Universidade de São Paulo INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Livia Regina Manzine

Identíficação de elementos estruturais no tRNA^{sec}uca determinantes da ligação com proteínas

> São Carlos 2011

Livia Regina Manzine

Identíficação de elementos estruturais no tRNA^{sec}uca determinantes da ligação com proteínas

Tese apresentada no 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 2011

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

> Manzine, Livia Regina Identificação de elementos estruturais no tRNAsecuca determinantes da ligação com proteínas / Livia Regina Manzine; orientador Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2011. 159 p. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.
>
> Selenocisteína. 2. Selenocisteína sintase. 3. tRNAsec. I. Thiemann, Otavio Henrique , orient. II. Título.

Aos meus país e a Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vída, por sempre guiar meus passos e me concender sabedoria, força e tranquilidade em minhas decisões.

Aos meus país, pelo esforço dedicado para que eu conseguisse conquistar e finalizar mais essa etapa da minha vida e pelo incentivo e apoio diários para que eu superasse cada obstáculo e dificuldade... e foram muitos....

A todos que estíveram ao meu lado fora do Instituto de Física ouvindo e compartilhando de meus desabafos, choros, frustrações, alegrias, conquistas, sempre me incentivando a seguir em frente e fazer o melhor possível.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Física de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Otavio H. Thiemann, pela orientação, pela oportunidade concedida e por confiar em mim para a realização desse extraordinário trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Maurício T. R. Lima pelo fundamental auxilio nos experimentos de fluorescência, pelas conversas por skype e visitas a UFRJ; tudo foi extremamente importante e proveitoso para meu desenvolvimento científico e para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov pelo apoio e incentivo nessa etapa da minha vida.

À FAPESP, pelo suporte financeiro e pela bolsa concedida.

Aos docentes e funcionários do Instituto de Física de São Carlos, pelo total apoio e disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário, em especial as funcionárias: María, Susana, Bianca e Maríana (secretaria).

Aos grandes amigos B2, Marcos Michel, Livia Faim, Daiana, Marco Túlio, Fer Batista, Michelle M., Rodrigo, Jaqueline e Mariane pelas conversas, díscussões, pelos conselhos e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À Carol Figueira, que me apresentou à técnica de anisotropia de fluorescência e me auxiliou em meus primeiros passos na utilização do fluorimetro.

A todos os meus colegas e amigos do laboratório de cristalografía.

E, finalmente, àqueles que direta ou indiretamente contribuiram para a realização e o sucesso desse trabalho.

Muíto Obrígada!!

"O sucesso é ír de fracasso em fracasso sem perder entusíasmo."

Winston Churchill

1874 - 1965 Político

RESUMO

MANZINE, L. R. Identificação de elementos estruturais no tRNA^{sec}_{uca} determinantes da ligação com proteínas. 2011. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Em Escherichia coli a formação e incorporação do aminoácido selenocisteína é um evento cotraducional dirigido pelo códon de terminação UGA e deve-se a uma complexa via de biosíntese cujas principais proteínas envolvidas são: Selenocisteína sintase (SELA), Fator de elongação de selenocisteína (SELB), Selenofosfato sintetase (SELD), Seril-tRNA^{ser} sintetase, um tRNA de inserção de selenocisteína (tRNA^{sec} ou SELC) e uma sequência específica no RNA mensageiro, denominada de Sequência de inserção de selenocisteína (SECIS). A incorporação de selenocisteína em proteínas bacterianas inicia-se com a aminoacilação do tRNA^{sec} com serina pela enzima Seril-tRNA sintetase formando seril-tRNA^{sec} que é posteriormente convertido a selenocisteil-tRNA^{sec} pela enzima SELA através de selenofosfato. Dessa forma, o trabalho teve seu foco estabelecido na realização de estudos bioquímicos e biofísicos da proteína SELA e na análise da interação dessa proteína com o ligante SELC para determinação de parâmetros de ligação envolvidos na formação desse complexo. O gene codificante para a proteína SELA foi subclonado, expresso em linhagem bacteriana WL81460(DE3) e a proteína SELA foi purificada como descrito na literatura; entretanto, uma nova metodologia para sua purificação foi desenvolvida proporcionando maior rapidez e rendimento. Estudos de filtração em gel, eletroforese nativa, focalização isoelétrica, dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência intrínseca e *crosslinking* químico proporcionaram uma melhor caracterização da proteína SELA e consequentemente uma maior compreensão de seu comportamento em solução. Ensaios de espectroscopia de anisotropia de fluorescência revelaram que a proteína SELA é capaz de se associar em estruturas superiores ao estado decamérico; essa análise pôde ser corroborada principalmente por dados de microscopia eletrônica empregando a técnica de negative staining. A metodologia de anisotropia de fluorescência também permitiu analisar a interação da macromolécula SELA com o ligante específico SELC, bem como com outros tRNAs mutantes possibilitando a realização de um mapeamento das regiões de SELC importantes para a interação. Além disso, essa técnica também foi satisfatoriamente empregada na determinação da estequiometria de ligação do

