa Molecular. B) 1) Anti-SelT diluição 1:500; 2) Anti-SelT diluição 1:1000; 3) Anti-SelT diluição 1:2000; 4) Anti-SelT diluição 1:4000; 5) Anti-SelT diluição 1:6000; 6) Controle negativo diluição 1:500 e 7) Controle negativo diluição 1:2000.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 39 - Análise da produção de anticorpos anti-SelT por western blot. A) Marcador de Massa Molecular. B) 1) Anti-SelT diluição 1:500; 2) Anti-SelT diluição 1:1000; 3) Anti-SelT diluição 1:2000; 4) Anti-SelT diluição 1:4000; 5) Anti-SelT diluição 1:8000; 6) Anti-SelT diluição 1:16000; 7) Controle negativo diluição 1:500 e 8) Controle negativo diluição 1:2000.



Fonte: Elaborada pela Autora.

5.2.6 Preparo de extrato protéico de *T. brucei*

Na utilização do anticorpo anti-SelT no extrato protéico de *T. brucei*, mesmo utilizando uma diluição menor do que a testada para a proteína recombinante (1:200), não foi possível visualizar nenhuma banda, o que nos impossibilitou de prosseguir com os experimentos de imunolocalização da proteína de interesse. Talvez a fração de SelT que o organismo expressa não seja suficiente para detectar através desta técnica.

5.2.7 Experimentos com proteolipossomas

Alguns números trabalhos publicados revelam que SelT estaria envolvida na homeostase de cálcio, se ligando a ele, então com a formação de um proteolipossoma de SelT, a investigação dessa função seria possível e poderia contribuir, esclarecendo a real função desta enzima. Visando esse objetivo, nossa parceria com o Prof. Dr. Pietro Ciancaglini foi firmada.

Como a composição lipídica da membrana celular é variável em cada organismo, foi realizada, como primeiro passo, uma busca bibliográfica para descobrir a principal composição lipídica da membrana celular dos trypanosomatídeos e assim, diante dos lipídeos disponíveis, criar um proteolipossoma o mais próximo possível ao ambiente celular da proteína no organismo. O DPPC, o fosfolipídio escolhido, é composto por 16 carbonos e uma

cabeça polar com colina semelhante ao encontrado em trypanossomatídeos segundo Kaneda, Nozaki, Furuya, e Colasante.⁷⁷⁻⁸⁰

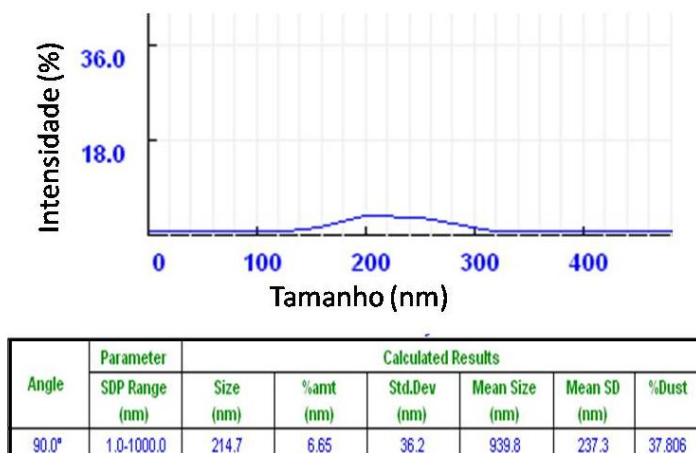
5.2.7 a) Formação de proteolipossomas

Para a formação do proteolipossoma, em todas as diferentes proporções de composição testadas não foi possível obter um sinal com intensidade suficiente no equipamento, talvez devido à falta da formação de moléculas de proteolipossomas ou à formação das moléculas, porém em baixas concentrações, insuficientes para a detecção no equipamento utilizado. Dessa forma partimos para a etapa seguinte no qual foi investigado a possibilidade de formação do lipossoma de DPPC e o uso de detergente e resina em questão e assim investigar a adequação para este caso.

5.2.7 b) Formação de lipossomas

O DPPC é um fosfolípido muito utilizado na reconstituição de proteínas de membrana em lipossomas⁸¹⁻⁸³ e a razão molar ideal para formação do lipossoma, utilizando a resina Carbiosorb para a retirada do detergente Sarcosil foi 40:5, DPPC: Sarcosil, respectivamente. Esse dado pode ser comprovado pelo perfil gráfico obtido quando a amostra foi submetida ao espalhamento dinâmico de luz. O diâmetro do lipossoma obtido foi por volta de 200nm o que é ensejado para lipossomas constituídos de DPPC,^{69,84} portanto a metodologia e as proporções utilizadas foram apropriadas.

Figura 40 - Espalhamento dinâmico de luz da amostra contendo o lipossoma de DPPC mostrando o pico no tamanho referente à sua formação (por volta de 200 nm).



Fonte: Elaborada pela Autora.

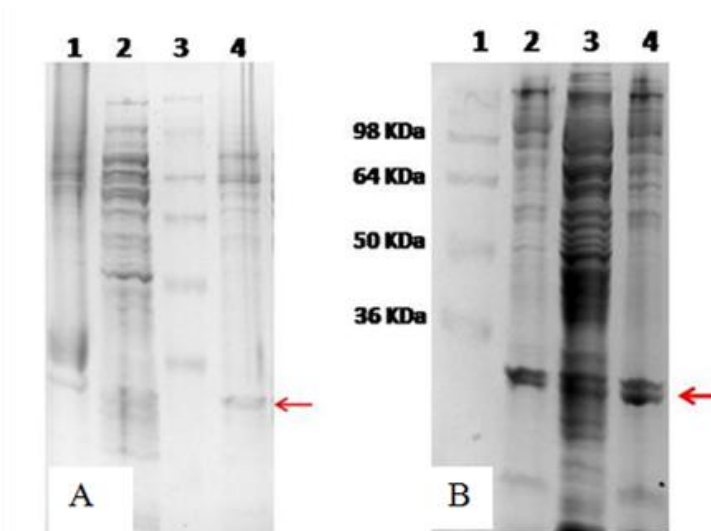
5.2.8 Estágio no Membrane Protein Laboratory

Durante os 21 dias de estágio no MPL, um centro de pesquisa e treinamento de excelência para cientistas interessados em resolver estrutura de proteínas de membrana foi possível obter avanços significativos em relação à proteína SelT, logo mais detalhados.

5.2.8 a) Alteração da Cepa de expressão

O teste de expressão com a cepa C43 (DE3) de *E. coli* mostrou-se eficiente e nos levou a adotar esta nova cepa para a expressão da proteína de interesse pela garantia que ela nos proporcionava em relação a qualidade da proteína expressa, uma vez que estudos comprovam que a expressão de proteínas de membrana em cepas C43 (DE3) de *E. coli* dificilmente são vistas como tóxicas a células, resultando em altos rendimentos de superexpressão.^{85,86} Nas figuras abaixo podemos visualizar e comparar a expressão da SelT nas cepas BL21 (DE3) e C43 (DE3) ambas de *E. coli*.

Figura 41 - Análise da expressão da SelT em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%. A seta indica a banda referente a expressão da proteína SelT. Em A: Teste realizado com a cepa BL21 - 1) Fração insolúvel; 2) Fração solúvel; 3) Padrão de massa molecular e 4) Amostra ressuspensa. Em B: Teste realizado com a cepa C43 - 1) Padrão de massa molecular; 2) Fração insolúvel; 3) Fração solúvel; e 4) Amostra ressuspensa.



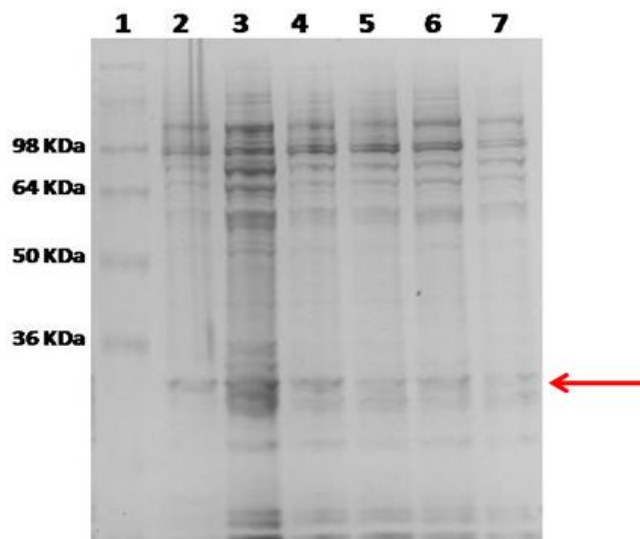
Fonte: Elaborada pela Autora.

É visível a melhora na expressão da proteína SelT (seta em vermelho na figura acima), mesmo não sendo de grande rendimento como outras proteínas. Por se tratar de uma proteína de membrana, esse resultado é satisfatório e nos permitiu dar continuidade aos experimentos pretendidos.

5.2.8 b) Testes de detergentes para solubilização

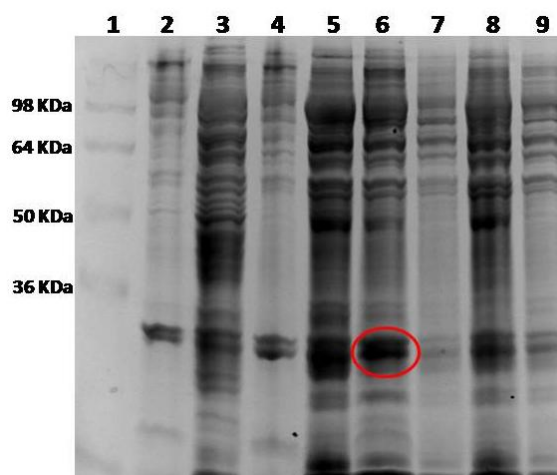
A partir da análise das amostras submetidas à SDS-PAGE Tris-Glicina 12%, podemos concluir que a melhor cepa e detergente para a expressão em larga escala da proteína SelT são: cepa C43 (DE3) de *E. coli* e o detergente DDM, como pode ser verificado pelas figuras 44 e 45.

Figura 42 - Análise da expressão da SelT em extratos de BL21 de *E. coli* em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%. 1) Padrão de massa molecular; 2) Amostra ressuspensa; 3) Amostra solubilizada com Sarcosil; 4) Amostra solubilizada com DDM; 5) Amostra solubilizada com LDAO; 6) Amostra solubilizada com Fos-choline-12 e 7) Amostra solubilizada com DM.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 43 - Análise da expressão da SelT em extratos de C43 de *E. coli* em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%. 1) Padrão de massa molecular; 2) Fração insolúvel; 3) Fração solúvel; 4) Amostra ressuspensa; 5) Amostra solubilizada com Sarcosil; 6) Amostra solubilizada com DDM; 7) Amostra solubilizada com LDAO; 8) Amostra solubilizada com Fos-choline-12 e 9) Amostra solubilizada com DM. O melhor resultado está destacado em vermelho.

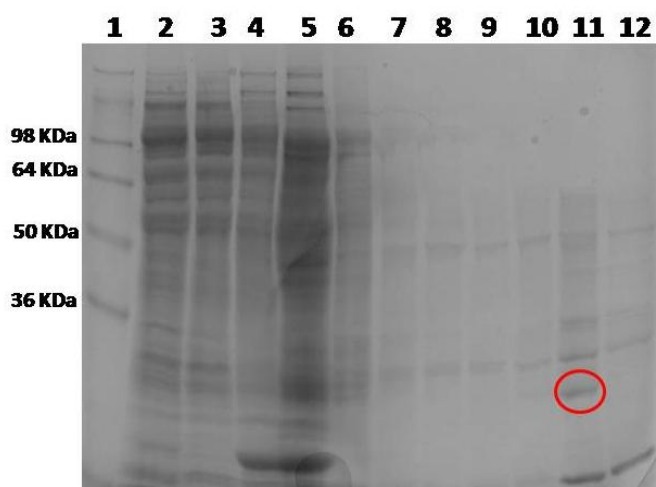


Fonte: Elaborada pela Autora.

5.2.8 c) Purificação e ensaios no SEC-MALLS

No primeiro passo de purificação, a partir da expressão em larga escala com 12 litros de cultura, foi utilizada a resina de níquel e o resultado é apresentado abaixo.