complexo SELA-SELC revelando a proporção de 1 molécula de SELA para 10 tRNAs, o que contraria dados literários publicados em 1991 e 1992.

Palavras-chave: Selenocisteína. Selenocisteína sintase. tRNA^{sec}.

ABSTRACT

MANZINE, L. R. Identification of structural elements of the tRNA^{sec}_{uca} determining its protein binding. 2011. 159 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The formation and incorporation of the amino acid selenocysteine in Escherichia coli is an event directed by cotraducional UGA codon and involves a complex biosynthesis pathway whose main proteins are: Selenocysteine synthase (SELA), elongation factor of selenocysteine (SELB), Selenophosphate synthetase (SELD), Seryl-tRNA synthetase, a selenocysteine tRNA (tRNA^{sec} or SELC) and a specific sequence on the messenger RNA, called Selenocysteine insertion sequence (SECIS). The incorporation of selenocysteine in proteins of bacteria begins with the tRNA^{sec} aminoacylation with serine by the enzyme SeryltRNA synthetase resulting in servl-tRNA^{sec} which is subsequently converted to selenocysteyltRNA^{sec} by the enzyme Selenocysteine synthase (SELA). The selenium used in the conversion reaction is provided by Selenophosphate synthetase as selenophosphate and finally, the selenocysteyl-tRNA^{sec} is delivered by the factor SELB to the ribosome. The present study focused on biochemical and biophysical studies of SELA protein and analysis of its interaction with the specific ligand (SELC) for determination of binding parameters involved in the formation of the complex. The gene coding for SELA protein was subcloned, expressed in WL81460(DE3) bacterial strain and the protein was purified as described in the literature; however a new, faster and more efficient method for its purification was developed. Studies of gel filtration, native gel electrophoresis, isoelectric focusing, circular dichroism, intrinsic fluorescence spectroscopy and chemical crosslinking provided a better characterization of SELA protein and a greater understanding of its behavior in solution. Analysis of fluorescence anisotropy spectroscopy revealed that SELA was able to associate in a supramolecular state. This analysis was mainly corroborated by data from electron microscopy employing negative staining technique. Fluorescence anisotropy methodology allowed us to analyse the interaction of SELA protein with the specific ligand SELC, as well as with others mutated tRNAs enabling a mapping of important regions in SELC for interaction. In addition, fluorescence anisotropy technique was also successfully used in determining the stoichiometry ratio of the complex SELA-SELC, showing a proportion of 1 molecule of SELA to 10 tRNAs, contraring to the literary data published in 1991 and 1992.

Keywords: Selenocysteine. Selenocysteine synthase. tRNA^{sec}.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Comparação entre os aminoácidos selenocisteína (A) e cisteína (B). Imagens extraídas dos sites: http://pt.wikipedia.org/wiki/Selenociste%C3%ADna e http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine. Acesso em: 15 de agosto de 2011.28

- Figura 8 Mecanismo de conversão em *E. coli* do seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec} pela enzima Selenocisteína sintase (SELA). Extraído e modificado de ³¹......37
- Figura 9 Imagens da proteína Selenocisteína sintase (SELA) de *E. coli* obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) por *negative staining*.

Para obtenção das imagens foram utilizados como marcadores acetato de uranila (A, C, D) e oxalato de urânio (B). Em A, vista frontal da proteína SELA, ilustrando a simetria encontrada. Em B, vista lateral, ilustrando uma subunidade dimérica. Em C e D, vista frontal e lateral respectivamente da proteína SELA ligada ao composto intermediário aminoacrilil-tRNAsec. Figura 10 - Esquema da incorporação do aminoácido selenocisteína em procariotos. Figura 11 - Síntese de selenocisteil-tRNA^{sec} em eucariotos. A biosíntese é iniciada com a ligação do resíduo de serina ao tRNA^{sec} pela enzima Seril-tRNA sintetase (SerRS) formando seril-tRNA. Em seguida, a enzima fosfoseril-tRNA quinase (PSTK) fosforila o complexo e posteriormente o fosfato é trocado por selênio proveniente do selenofosfato produzido pela enzima selenofosfato sintetase 2 (SPS2). A molécula resultante é o selenocisteil-tRNA^{sec}. Extraído e modificado Figura 12 - Complexo protéico envolvido na síntese de selenoproteínas eucarióticas. Complexos multiprotéicos envolvidos na biosíntese e incorporação de Sec. Inicialmente o complexo SPS1/SecP43/EFSec/Sec-tRNA é importado para o núcleo e em seguida se associa a proteína SBP2 que se encontra ligada ao elemento SECIS. À esquerda, está representada a saída para o citoplasma do Figura 13 - Mapa do vetor pETDuet-1 destacando as enzimas utilizadas para a reação de Extraído digestão. do site: http://www.merckbiosciences.co.uk/html/NVG/DuetTable.html. Data: Figura 14 - Mapa do vetor pET29a(+) destacando as enzimas utilizadas para a reação de digestão. Extraído site: do http://www.merckbiosciences.co.uk/html/NVG/pETTable.html. Data: Figura 15 - Esquema representativo da transcrição dos tRNAs a partir dos fragmentos Figura 16 - Esquema ilustrativo do processo de marcação da extremidade 5' de ácidos nucléicos pelo kit "5' EndTag Nucleic Acid Labelling System" (Vector

Figura 17 - Perfil cromatográfico e SDS-PAGE 15% referente à eluição isocrática da proteína SELA pela coluna *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm). Em A, perfil cromatográfico da passagem da proteína SELA pela coluna de exclusão molecular. A seta em vermelho indica o pico referente à eluição da proteína SELA. Em B, SDS-PAGE 15% para análise da proteína SELA. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína SELA concentrada até o volume de 1 mL após a retirada do cloreto de potássio (volume inicial: 15 mL); 3) proteína eluída da coluna de exclusão molecular (15 mL); 4) fração da proteína SELA

- Figura 20 Adição da marca de seleção para ampicilina ao plasmídeo pET29a(+) contendo o gene *selA*. Em A, reação de digestão com as enzimas de restrição *Dra*III e *Sap*I da construção pET29a(+)-*selA* e do vetor pETDuet-1. 1) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2) vetor pETDuet-1 não digerido; 3) vetor pETDuet-1 digerido; 4) plasmídeo pET29(+)-*selA* não digerido; 5) plasmídeo pET29(+)-*selA* digerido. Em B, reação de digestão da nova construção com as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III. 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) DNA plasmidial da nova construção; 3) digestão do DNA plasmidial da nova construção. A seta em azul mostra o fragmento correspondente ao gene *selA*.

- Figura 25 Espectro de dicroísmo circular da proteína SELA purificada. Média dos espectros de CD relativa a três experimentos medidos de 250 a 190 nm. A concentração de proteína SELA utilizada foi de 0,2 mg/mL em 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7.5, a 25°C......91

- Figura 34 Espectro de emissão da proteína SELA na concentração de 50 e 30 nM de monômeros. A excitação dos resíduos de triptofanos foi realizada no comprimento de onda de 290 nm e os espectros de emissão registrados entre 300 a 450 nm, a 25°C.....104