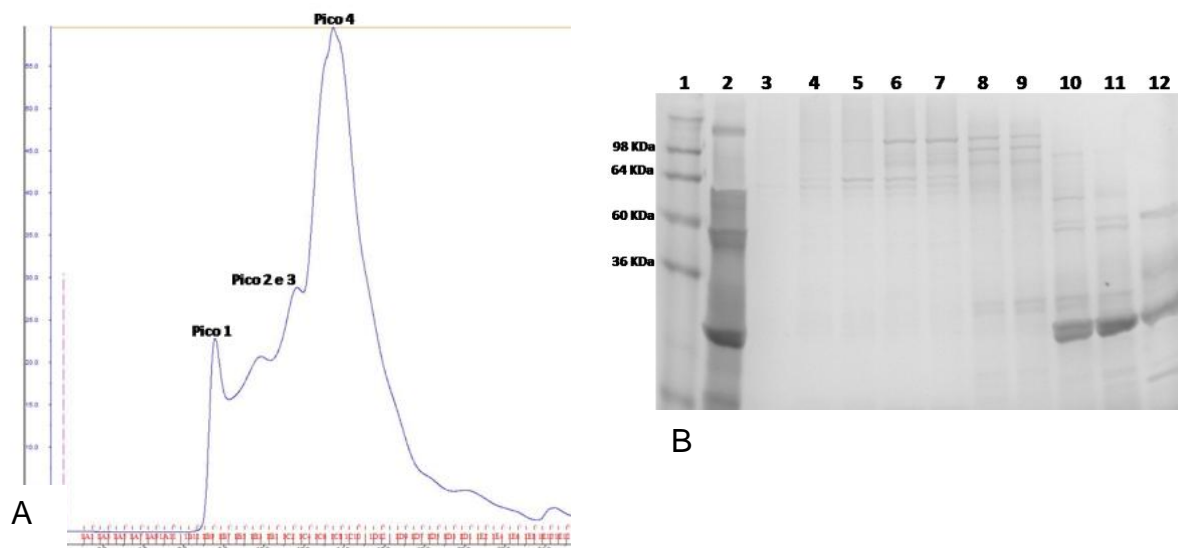
Figura 44 - Análise da purificação em resina de afinidade por níquel da proteína SeIT em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%. 1) Padrão de massa molecular; 2) Amostra antes da purificação Fração solúvel; 3) Fração ressuspensa; 4) Void; 5) lavagem 1 com 10mM Imidazol; 5) lavagem 2 com 10mM Imidazol; 6) lavagem 1 com 50mM Imidazol; 7) lavagem 2 com 50mM Imidazol; 8) lavagem 3 com 50mM Imidazol; 9) lavagem 4 com 50mM Imidazol; 10) lavagem 5 com 50mM Imidazol; 11) eluição com 250mM Imidazol e 12) eluição com 250mM Imidazol.



Fonte: Elaborada pela Autora.

O eluído desta primeira etapa de purificação foi concentrado e submetido à segunda etapa em uma coluna de exclusão molecular Superdex 200. A figura 47A) refere-se ao cromatograma obtido nesta etapa de purificação e a figura 48B) ao gel SDS-PAGE no qual as amostras foram analisadas.

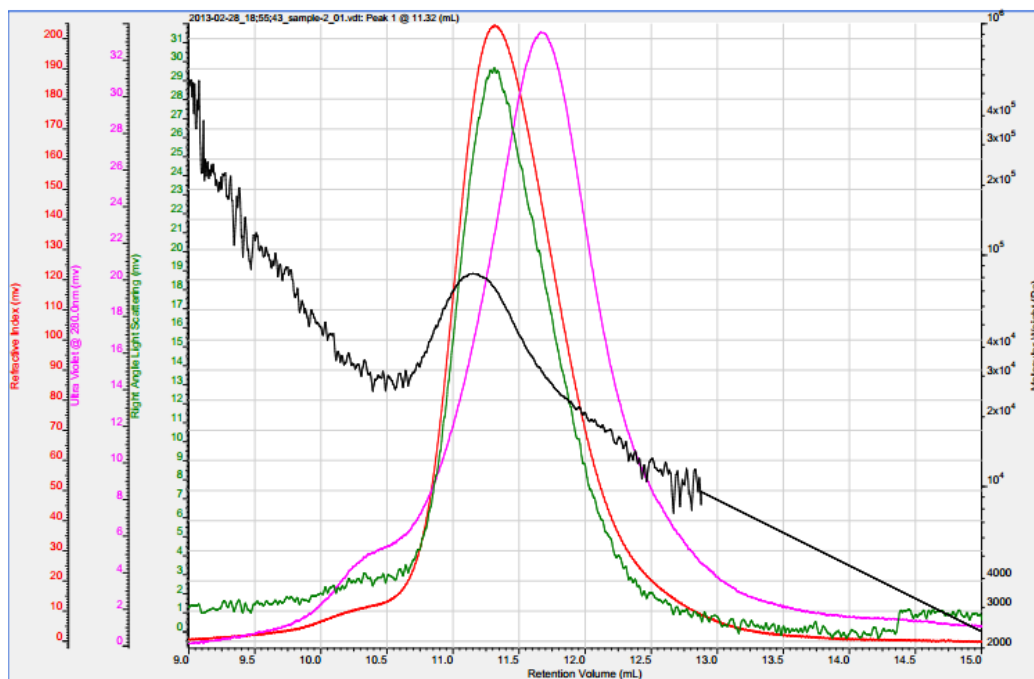
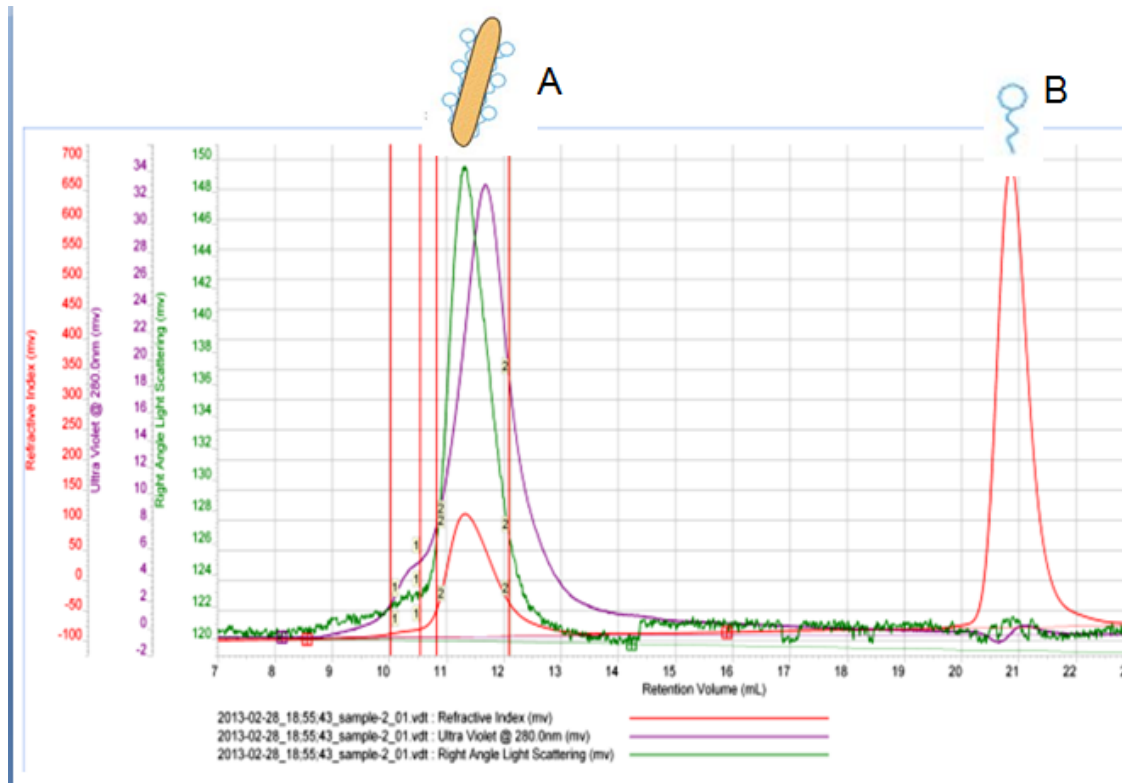
Figura 45 - A) Cromatograma referente à passagem da amostra pela coluna de exclusão molecular Superdex200. B) Análise da purificação na superdex da proteína SeIT em SDS-PAGE Tris-Glicina 12%. (1) Padrão de massa molecular; (2) Amostra antes da purificação; (3) a (5) amostras referentes ao pico 1 do cromatograma; (6) a (9) amostras referentes aos pico 2 e 3 do cromatogram e 10 a 12) amostras referentes ao pico 4 do cromatograma;



Fonte: Elaborada pela Autora.

Analisando o resultado obtido, concluímos que os passos empregados na purificação da proteína de interesse foram satisfatórios, lembrando que por se tratar de uma proteína de membrana, as bandas ainda presentes no eluído eram irrelevantes, não comprometendo a qualidade do complexo proteína-detergente, o que permitiu dar continuidade aos experimentos pretendidos. Para finalizar, o complexo proteína-detergente foi submetido ao equipamento SEC-MALLS, onde foi possível analisar algumas peculiaridades deste complexo e verificar a adequação do tampão no qual a proteína se encontrava. O resultado é mostrado nas figuras abaixo.

Figura 46 - Passagem da proteína no SEC-MALLS. Na análise desses gráficos nota-se que a proteína possui um bom comportamento neste detergente e tampão livre de agregações, ou seja, pronta para a etapa de cristalização. A figura A, junto ao gráfico representa a formação do complexo proteína-detergente, representado em laranja e azul, respectivamente. E em B, somente o detergente na forma livre.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Analisando as curvas obtidas no SEC-MALLS notamos que para os 3 detectores, os picos estão alinhados, ou seja, o complexo proteína detergente foi montado, a proteína e o detergente estão no mesmo pico e o tampão no qual a proteína se encontra é adequado para o uso, tornando possível dar continuidade aos experimentos pretendidos. Na curva em roxo, referente ao monitoramento da proteína a 280nm, nota-se que 2 picos, um bem discreto, e o segundo, em maior intensidade o qual nos fornece uma massa molecular de 27,84 kDa, valor esperado para o monômero da *TbSelT*. Na mesma região, é possível notar o pico do detergente, monitorado pelo índice de refração e representado pela curva em vermelho. Esta curva também possui 2 picos, o primeiro alinhado com o pico da proteína, referindo ao detergente presente no complexo e o segundo, relativo a fração livre do detergente na amostra.

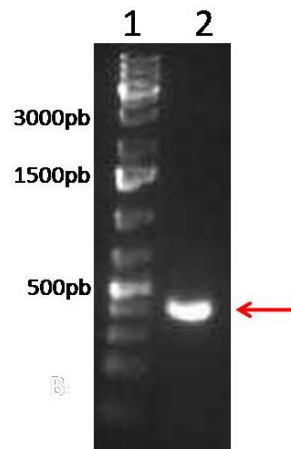
5.2.9 Experimentos com SelT sem regiões transmembrânicas

Objetivando conhecer e desvendar a proteína SelT, realizamos também alguns experimentos com a porção sem regiões transmembrânicas.

5.2.9 a) Amplificação da região que codifica para a proteína SelT sem regiões transmembrânicas

Utilizando oligonucleotídeos que cobrissem somente regiões não-transmembrânicas, foi possível amplificar a região codificadora da SelT *T. brucei* sem regiões transmembrânicas, utilizando a enzima Taq DNA polimerase. O resultado obtido na amplificação é mostrado na figura abaixo.

Figura 47 - Verificação da amplificação do gene *selt* de *T. brucei* sem regiões transmembrânicas em gel de agarose 1% em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene *selt* (400pb).

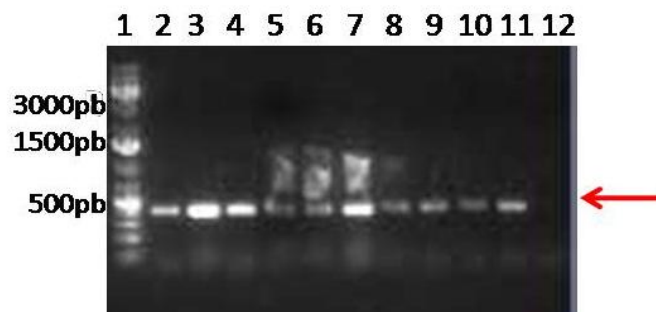


Fonte: Elaborada pela Autora.

5.2.9 b) Clonagem no vetor pTZ57R

Pelo gel de agarose, os fragmentos de DNA obtidos apresentaram uma migração aproximada de 400pb, confirmando a amplificação do gene desejado que, posteriormente foi purificado do gel e adenilado para realizar a reação de ligação no vetor pTZ57R. A seleção de colônias recombinantes foi determinada pela clivagem das construções pTZ57R/*selt* (figura 50), realizada com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*.

Figura 48 - Análise do PCR de colônia visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) ao 11) reação de PCR das colônias de 1 a 10 respectivamente, da construção pET28a-*selt* sem regiões transmembrânicas; 12) controle negativo.