- Figura 37 Crosslinking químico da proteína SELA com o reagente glutaraldeído em análise por gel nativo Phast System (GE). Géis nativos PhastGel 4-15% de poliacrilamida mostrando o resultado do crosslinking químico da proteína SELA. Em A, 1) proteína SELA sem crosslinking; 2) SELA com 0,02% de glutaraldeído; 3) SELA com 0,05% de glutaraldeído; 4) SELA com 0,1% de glutaraldeído; 5) SELA com 0,2% de glutaraldeído; 6) SELA com 0,5% de glutaraldeído. Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína SELA sem crosslinking; 3) SELA com 1% de glutaraldeído; 4) SELA com 2% de glutaraldeído; 5) SELA com 3% de glutaraldeído; 6) SELA com 5% de glutaraldeído.
- Figura 38 Crosslinking químico da proteína SELA com o reagente glutaraldeído em gel SDS-PAGE 10%. Em A e B, 1 e 10) padrão de massa molecular (kDa); 2 e 11) proteína SELA sem crosslinking; 3) SELA com 0,01% de glutaraldeído; 4) SELA com 0,02% de glutaraldeído; 5) SELA com 0,05% de glutaraldeído; 6) SELA com 0,07% de glutaraldeído; 7) SELA com 0,1% de glutaraldeído; 8) SELA com 0,2% de glutaraldeído; 9) SELA com 0,5% de glutaraldeído; 12) SELA com 1,0% de glutaraldeído; 13) SELA com 2,0% de glutaraldeído; 14) SELA com 3,0% de glutaraldeído e 15) SELA com 5,0% de glutaraldeído......108

- Figura 43 Análise das etapas de purificação da proteína SELA pela metodologia empregando o reagente Nycodenz®. Em A, cromatograma referente à passagem da amostra pela coluna *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm). A seta em preto representa a eluição da proteína SELA e a seta em verde, a eluição do reagente Nycodenz®. Em B, gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna *HiTrap Desalting* (GE); 4) amostra com Nycodenz® concentrada a 2 mL; 5) amostra eluída da coluna de exclusão molecular; 6) amostra eluída concentrada em concentrador de corte de 100 kDa.

- Figura 47 Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação SELA-ligantes. Em A, tRNA^{sec} de *T. brucei*. Em B, DNA fita simples (controle negativo)...... 118
- Figura 49 Estrutura secundária dos tRNAs: tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli* e tRNA^{sec} de *T. brucei*. Em A, B, e C estão representadas as estruturas secundárias do tRNA^{sec} de *E. coli* (extraído e modificado de ³¹, tRNA^{ser} de *E. coli* (extraído do site:

- Figura 58 Amplificação do gene sepsecs de Trypanosoma brucei a partir de DNA genômico e confirmação dos clones obtidos. Em A, 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene sepsecs de T. brucei (1638pb); 3) controle negativo da reação. Em B, reação de PCR para amplificação do gene sepsecs a partir dos DNAs plasmidiais dos clones obtidos

- Figura 60 Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando a expressão do gene *sepsecs* em *E. coli* BL21(DE3) utilizando 0,5 e 0,1 mM de IPTG em meio LB contendo 1 M de sorbitol. Em A, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) recombinante sem indução, a 37°C; 3) recombinante induzido com 0,5 mM de IPTG, a 23°C após 20 horas de indução; Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) recombinante sem indução, a 37°C; 3) recombinante induzido com 0,1 mM de IPTG, a 23°C após 20 horas de indução. As setas em verde indicam a proteína de interesse.
- Figura 61 Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando a lise bacteriana referente à indução da proteína SEPSECS em meio LB com 0,5 mM de IPTG, a 15°C. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2, 4, 6 e 8) fração insolúvel com lise em tampão 1, 2, 3 e 4, respectivamente; 3, 5, 7 e 9) fração solúvel com lise em tampão 1, 2, 3 e 4, respectivamente.
- Figura 62 Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando o tratamento da fração insolúvel com 8 M de uréia. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2 e 3) fração solúvel e insolúvel após lise celular, respectivamente; 4 e 5) fração solúvel e insolúvel após a primeira lavagem com água milli-Q, respectivamente. 6) fração solúvel após a segunda lavagem com água milli-Q; 7) fração insolúvel após tratamento com 8 M de uréia; 8) fração solúvel após tratamento com 8 M de uréia.

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> – Reação de digestão dos vetores pET29a(+)- <i>selA</i> e pETDuet-154
Tabela 2 – Reação de digestão para liberação do inserto referente ao gene selA56
Tabela 3 - Condições da reação de amplificação para os genes selC, tRNA ^{ser} e mutantes59
Tabela 4 - Programa utilizado na reação de PCR para amplificação dos genes selC, tRNA ^{ser} e mutantes + região promotora T760
Tabela 5 - Condições da reação de transcrição in vitro dos tRNAs. 60
Tabela 6 - Padrões de ponto isoelétrico utilizados no sistema Phast System (GE)65
Tabela 7 - Reações da proteína SELA com o reagente glutaraldeído. 68
<i>Tabela 8</i> - Reações da proteína SELA com o reagente glutaraldeído na presença do ligante tRNA ^{sec}
Tabela 9 - Comparação do número de pareamentos de bases dos braços constituintes dos tRNAs: tRNA ^{sec} e tRNA ^{ser} de <i>E. coli</i> e tRNA ^{sec} de <i>T. brucei</i> .121
<i>Tabela 10</i> – Tampões testados durante a lise celular bacteriana na tentativa de solubilização da proteína SEPSECS de <i>T. brucei</i> 136

LISTA DE ABREVIATURAS

Se	Selênio
Sec	Selenocisteína
Cys	Cisteína
tRNA	Ácido ribonucléico transportador
tRNA ^{sec}	tRNA de inserção de selenocisteína
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
3´-UTR	Região 3´não traduzida de RNA mensageiro
ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
LB	Meio de cultura Luria Broth
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactopiranoside
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato de dodecyl-sódio
kDa	Quilodalton
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
RPM	rotações por minuto
PEG	Polietilenoglicol
BSA	Soro albumina bovina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
DTT	Dithiothreitol

SUMÁRIO

Papítulo I	/ – Introdução geral: Selênio e a via de incorporação do aminoácido	
,	Selenocisteína	.25
1.1 Intro	dução geral	.26
1.1.1	Selênio	.26
1.1.2	Selenocisteína e Selenoproteínas	.27
1.1.3	A expansão do código genético	.28
1.1.4	Biosíntese do aminoácido selenocisteína	.30
1.1.5	Incorporação de Sec em procariotos	.35
1.1.6	Incorporação de Sec em eucariotos	.39
Papítulo 2	2 – Objetivos propostos	.45
2.1	Estudos biofísicos e bioquímicos da proteína SELA	.45
2.2	Estudos de afinidade de ligação entre a proteína SELA com seu ligante	, .e
	específico tRNA ^{sec} (SELC) e com respectivos mutantes	.46
2.3	Estudos estecuiométricos entre a proteína SELA e seu ligante SELC.	.46
2.4	Ensaios de expressão e purificação da proteína SEPSECS de <i>Trypanosomo</i>	1
2	brucei	.46
Papítulo É	3 – Metodologias utilizadas	.47
3.1	Informações sobre o clone da proteína Selenocisteína sintase (SELA)	.48
3.2	Transformação dos plasmídeos em células E. coli competentes	.48
3.3	Expressão do gene selA	.49
3.4	Purificação da proteína Selenocisteína sintase (SELA)	.49
3.5	Inserção de um novo passo para a purificação da proteína SELA	.50
3.6	Propagação dos fagos e lisogenia da linhagem bacteriana WL81460	.52
3.7	Nova construção do plasmídeo pET29a(+)-selA com o vetor pETDuet-1	.54
3.8	Amplificação do gene de Inserção de Selenocisteína-tRNAsec (selC) de E. coli e	e
	mutantes	.56
3.9	Transcrição in vitro e purificação dos tRNAs	.60
3.10	Gel filtração analítica.	.62
3.11	Análise por eletroforese em gel não desnaturante (gel nativo)	.63
3.12	Determinação do ponto isoelétrico experimental (pI)	.64
3.13	Ensaios de Dicroísmo Circular (CD)	.65
3.14	Crosslinking químico	.67
3.15	Ensaios de Microcalorimetria	.69
3.16	Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca	.69
3.17	Medidas de espectroscopia de fluorescência extrínseca	.70
3.18	Marcação covalente do tRNA ^{sec} de <i>E. coli</i> com reagentes fluorescentes	.71
3.19	Novo protocolo de purificação para a proteína SELA	.73
3.20	Medidas de Anisotropia de Fluorescência	.73
3.20.1	Ensaio de titulação da interação entre monômeros da proteína SELA	.75
3.20.2	2 Ensaios de titulação da interação entre tRNAs marcados com monômeros da	-
	proteína SELA	.75
3.20.3	³ Ensaios de titulação da interação entre proteína SELA com tRNA ^{sec} de <i>E. coli</i>	
	(titulação reversa)	.76