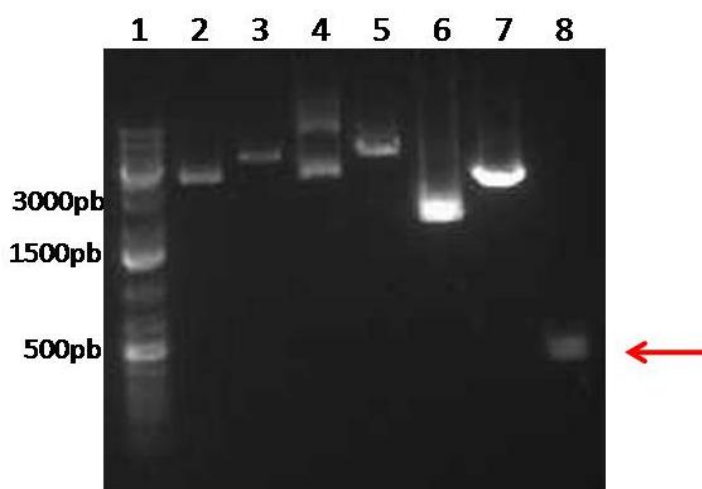


Fonte: Elaborada pela Autora.

5.2.9 c) Subclonagem em vetores pET (28a e 29a)

O inserto selt e os vetores pET foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, porém não foi possível digerir o inserto, como visualizado abaixo.

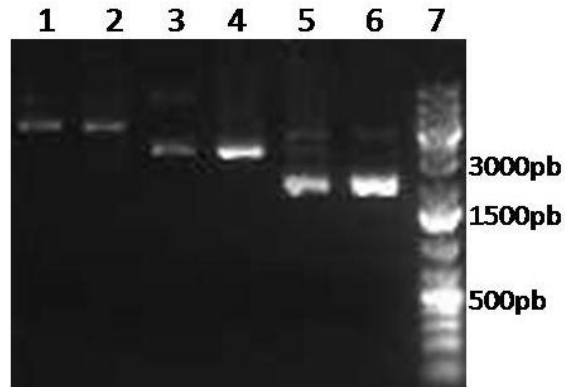
Figura 49 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) pET28 sem digerir; 3) pET28 digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*; 4) pET29 sem digerir; 5) pET29 digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*; 6) Selt sem regiões transmembrânicas em vetor pTZ; 7) Selt sem regiões transmembrânicas em vetor pTZ digerido; 8) Selt sem regiões transmembrânicas amplificada e adenilada.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Fez-se novamente a digestão, porém com as enzimas separadamente (figura 51), e notamos que o sítio de clivagem para a enzima *XhoI* não estava correto ou foi perdido, não ocorrendo, portando a digestão no inserto. Devido ao tempo restante do doutoramento e aos resultados prévios obtidos não serem conclusivos, esses experimentos precisam ser refeitos.

Figura 50 - Análise do padrão de digestão separadamente por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) pET28 digerido com a enzima *NdeI*; 2) pET28 digerido com a enzima *XhoI*; 3) pET28 - controle negativo; 4) SelT sem regiões transmembrânicas em vetor pTZ digerido com a enzima *NdeI*; 5) SelT sem regiões transmembrânicas em vetor pTZ digerido com a enzima *XhoI*; 6) SelT - controle negativo; 7) marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas).



Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota-se pela figura do gel que o controle negativo da SelT sem regiões transmembrânicas (coluna 6), o qual se trata do gene sem digestão, é igual ao padrão de bandas obtidos para a SelT sem regiões transmembrânicas que foi digerido com a enzima em vetor pTZ digerido com a enzima *XhoI* (coluna 5). E como na coluna 2 é possível notar que houve digestão por parte desta enzima no vetor pET, a enzima encontra-se em perfeito estado confirmando portanto que o problema está fragmento amplificado, em relação ao sítio de restrição para *XhoI*, que foi perdido ou não estava correto, impossibilitando a continuidade dos trabalhos naquele momento.

Capítulo 6 Conclusões e perspectivas futuras

O capítulo abordará as conclusões referentes ao trabalho efetuado para a proteína SerRS e as selenoproteínas assim como mostrará as perspectivas futuras para ajudar no entendimento e função dessas selenoproteínas para o trypanosoma.

6 Conclusões e perspectivas futuras

Esse trabalho realizado durante o doutoramento contribuiu direta ou indiretamente para elucidar algumas etapas em relação à biossíntese de selenoproteínas em *T. brucei* assim como desvendar algumas características das selenoproteínas deste organismo. A técnica de anisotropia de fluorescência foi empregada com o objetivo de analisar a interação *TbSerRS* e o tRNAs, finalizando assim os experimentos e concluindo os resultados obtidos no término do mestrado. Foram apresentados os resultados obtidos no decorrer de cinco anos de trabalho, referentes à finalização dos resultados conseguidos no final do mestrado com a *TbSerRs* e análise da interação *TbSerRS*-tRNAs. Diante do fato de que quanto menor o valor de K_d , maior a afinidade do ligante pela proteína,⁵⁹ podemos comprovar que a especificidade de *TbSerRs* ocorre na seguinte ordem decrescente: $\text{SelC} > \text{tRNA}^{\text{Ser7}} > \text{tRNA}^{\text{Ser3A}} > \text{tRNA}^{\text{Ser3B}}$ e o inverso é observado quando analisamos a ocorrência dos tipos de tRNA na célula, homólogos de tRNA^{Ser} . Como *SelC* é um tRNA específico, sua presença na célula é muito baixa, o que responde a alta afinidade encontrada na interação *TbSerRS*-*SelC*. As interações inespecíficas da proteína com o tRNA também foram comprovadas com o experimento *TbSerRS*- tRNA^{Ala} , correspondendo ao encontrado por Manzine.⁵¹ Para finalizar essa parte do trabalho, almejamos finalizar o artigo (Anexo 1) e submetê-lo a publicação.

Já com as selenoproteínas de *T. brucei*, muitos esforços foram efetuados com uma proteína em particular, a *SelK*. Em virtude desta ser uma proteína pequena (10kDa) e termos mais de uma técnica disponível para a resolução de sua estrutura tridimensional, muito tentou-se para obter sua boa expressão. Também pelo *Sec* estar localizado próximo ao C-terminal da proteína e ser possível adicionar o elemento *SECIS* ao gene estudado, assim como modificar o códon Cys-*Sec* e analisar a incorporação de *Sec* na proteína *SelK*. Pretendíamos realizar esta análise em colaboração com o Prof. Dr. Elias Arnér, no Instituto Karolinska, pois acreditávamos que estudos comparativos das selenoproteínas mutantes e selvagens cooperariam para compreensão das funções desta proteína. Porém a fração solúvel expressa obtida não foi suficiente para dar continuidade aos experimentos pretendidos. Em relação à proteína *SelTryp*, por se tratar de uma proteína exclusiva

de *Kinetoplastidae*, ao mesmo passo que é instigante desvendar algo a seu respeito, também é mais dificultoso. *TbSelTryp* apresenta o Sec próximo ao C-terminal o que nos permitiria realizar os experimentos propostos na parceria com o Prof. Dr. Elias Arnér. Porém o resultado uma vez obtido com uma quantidade razoável de proteína expressa na fração solúvel, quando realizado em larga escala, não foi reproduzido, o que impossibilitava dar continuidade aos experimentos pretendidos. Como perspectivas para estas proteínas, cabe obtê-las em uma maior fração solúvel, e para isto, e também visando otimizar o tempo, sugerimos o teste de várias construções e vários vetores para identificar qual produz em maior quantidade, assim como foi realizado para expressão de SelK humana em *E. coli* por Liu.⁸⁷

Com o decorrer do doutorado fomos conhecendo a proteína *TbSelT*. Predições aferem que *TbSelT* é uma proteína íntegra transmembranar possuindo 3 regiões transmembrânicas, fato que dificultou nossas investigações a seu respeito. Primeiramente, pelo grupo de pesquisa não estar rotineiramente acostumado a trabalhar com esta classe de proteínas e não possuir reagentes e técnicas mais específicas para tal investigação. Procuramos parcerias com outros grupos mais especializados nesta classe e com isto foi possível analisar os resultados já obtidos. Anteriormente conseguimos expressar *TbSelT* em cepas BL21 (DE3) de *E. coli* e deixá-la na fração solúvel utilizando o detergente Sarcosil, que foi, dentre os disponíveis e testados, o que melhor decorreu num resultado satisfatório. Porém, como pretendíamos resolver a estrutura tridimensional através da difração de raio-X, o detergente em que a proteína encontrava-se não era adequado para a técnica de cristalização, pois não permite que as moléculas façam interações cristalinas, necessárias para a formação dos cristais.^{88,89} A partir do curso “Structure and function of membrane proteins” realizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) foi possível realizar uma parceria com a Dr^a Isabel de Moraes do Imperial College/Diamond Light Source, e realizar um estágio no Membrane Protein Lab (MPL) testando reagentes e técnicas específicas para esta classe de proteínas. *TbSelT* foi expressa na fração solúvel utilizando a cepa C43 (DE3) de *E. coli* e o detergente DDM foi o que favoreceu esse resultado. Sua purificação foi feita em duas etapas, a primeira utilizando uma resina de afinidade por níquel e a segunda uma cromatografia de exclusão molecular em coluna superdex 200. Pela técnica de SEC-MALLS foi possível analisar que o complexo proteína-detergente foi formado nas condições experimentais testadas. A impossibilidade de reproduzir os resultados

obtidos no MPL quando retomados no Brasil, impossibilitou-nos de dar continuidade nas tentativas de resolução da sua estrutura tridimensional pela difração de raio-X a partir de cristais obtidos pela técnica de cristalização. Apesar desta infelicidade, uma parceria virtuosa entre IFSC/USP-MPL foi estabelecida, o que gerou algumas matérias em mídias, como mostrado em anexo 2. Apesar da parceria com o Dr. José Fernando Ruggiero Bachega ficamos impossibilitados de resolver a estrutura por homologia da *TbSelT* com resultados confiáveis, já que o Score obtido era desfavorável, uma vez que as estruturas disponíveis no banco de dados apresentavam uma baixa porcentagem de homologia. Experimentos realizados com o gene sem as regiões transmembrânicas foram interrompidos após a clonagem em vetor pTZ57 e precisam ser retomados pelo grupo de pesquisa, já que não tínhamos mais tempo hábil para finalizar esses experimentos. Como perspectivas futuras para esta proteína, são sugeridas novas tentativas de reprodução dos resultados conseguidos no MPL, e se possível, reproduzi-los lá, assim como utilizar kits específicos para cristalização de proteínas de membrana. Reproduzir os experimentos para a formação de proteoliposomas agora com o detergente DDM e tentar analisar se SelT faz ligação com cálcio, como descrito em outros organismos.⁹⁰ Uma vez que estes experimentos mostram-se muito promissores para contribuir na investigação da função da SelT. Obter novos oligonucleotídeos para subclonagem da SelT sem regiões transmembrânicas e realizar tentativas de expressão, purificação e cristalização. Tentar a super expressão de selenoproteínas no parasita, pois poderíamos confirmar os dados obtidos por Costa⁶ para experimentos com RNAi, onde após a diminuição da expressão das selenoproteínas individualmente é aferido que *TbSelK* e *TbSelTryp* são importantes para a defesa da célula contra estresse oxidativo, já SelT é importante para a célula em qualquer tipo de estresse.²⁷ Além de testar o vetor para super expressão de proteínas em *Leishmania tarentolae* (pLEXSY) que recentemente foi implantado em nosso grupo.

Desta forma, obter maiores informações sobre as selenoproteínas de *T. brucei* permitiriam avançar cada vez mais no conhecimento destas proteínas e desvendar suas funções no organismo.

Referências

- 1 BOYD, R. Selenium stories. **Nature chemistry**, v. 3, n. 7, p. 570, 2011.
- 2 RENGBY, O. et al. Highly active dimeric and low-activity tetrameric forms of selenium-containing rat thioredoxin reductase 1. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, n. 7, p. 893–904, 2009.
- 3 LOPEZ HERAS, I. et al. Selenoproteins: the key factor in selenium essentiality. State of the art analytical techniques for selenoprotein studies. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 6, p. 1717–27, 2011.
- 4 LÓPEZ-BELLIDO GARRIDO, F.J.; LÓPEZ BELLIDO, L. Selenium and health; reference values and current status of Spanish population. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 5, p. 1396–406, 2013.
- 5 RENGBY, O. **Stretching the genetic code**: incorporation of selenocysteine at specific UGA codons in recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. 2008. 83p. Ph.D. Thesis - Karolinska Institutet, Stockholm, 2008.
- 6 SINGEL, H.: SINGEL, A. (Ed.). **Metal Ions in biological systems**. New York: Marcel Dekker, 1986. 416p. (Methods involving metal ions and complexes in clinical chemistry, v.16).
- 7 JOHANSSON, L. et al. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 1–13, 2005.
- 8 LU, J. ; HOLMGREN, A. Selenoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723–7, 2009.
- 9 KOTE-JARAI, Z. et al. Association between the GCG polymorphism of the selenium dependent GPX1 gene and the risk of young onset prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 5, n. 3, p. 189–92, 2002.
- 10 MUGESH, G. et al. Selenenyl iodide: a new substrate for mammalian thioredoxin reductase. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 16, p. 2848–52, 2003.
- 11 BOEHLER, C.J. et al. Deletion of thioredoxin reductase and effects of selenite and selenate toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS one**, v. 8, n. 8, p. e71525, 2013.
- 12 INSTITUTE OF MEDICINE. **Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. New York: National Academy Press, 2000. Disponível em: <http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9810&page=R14>. Acesso em: 07/2014.
- 13 MEHDI, Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3292–311, 2013.

- 14 CATON-WILLIAMS, J.; HUANG, Z. Biochemistry of selenium-derivatized naturally occurring and unnatural nucleic acids. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 3, p. 396–407, 2008.
- 15 ATKINS, J.F.; GESTELAND, R.F. The twenty-first amino acid. **Nature**, v. 407, n. 6803, p. 463, 465, 2000.
- 16 DRISCOLL, D.M.; COPELAND, P.R. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 17–40, 2003. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073318.
- 17 SILVA, M.T. et al. Selenocysteine biosynthesis and insertion machinery in *Naegleria gruberi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 188 n. 2, p. 87–90, 2013.
- 18 SILVA, M.T. et al. Biological implications of Selenium and its role in Trypanosomiasis treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v.21, n.15, p.1772-1780.2014.
- 19 HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N.(Ed.). **Selenium: its molecular biology and role in human health**. 2nd ed. Berlin: Springer Science, 2006. p.99-114.
- 20 KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439–43, 2003.
- 21 ZHANG, Y. et al. The microbial selenoproteome of the Sargasso Sea. **Genome Biology**, v. 6, n. 4, p R37, 2005.
- 22 RENGBY, O. et al. Assessment of production conditions for efficient use of *Escherichia coli* in high-yield heterologous recombinant selenoprotein synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5159–67, 2004.
- 23 LOBANOV, A. V. et al. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1424–8, 2009.
- 24 CASSAGO, A. et al. Identification of *Leishmania* selenoproteins and SECIS element. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 128–34, 2006.
- 25 IP, C.; GANTHER, H.E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 7, p. 1167–70, 1992.
- 26 ARNÉR, E.S. J. Selenoproteins : What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1296–303, 2010.
- 27 COSTA, F.C. **Validação da via de biossíntese de selenocisteína e selenoproteínas em Trypanosoma por RNA de interferência**. 2012. 147p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

- 28 TURANOV, A.A. et al. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 122–8, 2011.
- 29 PALIOURA, S. et al. Human SepSecS or SLA/LP: selenocysteine formation and autoimmune hepatitis. **Biological Chemistry**, v. 391, n. 7, p. 771–6, 2010.
- 30 ALLMANG, C. et al. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1415–23, 2009.
- 31 BERRY, M.J. Knowing when not to stop. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 5, p. 389–90, 2005.
- 32 XU, X. et al. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. **PLoS Biology**, v. 5, n. 1, p. e4, 2007.
- 33 NELSON, D.L. ; COX, M.M. **Lehninger - principles of biochemistry**. New York: Palgrave, 2004.
- 34 KAMTEKAR, S. et al. Toward understanding phosphoseryl-tRNA^{Cys} formation: the crystal structure of *Methanococcus maripaludis* phosphoseryl-tRNA synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 8, p. 2620–5, 2007.
- 35 ALBERTS, B. et al. **Molecularbiology of the cell**. New York: Garland Science 2002.
- 36 GESLAIN, R. et al. Trypanosoma seryl-tRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNA^{Sec}. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38217–25, 2006.
- 37 IBBA, M.; SOLL, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 617–50, 2000. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.617.
- 38 HATFIELD, D.L.; GLADYSHEV, V.N. How selenium has altered our understanding of the genetic code. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 11, p. 3565–76, 2002.
- 39 LIU, Z. et al. The nature of the minimal “selenocysteine insertion sequence” (SECIS) in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 4, p. 896–902, 1998.
- 40 PAPP, L.V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775–806, 2007.

- 41 LOBANOV, A. V. et al. Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 14, p. 4012–24, 2006.
- 42 SHCHEDRINA, V.A. et al. Structure-function relations, physiological roles, and evolution of mammalian ER-resident selenoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 839–49, 2010.
- 43 DU, S. et al. SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 502, n. 2, p. 137–43, 2010.
- 44 LU, C. et al. Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. **FEBS Letters**, v. 580, n. 22, p. 5189–97, 2006.
- 45 MOROZOVA, N. et al. Antioxidant function of a novel selenoprotein in Drosophila melanogaster. **Genes to Cells**, v. 8, n. 12, p. 963–71, 2003.
- 46 VERMA, S. et al. Selenoprotein K knockout mice exhibit deficient calcium flux in immune cells and impaired immune responses. **Journal of Immunology**, v. 186, n. 4, p. 2127–37, 2011.
- 47 BORDO, D.; BORK, P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. **EMBO Reports**, v. 3, n. 8, p. 741–6, 2002.
- 48 UZMAN, A.(Ed). **Biochemistry and molecular biology education**. New York: Freeman and Company, 2011. p.126–128.
- 49 VELLA, F. The cell:a molecular approach. **Biochemical Education**, v. 26, n. 1, p. 98–99, 1998.
- 50 MOUSTAFA, M.E.; ANTAR, H.A. A bioinformatics approach to characterize mammalian selenoprotein T. **Biochemical Genetics**, v. 50, n. 9-10, p. 736–47, 2012.
- 51 MANZINE, L.R. et al. Assembly stoichiometry of bacterial selenocysteine synthase and SelC (tRNA^{Sec}). **FEBS Letters**, v. 587, n. 7, p. 906–11, 2013.
- 52 MANZINE, L.R. et al. An efficient protocol for the production of tRNA-free recombinant Selenocysteine Synthase (SELA) from Escherichia coli and its biophysical characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 1, p. 80–4, 2013.
- 53 FAIM, L.M. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of selenophosphate synthetases from Trypanosoma brucei and Leishmania major. **Acta Crystallographic**, v. 69, n. Pt 8, p. 864–7, 2013.
- 54 COSTA, F.C. et al. Oxidative stress protection of Trypanosomes requires selenophosphate synthase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 47–50, 2011.

55 EVANGELISTA, J.P. **Estudos moleculares das enzimas Fosfoseril-tRNA Kinase de *Trypanosoma brucei* e Leishmania major e Seril-tRNA sintetase de *Trypanosma brucei*. 2009.**114p.Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

56 LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 3rd ed. Maryland: Springer, 2006. 954p.

57 MANUAL: 5' EndTag™ nucleic acid labeling system. Disponível em : <<http://www.vectorlabs.com/data/protocols/MB-9001.p>>. Acesso em: 03/2014.

58 NAKAMURA, Y. et al. Codon usage database. **Nucleic Acids Research.**, v. 28, n.24,p. 292, 2000.

59 COX, M.M. et al. **Molecular biology: principles and practice.** New York:Macmillan Higher Education, 2011.809p.

60 GENSCRIPT. Disponível em : <<http://www.genscript.com/applications.html>> . Acesso em: 02/2014..

61 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2000.

62 LASERGENE: DNASTAR - Software for Life Scientist, In. Version 5.00. Madison, 2001.

63 MANUAL:Rosetta™ 2(DE3) competent cells.Disponível em : <http://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/Lab%20Resources/manuals/novagen_competent_cells2.pdf>. Acesso em: 05/2014.

64 MANUAL: BL21(DE3)pLysS competent cells.Disponível em:<http://www.med.unc.edu/pharm/sondeklab/Lab%20Resources/manuals/novagen_competent_cells2.pdf>. Acesso em: 05/2014.

65 MANUAL: ArcticExpress™ competent cells. Disponível em : <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pagelId=468&_requestid=540709>. Acesso em: 07/2014.

66 OCHI, T. et. al. Perspectives on protein crystallization. **Progress in Biophysics & Molecular Biology.** Oxford, v. 101, n. 1-3, p. 56-63, 2009.

67 DING, Y. et al. Expression and polyclonal antibody preparation of HPV-11E7 protein. **Journal of Cellular and Molecular Immunology**, v. 30, n. 6, p. 618-22, 2014.

- 68 SARIMEHMETOGLU, H.O. et. al. Application of western blotting for the immunodiagnosis of fasciolahepatica in cattle using excretory/secretory antigens. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science**, v. 108, n. 9, p. 390-392, 2001.
- 69 BATISTA, C.M. et al. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167–179, 2007.
- 70 CIANCAGLINI, P. et al. Proteoliposomes in nanobiotechnology. **Biophysical Reviews**, v. 4, n. 1, p. 67–81, 2012.
- 71 ZOONENS, M.; MIROUX, B. Expression of membrane proteins at the Escherichia coli membrane for structural studies. **Methods in Molecular Biology**, v. 601, p. 49–66, 2010. doi: 10.1007/978-1-60761-344-2_4.
- 72 MANUAL: OverExpress™ competent cells. Disponível em: <<http://www.biocat.com/bc/pdf/OverExpress%20brochure.pdf>>. Acesso em 01/2014.
- 73 BIOLOGY of York: size exclusion chromatography - multi-angle laser light scattering. Disponível em: <<http://www.york.ac.uk/biology/technology-facility/molecular-interactions/mi-equipment/mi-sec-malls/>>. Acesso em: 04/2014.
- 74 FOLTA-STOGNIEW, E.; WILLIAMS, K.R. Determination of molecular masses of proteins in solution: Implementation of an HPLC size exclusion chromatography and laser light scattering service in a core laboratory. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 10, n. 2, p. 51–63, 1999.
- 75 TMHMM - Transmembrane helices in proteins. Disponível em: <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>> Acesso em: 07/2014.
- 76 PRIVÉ, G.G. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. **Methods**, v. 41, n. 4, p. 388–97, 2007.
- 77 NAGAKURA, K. et al. Subcellular fractionation of Trypanosoma cruzi; isolation and characterization of plasma membranes from epimastigotes. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 11, n. 1, p. 23–9, 1986.
- 78 NOZAKI, T. et al. Cloning and characterization of a gene encoding phosphatidylinositol-specific phospholipase C from Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 283–95, 1999.
- 79 FURUYA, T. et al. A novel phosphatidylinositol-phospholipase C of Trypanosoma cruzi that is lipid modified and activated during trypomastigote to amastigote differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6428–38, 2000.
- 80 COLASANTE, C. et al. Proteins and lipids of glycosomal membranes from Leishmania tarentolae and Trypanosoma brucei. **Research**, v. 2, n. 27, p. 27, 2013.
- 81 RONZON, F. et al. Insertion of a glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme into liposomes. **Journal of Membrane Biology**, v. 197, n. 3, p. 169–77, 2004.

- 82 LIMA SANTOS, H. et al. Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. **Colloids and Surfaces**, v. 41, n. 4, p. 239–48, 2005.
- 83 GIOCONDI, M.-C. et al. Remodeling of ordered membrane domains by GPI-anchored intestinal alkaline phosphatase. **Journal of Surfaces and Colloids**, v. 23, n. 18, p. 9358–64, 2007.
- 84 KHVEDELIDZE, M. et al. Structure of drug delivery DPPA and DPPC liposomes with ligands and their permeability through cells. **Journal of Liposome Research**, p.1-12, 2014. In press. doi:10.3109/08982104.2014.911316.
- 85 WAGNER, S. et al. Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14371–6, 2008.
- 86 MA, P.; et al. An efficient strategy for small-scale screening and production of archaeal membrane transport proteins in Escherichia coli. **PloS one**, v. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076913.
- 87 LIU, J. et al. Expression and purification of the membrane enzyme selenoprotein K. **Protein Expression and Purification**, v. 86, n. 1, p. 27–34, 2012.
- 88 SONODA, Y. et al. Benchmarking membrane protein detergent stability for improving throughput of high-resolution X-ray structures. **Structure**, v. 19, n. 1, p. 17–25, 2011.
- 89 NEWSTEAD, S. et al. Insights into outer membrane protein crystallization. **Molecular Membrane Biology**, v. 25, n. 8, p. 631–8, 2008.
- 90 GRUMOLATO, L et al. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. **FASEB Journal**, v. 22, n. 6, p. 1756–68, 2008.

Anexo 1 – Boneco do artigo para submissão e publicação

Expression, purification, characterization and fluorescence anisotropy analysis of protein Seryl-tRNA Synthetase

Evangelista, J.P.¹; Bellini, N. K.^{1,2}; Manzine, L.R.¹; Macêdo, J.N.A.¹ and Thiemann, O.H.¹

¹Laboratory of Protein Crystallography and Structural Biology, IFSC-USP, Av. Trabalhador São-Carlense 400, PO Box: 369, 13560-970, São Carlos/SP, Brazil.

² Biological and Health Sciences Center (CCBS), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Affiliations.

* Address correspondence to this author at the Physics Institute of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlense 400, PO Box 369, 13566-590, São Carlos-SP, Brazil. Tel.: + 55 16 3373-8089; Fax: +55 16 3373-9868. E-mail: thiemann@ifsc.usp.br

Abstract

Selenium is an essential trace element in many life forms. The major biological form of this micronutrient is the selenocysteine amino acid, the 21st amino acid which is present in the selenoproteins. The selenocysteine is encoded by an in-frame UGA codon in mRNA. Incorporation of selenium into selenocysteine (Sec), and subsequently into selenoproteins is started by the action of Seryl-tRNA Synthetase enzyme. Here, we describe cloning of seryl-tRNA synthetase protein (SerRS) of *Trypanosoma brucei* into pET28a(+) vector, its expression, purification, characterization and initial fluorescence anisotropy analysis. The purification consists in steps of ammonium sulfate precipitation, phenyl-sepharose chromatography and His6-tagged affinity. The dimers forms of this protein in solution as confirmed by native gel and dynamic light scattering (DLS), which presented a R_H of 4.32 nm and molecular weight of 110 kDa. The characterization of SerRS by fluorescence anisotropy measurements demonstrated that the dimer dissociation was concentration dependent with a dissociation constant of 109.00 ± 1.87 nM.

Keywords: Selenocysteine, Seryl-tRNA Synthetase, Fluorescence anisotropy.

1. Introduction

The aminoacyl-tRNA synthetases are capable to distinguish between closely related amino acids and binds them to their cognate tRNAs to producing aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) and starting the biosynthesis of proteins. (Bovee_2013, Kang_2003, Vlatka_2010).

This synthesis is initiated by amino acid activation by ATP and form aminoacyl-adenylate (aa-AMP). After the amino acid is transferred to the 3'-terminal ribose of the cognate tRNA, generating aminoacyl-tRNA and freeing up the AMP (rokov_2013 e cusack_1996). Based on the architecture of the catalytic domain, the enzymes are divided in two class: I and II. Class I aaRSs, which are usually monomeric recognize the sequence for inserting the anticodon corresponding amino acid whereas class II AARS not interact with the anticodon region and are normally dimeric (lehninger-2000, Aires_2005). Seryl-tRNA synthetase (SerRS) is a dimeric class II aminoacyl-tRNA synthetase responsible for the aminoacylation of tRNA^{[Ser]Sec} (4). This is one of selenocysteine (Sec) incorporation steps, the principal form of selenium in proteins (1). Interested in this pathway, we performed initial molecular studies of the Seryl-tRNA synthetase of *Trypanosoma brucei*.

For this purpose, the *serrs* gene was cloned into pET-28a(+) expression vector. The His6-tagged *serrs* was expressed at high levels in *E. coli* BL21 (DE3) strain and the purified protein was obtained by a combination of ammonium sulfate precipitation, phenyl-sepharose chromatography and metal chelate affinity. To confirm the native conformation of the pure SerRS, native gel and dynamic light scattering (DLS) assays were performed and fluorescence anisotropy measurements demonstrated its oligomeric state. After purification steps, the protein remained forms dimers in solution, which has R_H of 4.32 nm, molecular weight of 110 kDa and a dissociation constant of 109.00 ± 1.87 nM, data corresponding to literature. All tRNAs were synthesized by an initial PCR amplification and transcript in vitro. They were used in fluorescence anisotropy measurements together with SerRS and showed different dissociation constants and they are associated to cellular availability of tRNA.

Experimental

Materials. Restriction enzymes were from New England – Biolabs. Oligonucleotides were synthesized by Invitrogen. PCR kits were from Stratagene. The following were purchased: pTZ and pET-28a vectors from Promega and Clontech, respectively; Competent cells of *Escherichia coli* BL21 (DE3) from Novagen; phenyl-sepharose and nickel affinity columns from GE Healthcare and Sigma – Aldrich, respectively. All other chemicals were of the highest purity available and were used without further purification. All buffers were prepared using deionized water and were sterilized in an appropriate manner if necessary.

Cloning, Expression and Purification of Seryl-tRNA Synthetase. *serrs* cDNA was amplified using *Pfu* DNA polymerase and the pair of primers: forward, 5'-ACGTACGATGCATATGGTGCTTGATATACAGCTGTTTCGAGACG-3', and reverse, 5'-GCCTCCCTTGCTGTGGGCTGTTCCCCCTCACTACTATCGAGTCTAG-3' with *Nde* I and *Xho* I restriction sites respectively. The product was cloned into pTZ vector and sequenced.

After digestion of *serrs*-pTZ, the fragment was purified from agarose gel using Perfectprep Gel Clean-up kit (Eppendorf). The ligation of *serrs* fragment into *Nde* I -*Xho* I

digested pET-28a was performed overnight in the presence of T4-DNA ligase (New England Biolabs). The samples containing a nucleotide sequence coding for six histidines, placed upstream and in frame with the serrs insert, were transformed into chemically competent *E. coli*/BL21 (DE3) cells. A single colony obtained on Luria–Bertani (LB)—kanamycin plates was then selected and grown for preparation of glycerol freezer stocks and sequencing using ABI PRISM 377 DNA Sequencer (AB Applied Biosystems). *E. coli* BL21(DE3) cells harboring serrs were grown overnight in 5mL of LB medium (6) supplemented with 30µg/mL kanamycin at 37°C. The pre-culture was used to inoculate 500mL of LB supplemented with 30µg/mL kanamycin and grown at 37°C until the absorbance at 600 nm reached 0.6-0.8. At this point, 10mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) was added to induce SerRS expression and cells were incubated at 20°C for 16 h. The induced bacteria were harvested by centrifugation at 6,000g at 4°C for 15 min and the cells were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Prior to purification, bacterial cells from 500 mL of culture were thawed and resuspended in 20 mL of lysis buffer A (20 mM Tris-HCl p,H 7.8, 300mM NaCl) and 10 µg/mL of lysozyme(Sigma)was added. The suspension was incubated on ice for 30 min and cells were disrupted by sonication at approximately 110 W for 4 X 15 s pulses (with 1 min delay between pulses) using a 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) to reduce viscosity. Centrifugation was performed at 14,000g for 30 min to remove insoluble cell debris and the clear supernatant obtained constituted the crude protein preparation. The supernatant from the above step was mixed with ammonium sulfate 60% and then centrifugated at 14,000 g for 50 min. Again the supernatant was applied to Phenyl-Sepharose column (GE Healthcare) equilibrated with buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 300mM NaCl, 2 M Ammonium Sulfate) . The column was washed with 10 column volumes of buffer B after which a 200-ml of a linear salt gradient from 2 to 0 M Ammonium sulfate was applied. The fractions were analysed by 15% SDS–PAGE. Fractions containing SerRS were collected and applied in a nickel affinity column (Sigma – Aldrich) equilibrated with buffer A. The protein was eluted with elution buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 300mM NaCl, 250 mM Imidazole and 5% glycerol)visualized on 15% SDS–PAGE.

Protein concentration measurements. Protein concentration was determined by the method of Bradford (7) with bovine serum albumin (Sigma) as reference standard, using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Native gel analysis. Native gel electrophoresis was accomplished in a PhastSystem (Amersham Biosciences). The method consisted of separation according to the charges and size of the protein. The samples are applied to the “PhastGel gradient media” (gradient 8 – 25%) for 15 V h at 200 V of voltage. Four µL of SerRS pure at 1,0 mg / mL were applied with

molecular weights protein standards from Amersham Biosciences kit . After approximately 40 min the gel was stained with 0.1% PhastGel Blue R (Amersham Biosciences) solution in 30% methanol and 10% acetic acid. To visualize the bands the gel was destained in a solution containing 30% methanol and 10% acetic acid until the background was clear.

Dynamic Light Scattering assays. Measurements of dynamic light scattering (DLS) using the equipment "Protein Solutions Dynapro" were employed to determine the oligomeric state of SerRS in solution. The DLS technique measures the intensity of light scattered by molecules in solution, i.e., the translational diffusion coefficient. In practice, the macromolecules in solution are not spherical and the radius calculated from the diffusion coefficient of particles provides an estimate of the apparent size of the hydrated or solvated particle. This measure is called "hydrodynamic radius". The hydrodynamic radius includes the effect due to the shape and hydration of the particles from the estimated models. Thus, the technique can provide information about the structural homogeneity of the sample, detect the presence or absence of aggregates and also provide an estimate of the molecular weight of molecules (8.) The parameters used in these assays are shown in Table 1.

In vitro transcription of tRNAs. All tRNAs used in the experiments were synthesized by an initial PCR amplification that was carried out for each tRNA using sets of primers which have an overlap region with 20 bases approximately. The primers sequences were: tRNA^{Ser} (3a-isoform) 5'-
TAATACGACTCACTATAGGGTCACCATACCCAAGTGGTTACGGGGACTGACTAGAAATC-
 3' (the promoter sequence is underlined) and 5'-
 TGGCGTCACCAGCAGGATTTCGAACCTGCGCGGAGATCGCAACTGATTTCTAGTCAGT
 CCCC-3'; tRNA^{Ser} (3b-isoform)

5'-
TAATACGACTCACTATAGGGTCACCATACCCAAGTGGTTACGGGGACTGACTCGAAATC
 -3' and 5'-
 TGGCGTCACCAGCAGGATTTCGAACCTGCGCGGAGATCGCAACTGATTTCTAGTCAGT
 CCCC-3'; tRNA^{Ser} (7a-isoform) 5'-
TAATACGACTCACTATAGGGCAAACGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGCCTGCCTGCTAAG
 C-3' and 5'-
 TGGCGCAAACGGAAGGGTTTCGAACCTTCGCGTGAGATCACACCTGCTTAGCAGGCAGG
 CGCC-3'; tRNA^{Sec} (SecI) 5'-
TAATACGACTCACTATAGGGCCACAAUGAGCUCAGCUGGUGCUGGGUGCGGGCUUCA
 AACCCGUAG - 3' and 5'-
 TGGCGCCACAAAGGCCGAATCGAACGGCTGCGAGTCCAACCTCGCCTACGGGTTTGAAG
 CCCGCACC - 3'; tRNA^{Ala} (control) 5'-
TAATACGACTCACTATAGGGGATGTAGCTCAGATGGTAGAGCGCCCGCTTAGCATGCG-

3' and 5'
 TTGTGGAGAAGTTGGGTATCGATCCCAATACCTCCCGCATGCTAAGCGGGCGCTC-3'

(Sigma). The PCR products were DNA double-stranded fragments carrying out a RNA polymerase promoter region at the 5' end and a CCA terminal at 3' end. DNA fragments were purified from 2% agarose gel using Perfect Gel Cleanup kit (Eppendorf) and were used as the template for *in vitro* transcription reactions using the MEGAscript kit (Ambion, Austin, TX, USA) to generate the nucleotides single-stranded RNA fragments. For titrimetric assays, tRNA^{Sec}, tRNA^{Ser} isoforms and tRNA control were labeled with fluorescein maleimide as described.

Circular dichroism spectroscopy (CD). All non-labeled tRNAs were submitted to CD measurements performed in a Jasco J715 spectropolarimeter coupled with a Peltier thermocontroller and realized as described to confirm the correct folding.

Fluorescence anisotropy assays. Fluorescence anisotropy experiments were carried on the ISS PC1 spectrofluorimeter equipped with Glan-Thompson polarizers (ISS, Champaign, IL). SerRS was labeled by incubation with fluorescein isothiocyanate ((FITC) Sigma) in proportion of 1:10 in buffer D (50 mM potassium phosphate pH 7.8; 10 mM NaCl; 5% glycerol; 5 mM DTT), at 4°C for 12 h. Free FITC was separated from labeled SerRs using Hitrap desalting column (GE Healthscience, Madison, WI) equilibrated with buffer D. Protein labeling was confirmed by absorbance spectrophotometry, showing both protein and fluorescein contributions in the absorption spectra. Fluorescein-SerRS at a concentration of 20 nM was titrated with unlabeled SerRS at 18°C in buffer D. Fluorescence anisotropy measurements were performed at 480 nm and emission measured through a band-pass filter with a cutoff of 50% at 515 nm, as previously described (9). Data point represents the mean of at least five measurements after stabilization for each concentration of unlabeled protein. The resulting anisotropy change was used to calculate the dissociation equilibrium constant by adjusting Eq. 1 to the experimental data:

$$f_d = [\text{SerRS}] / (K_d + [\text{SerRS}]) \quad (1)$$

where f_d is the fraction of protein dimers and K_d is the dissociation constant. As the association led to a slight increase in fluorescence intensity, we applied correction:

$$fd = (A_{\text{obs}} - A_m) / [(A_{\text{obs}} - A_m) + (F_d/F_m)(A_d - A_{\text{obs}})] \quad (2)$$

where A_{obs} , A_m , and A_d are, respectively, the SerRS-labeled anisotropy values observed at a given concentration of unlabeled SerRS, for the monomeric SerRS and dimeric SerRS (10). The corrections performed on changes in fluorescence intensity make use of the total fluorescence intensity I_T directly provided by the instrument software, according to:

$$I_T = I_{II} + 2I_{\perp} \quad (3)$$

where $I_{||}$ and I_{\perp} are the time-independent steady-state values for fluorescent intensity polarized parallel and perpendicular, respectively, to that of the excitation beam. Binding data were analyzed using SigmaPlot Windows Version 10.0.

tRNAs fluorescence anisotropy assays. These experiments were performed as described above. In brief, aliquots of concentrated solution of SerRS protein were sequentially added to 10 nM of fluorescein-labeled tRNAs. All experiments were performed at three replications and the maximal dilution was less than 20%.

Results and Discussions

Cloning, Expression and Purification of Seryl-tRNA Synthetase. The insert coding for *serrs* was excised from *serrs*-pTZ construction with *NdeI* and *XhoI* restriction enzymes and inserted into pET-28a(+) vector. The ligation product was then transformed into *E. coli*/BL21 (DE3) competent cells. To confirm the presence of *serrs*-pET recombinant plasmids, plasmid DNA obtained from different recombinant colonies was digested with both restriction enzymes and examined by electrophoresis in 1% agarose gel. DNA sequencing revealed the open reading frame (ORF) of the intracellular region of *serrs* and the cluster of six histidine residues for protein purification by metal affinity chromatography. After several attempts to determine the optimal conditions for *serrs* expression the production was optimized at 20 °C with 0.1 mM of IPTG used for induction. Cells were grown until optical density of 0.6- 0.8 at 600 nm. To evaluate the time course for SerRS expression, bacteria were harvested every hour for 16 h following induction and total cell lysates analyzed on SDS-PAGE. A band at the expected molecular weight (54kDa) was detected in induced culture and absent in the control of *E. coli* BL21 (DE3)/pET-SerRs (Fig. 1). The over-expressed recombinant His6-SerRs was resuspended in buffer A before sonication to reduce the size of cell debris and nucleic acid. The clear lysate obtained after centrifugation contained the His6-SerRS soluble fraction. Purification of SerRS was achieved after 60% ammonium sulfate precipitation, Phenyl-sepharose and Ni-NTA affinity columns (Fig. 2 A and 2 B).

Native gel. Polyacrylamide gel electrophoresis in native conditions (no denaturant) showed after all steps of purification that the protein studied, presented only one oligomeric state (Fig. 3). The molecular weight of TbSerRS protein is between the standards with a mass of 140kDa and 232kDa, but due those standards refer to globular proteins and protein forms move in a different way, justify the fact of the studied protein was not in the position of the expected size (110 kDa). This result is consistent with a trimer, but when compared with data obtained from DLS and knowing that the charges strongly influence the native gel electrophoresis, we conclude that the protein was in a dimeric state and has no aggregates or degradations, since a single band was visible in native gel. We should also consider that as described in the literature, all class II of aaRS are dimers and SerRS that interacts with a

tRNA, which is negatively charged, so the SerRS has a large positively charged region, justifying its shift in native gel.

Dynamic Light Scattering. DLS assays show an indication of the structural purity of the preparation of protein and provide a way to estimate the hydrodynamic radius for the sample analyzed. In the case of recombinant SerRS, the measurement was performed using protein at of 5mg/ml. The results show a homogeneous protein in solution, with molecular weight of 103 kDa and hydrodynamic radius of 4.32 nm(Figure 4). These values are consistent to those found for this enzyme of other organisms and the value obtained in programs of predictions through the sequence inserted.

Fluorescence anisotropy assays. To investigate the solution behavior of SerRS and try to determine the equilibrium dissociation constant of the SerRS dimer, we labeled the recombinant protein with fluorescein isothiocyanate (FITC), which reacts with amino terminus of proteins and the ϵ -amino group of lysines (11). Equilibration of 20 nM FITC-SerRS with increasing amounts of unlabeled SerRS (from 0 nM to 250 mM) led to an increase in fluorescein fluorescence anisotropy values, indicating oligomerization (Fig. 5). As we known from DLS and native gel electrophoresis studies that SerRS was dimeric in native form, these changes in anisotropy values as a function of SerRS concentration indicate a monomer-dimer equilibrium. The SerRS dimer dissociation constant of 109.00 ± 1.87 nM was calculated by adjusting Eq. 1 to experimental data.

In order to investigate the mechanisms of SerRS binding to tRNAs, we performed isothermal binding assays with SerRS and fluorescein-labeled tRNAs. Ten nM of tRNAs were separately and progressively titrated with increasing amounts of unlabeled SerRS. For all tRNAs, we observed an increase in fluorescence anisotropy values as a function of SerRS concentration. Defined saturation plateaus were observed for tRNA^{ser7} and tRNA^{sec} in contrast, the others tRNAs tested (isoforms 3A and 3B) displayed non-saturation curves indicating that apparently tRNA^{ser7} and tRNA^{sec} have higher affinity for SerRS than the others. For tRNA^{sec}-SerRS and tRNA^{ser7}-SerRS interactions we could estimate a K_d of about 600 nM and 1000 nM respectively, which agrees with literature binding constant for aaRS-tRNAs interactions.

Conclusions

The protein Seryl-tRNA Synthetase belongs to IIa group of the aminoacyl-tRNA Synthetases, which proteins were dimers and even though it lack the C-terminal anticodon binding domain (12). In the present paper we described heterologous expression, purification of SerRS of *Trypanosoma brucei* and its characterization by SDS-PAGE, native gel electrophoresis and DLS. Taken together all the results of these investigations, we conclude that SerRS purified was in a dimer oligomeric state necessary for further structural and

functional studies. Fluorescence anisotropy experiments have revealed that at concentrations above 150nM the protein is found only in dimeric form, factor necessary for the interaction with the tRNA's.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants No. 06/54306-0) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**.Sweden, v. 284, p. 723-724, 2008.
2. YUAN, J.; et al. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA, v. 103, n. 50, p. 18923-18927, 2006
3. GANICHKIN, M.; et al. Structure and Catalytic Mechanism of Eukaryotic Selenocysteine Synthase. **The Journal of Biological Chemistry**.Nebraska v. 283, p. 5849-5865, 2008.
4. XU, X.; et al. Biosynthesis of Selenocysteine on Its tRNA in Eukaryotes.**Public Library of Science**. United States of America v. 5, p. 95-105, 2007.
5. YUAN, J.; et al. Amino acid modifications on tRNA. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**. New Haven V. 40(7), p. 539–553, 2008.
6. BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. **J Bacteriol.**; v. 62, p.293–300, 1951.
7. BRADFORD, M..A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.**Anal.Biochem**. v. 72, p.248–254, 1976.
8. BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics**. New York: Wiley-interscience publication, 1979.
9. LIMA, L. M. T. R., and J. L. SILVA. Positive contribution of hydration on DNA binding by E2c protein from papillomavirus.**The Journal of Biological Chemistry**.v. 279, p. 47968–47974. 2004.
10. MALENCIK, D. A., and S. R. ANDERSON. Peptide binding by calmodulin and its proteolytic fragments and by troponin C. **Biochemistry**.v. 23, p. 2420–2428. 1984
11. MCKINNEY, R., L.; et al. **Conjugation methods in immunofluorescence**. 1976.. J. Dent. Res. 55:A38–A44.
12. IBBA, M.; FRANCKLYN, C.; CUSACK, S. (Eds). **The Aminoacyl-tRNA Synthetase**.Georgetown: Landes Bioscience, 2005.

(13) ENGELHARDT, H.; FORCHHAMMER, K.; MULLER, S.; GOLDIE, K. N.; BOCK, A. Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA(sec)-enzyme complex. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 23, p. 3461-3467, 1992.

Table Captions

Table 1 - Parameters used in the DLS experiment.

Figure Captions

Figure 1: His6-SerRS expression. SDS-PAGE was carried out on a Mini V8-10 Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (Life Technologies-Gibco-BRL) and proteins detected by Coomassie brilliant blue staining. Lane 1, molecular weight standards: 67.00 kDa, bovine serum albumin; 45.00 kDa, egg albumin (Sigma); lane 2, total lysate of BL21 (DE3) culture with His6-SerRS; lane 3, total lysate of control BL21 (DE3) culture before induction with IPTG. Black arrow indicates a band of approximately 53 kDa corresponding to His6-SerRS.

Figure 2: His6-SerRS purification. SDS-PAGE was carried out on a Mini V8-10 Vertical Gel Electrophoresis Apparatus (Life Technologies-Gibco-BRL) and proteins detected by Coomassie brilliant blue staining. (2A) Lane 1, molecular weight standards: 67.00 kDa, bovine serum albumin; 45.00 kDa, egg albumin (Sigma); lane 2 and 3, insoluble and soluble fraction with 60% ammonium sulfate; lane 4 soluble fraction before phenyl-sepharose, lane 5, 6, 7, 8, 9, 10 different fractions collected in phenyl-sepharose. Black arrow indicates a band of approximately 53 kDa corresponding to His6-SerRS. (2B) Lane 1, molecular weight standards: 67.00 kDa, bovine serum albumin; 45.00 kDa, egg albumin (Sigma); lane 2 soluble fraction before Ni-NTA affinity; lane 3, 4, 5, 6 and 7 washes from Ni-NTA affinity; lane 8, 9 and 10 elution fraction corresponding to His6-SerRS.

Figure 3: Native gel gradient 8-25% polyacrylamide, the black arrow shows the band on the SerRS. Lane 1, molecular weight standards and lane 2, SerRS.

Figure 4: Result of DLS assay of 5 mg/mL of TbSerRS protein

Figure 5: Equilibrium fluorescence anisotropy. Measurements of SerRS monomer-dimer interaction were performed as described in experimental procedures.

Table 1

Parameters	
Solvent	5% Glycerol
Acquisition Time	2,5 seconds
Sensibility	60 – 100%
pH of the solution	7,6
Protein concentration	5mg/mL

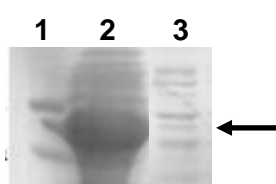


Figure 1

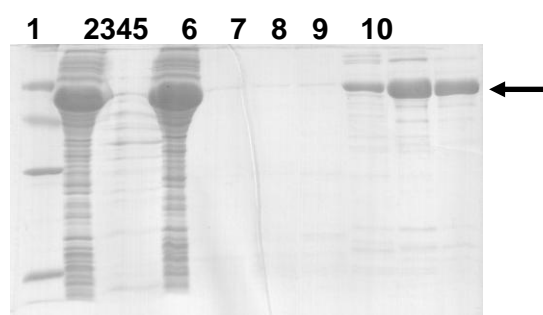


Figure 2 A

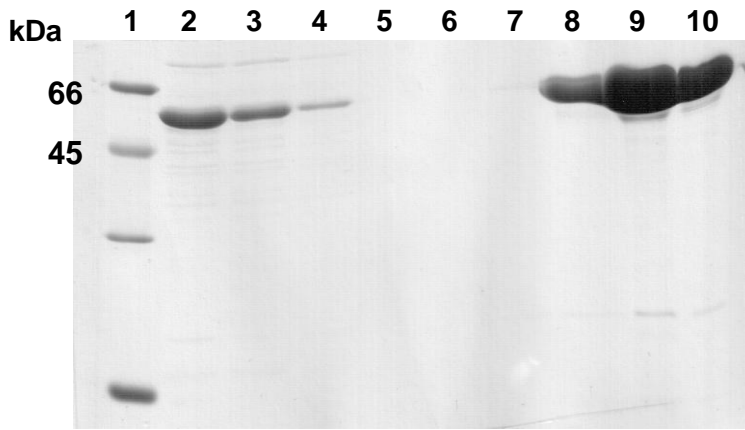


Figure 2 B

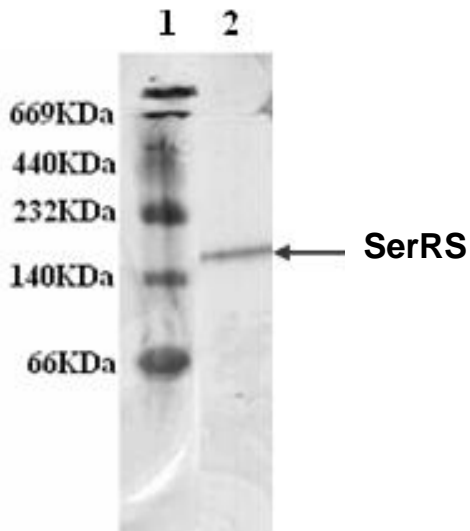
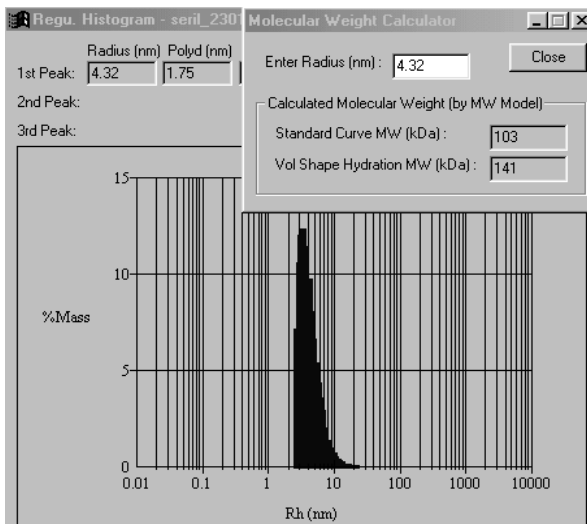


Figure 3



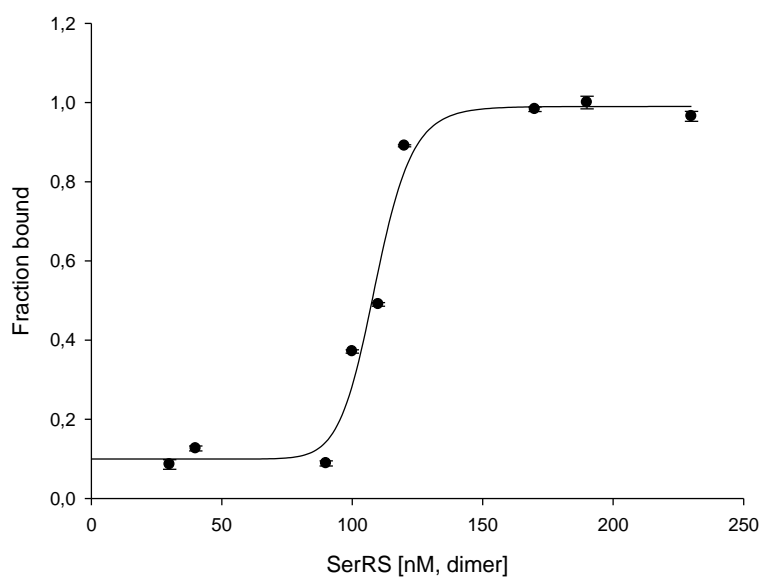
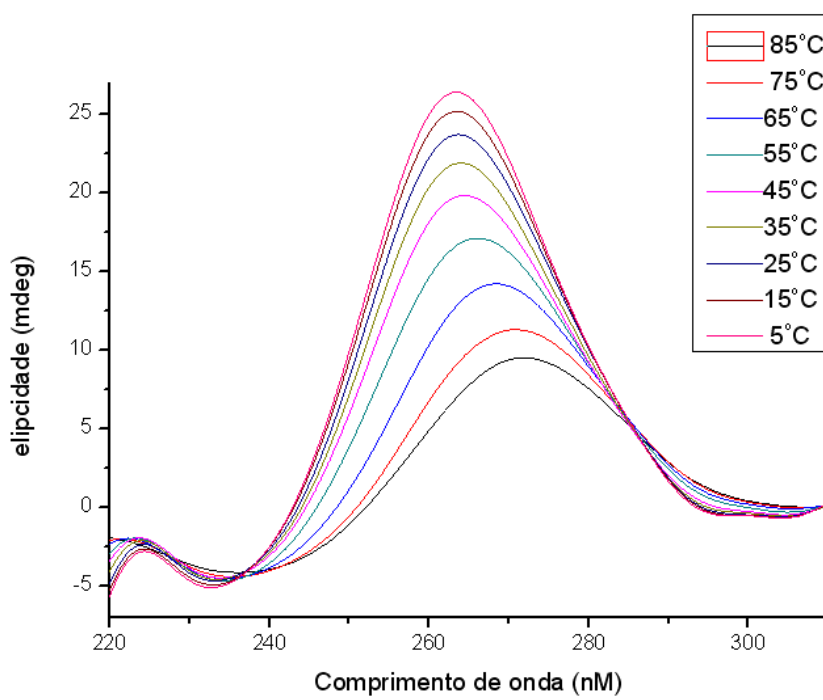
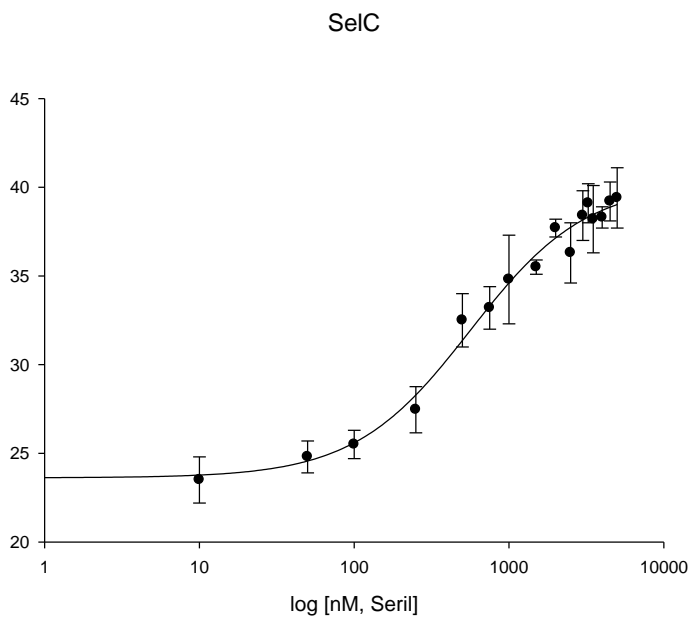
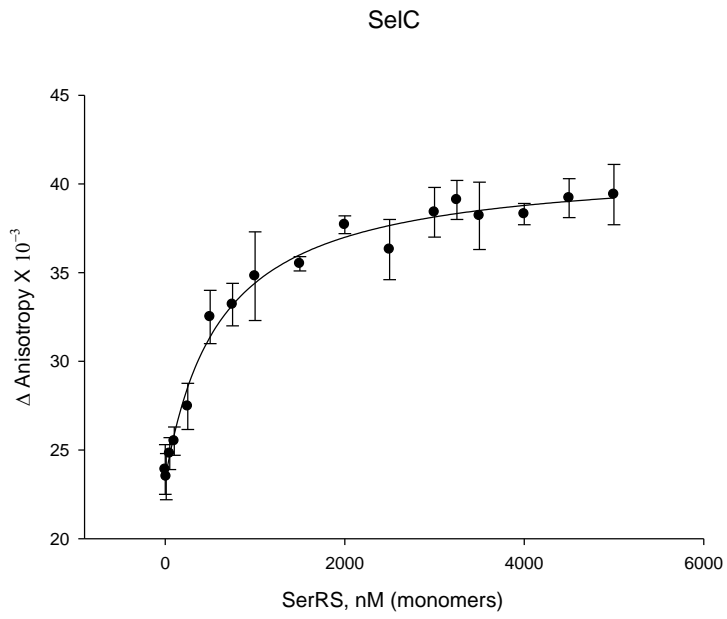
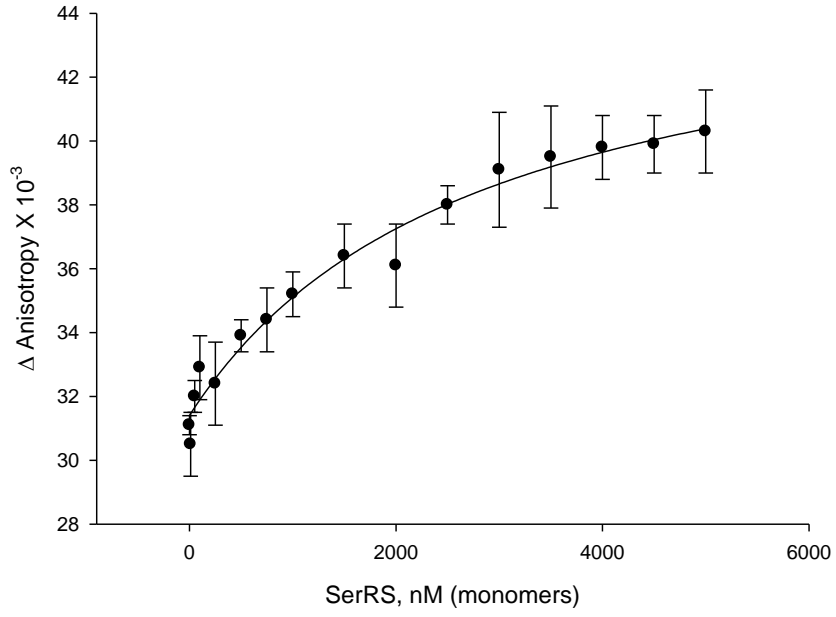


Figure 5

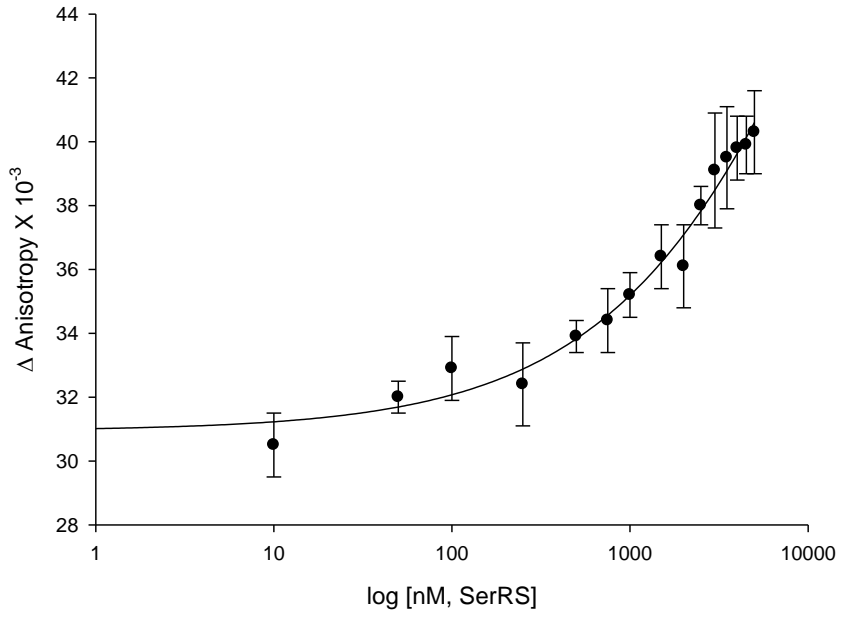


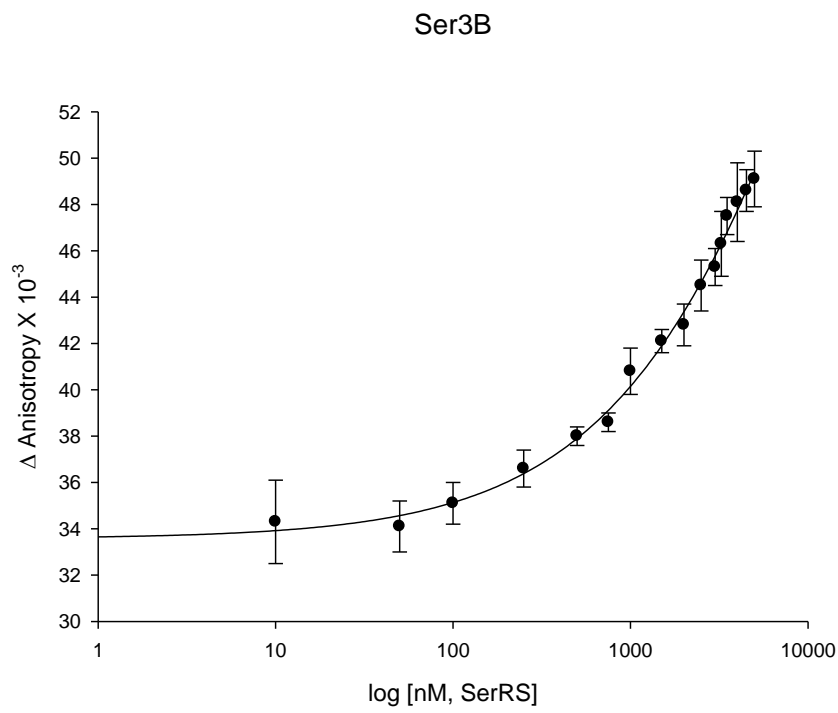
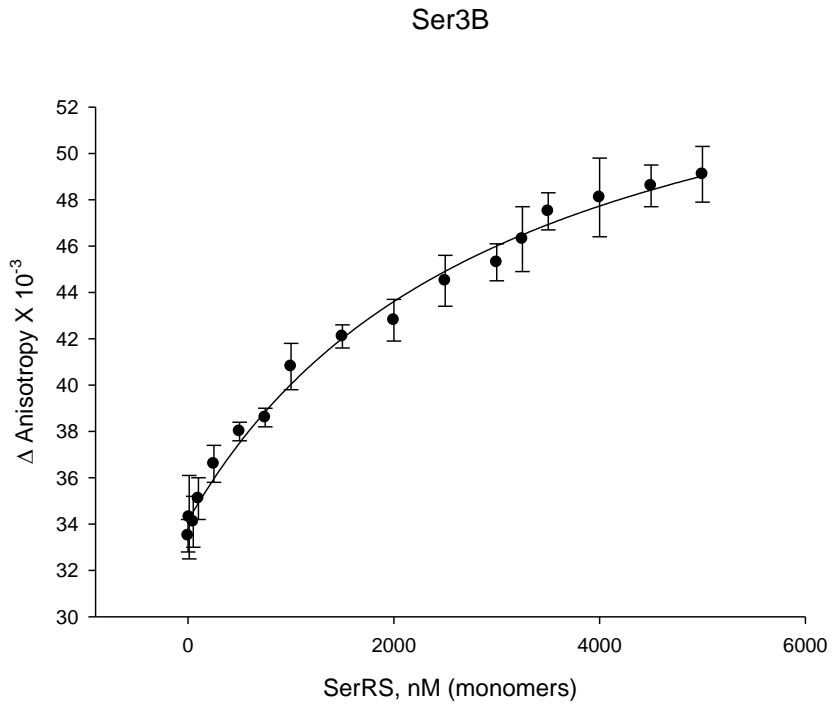


Ser3A

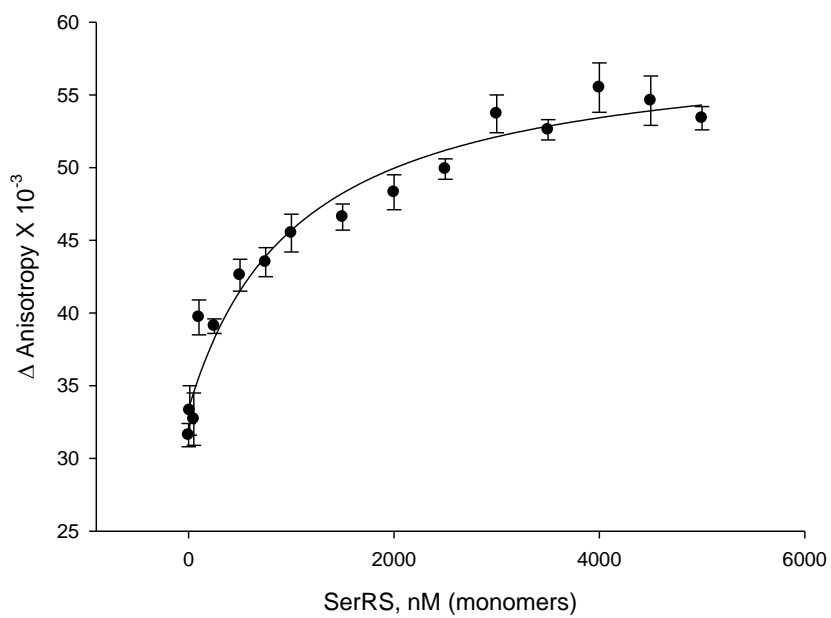


Ser3A

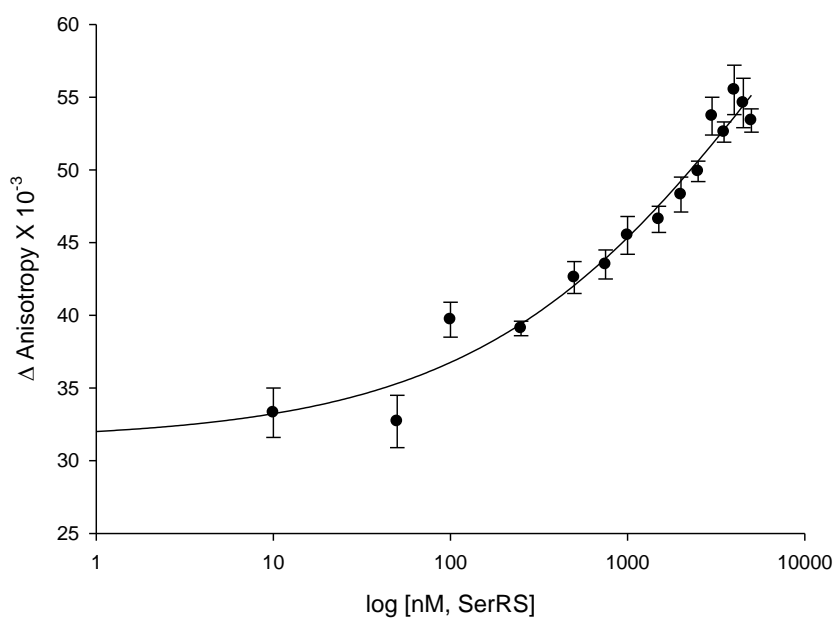


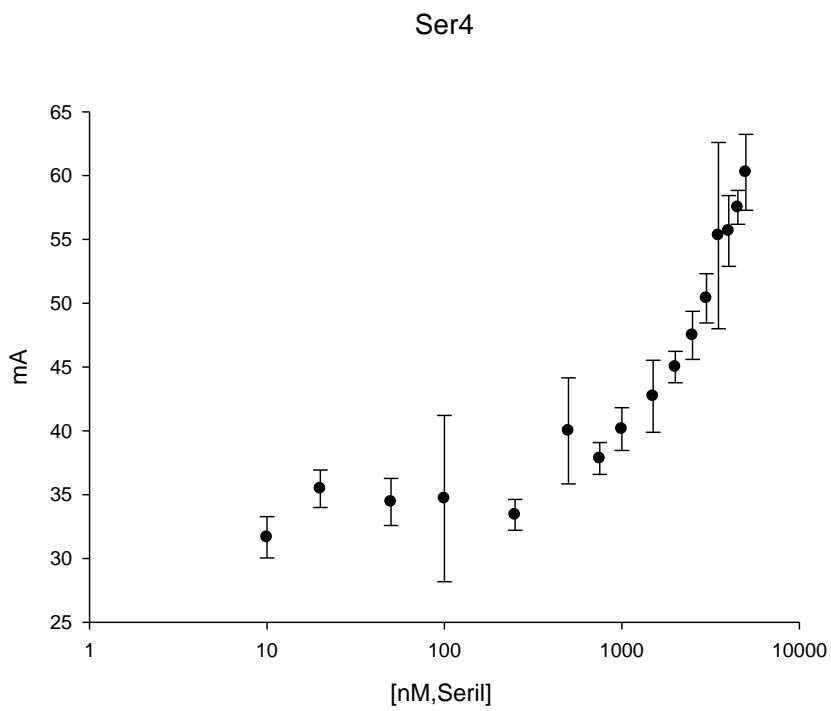
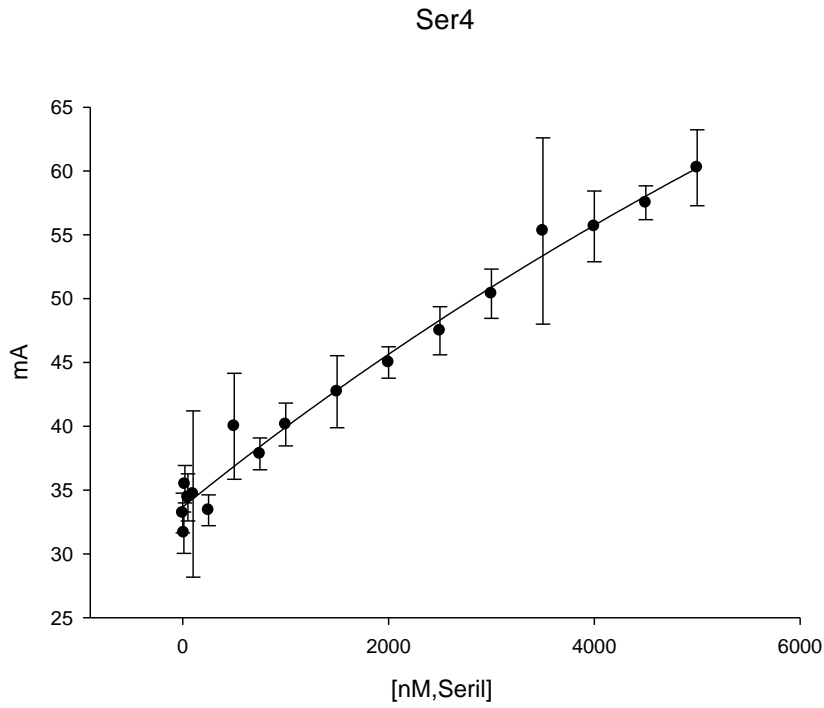


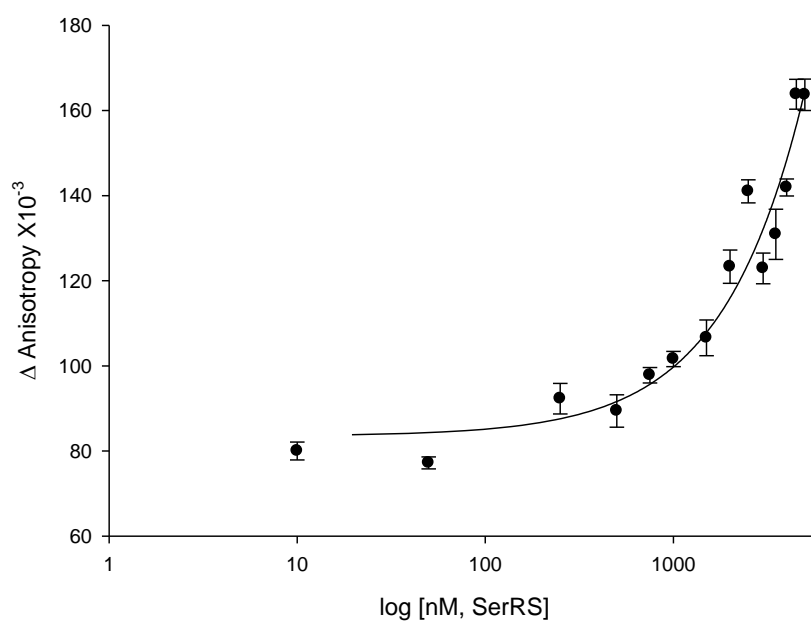
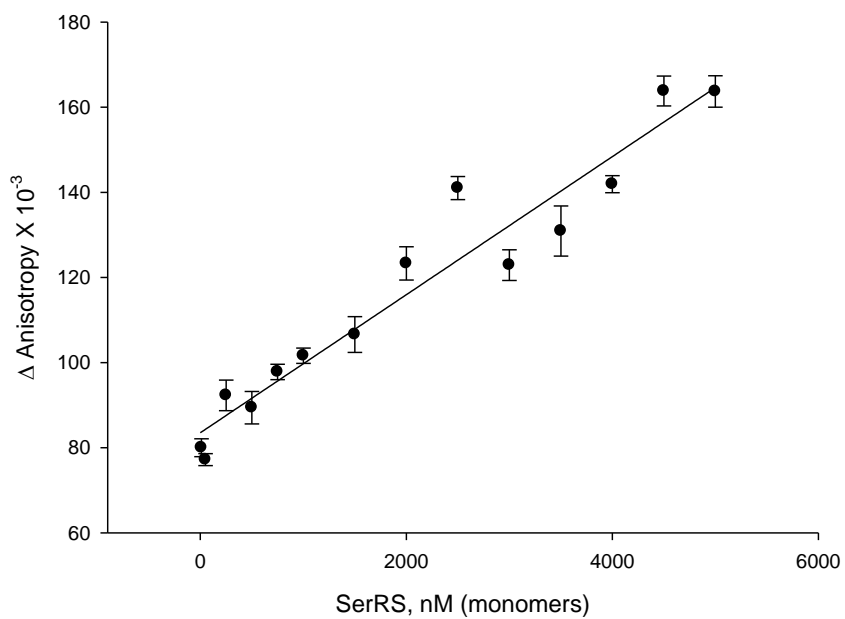
Ser7



Ser7







tRNA	SeIC	tRNA ^{Ser3A}	tRNA ^{Ser3B}	tRNA ^{Ser7}
------	------	-----------------------	-----------------------	----------------------

Constante de Associação (nM)	608,19±86,41	2780,25±756,46	3091,66±498,93	1063,61±312,38
R ²	0,9882	0,9770	0,9922	0,9582
Ocorrência (%)		1,26	2,08	0,9

Anexo 2 – Destaques em mídias da parceria IFSC/USP - MPL/Diamond

- “Último suspiro da Doença do Sono?” Disponível em: <http://www.ifsc.usp.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1538:ultimo-suspiro-da-doenca-do-sono&catid=7:noticias&Itemid=224>.
- “Pesquisa abre portas para o combate à doença do sono”. Disponível em: <<http://midiaciencia.com/pesquisa-abre-portas-para-o-combate-a-doenca-do-sono/>>.
- “Protozoário causador da doença do sono é tema de pesquisa no IFSC”. Disponível em: <<http://www5.usp.br/24921/pesquisadora-do-ifsc-investiga-a-doenca-do-sono/>>.
- “Novas proteínas podem trazer cura da Doença do Sono” Disponível em <<http://www.sociedademedica.org.br/novas-proteinas-podem-trazer-cura-da-doenca-do-sono/>>; <<http://www.jornalpp.com.br/cidades/item/30183-novas-prote%C3%ADnas-podem-trazer-cura-da-doen%C3%A7a-do-sono>>.