3.21	Estudos de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	77
Patitulo ·	4 – Estudos Bioquímicos e Biofísicos da proteína SELA e do tRNA ^{se}	ec79
4 1	Resultados	/ 2
4.1.1	Purificação da proteína SELA.	80
4.1.2	Lisogenia da linhagem bacteriana WL81460.	
4.1.3	Clonagem do gene <i>selA</i> – substituição da marca de seleção do vetor pET29a(+)-
	selA	85
4.1.4	Estudos de Gel filtração analítica	87
4.1.5	Eletroforese em gel não desnaturante	89
4.1.6	Determinação do ponto isoelétrico (pI)	90
4.1.7	Estudos de dicroísmo circular	91
4.1.8	Estudos de espectroscopia de fluorescência intrínseca da proteína SELA	92
4.1.9	Amplificação do gene de Inserção de Selenocisteína-tRNA ^{sec} (selC) e mutant	es.93
4.1.1	0 Ensaio de dicroísmo circular do tRNA ^{sec} de <i>E. coli</i>	95
4.2	Discussão dos Resultados	96
-		
Papítulo .	S- Estudos de Interação da proteína SELA com ligantes	99
5.1	Resultados	102
5.1.1	Ensaios de Microcalorimetria por Titulação Isotérmica	102
5.1.2	Medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca	103
5.1.3	Ensaios de espectroscopia de fluorescência extrínseca	105
5.1.4	Ensaios de crosslinking químico	106
5.1.5	Marcação da proteína SELA e dos tRNAs com fluoróforo extrínseco	110
5.1.6	Novo protocolo de purificação para a proteína SELA	112
5.1.7	Ensaios de anisotropia de fluorescência referente à interação entre monômero	os da
	proteína SELA	114
5.1.8	Ensaios de titulação da interação entre tRNAs marcados com a proteína SELA	A 115
5.1.9	Estudos de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)	129
5.1.1	0 Outros estudos desenvolvidos	133
5.2	Discussão dos Resultados	138
$Q = 4 \cdot 1$	Conclución o Deremontivos do Trabelho	145
Gapitulo (o – Conclusões e Perspectivas do Trabalno	145
REFERI	ÊNCIAS	147
Anona 1	Particinação om artigos publicados o submotidos durante o	
ZNHCEO I	- Faricipação em arigos publicados e submetidos duránte o poríodo om guestão	150
	periouo eni questao	139

Capítulo 1 - Introdução geral: Selênio e a via de incorporação do aminoácido Selenocisteína

Neste capítulo serão apresentados os principais tópicos sobre o elemento selênio desde sua descoberta até a via de biosíntese e incorporação do vigésimo primeiro aminoácido (selenocisteína) em linhagens bacterianas e eucarióticas. Além disso, serão destacadas enzimas e fatores participantes da via de inserção de selenocisteína importantes para o processo com ênfase atribuída à proteína Selenocisteína sintase e seu ligante específico tRNA^{sec}, focos deste trabalho.

1.1 Introdução geral

1.1.1 Selênio

O elemento selênio (Se), nomeado em homenagem a deusa grega Selene (Deusa da Lua) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jakob Berzelius¹ enquanto examinava sedimentos de plantas em Gripsholm na Suécia². Até meados de 1950 o elemento selênio era conhecido pela sua toxicidade devido ao seu acúmulo em plantas³ causar aos animais consumidores sintomas de perda de apetite, paralisia e eventual morte⁴. A primeira evidência de envenenamento por selênio foi registrada pelo médico militar Madison em 1856 no Forte Randall, território de Nebraska. Madison observou enfermidades fatais em cavalos que se alimentavam em áreas próximas ao forte².

Posteriormente, novos relatos foram divulgados a respeito da toxicidade causada pelo selênio, até que em 1957 surgiram as primeiras evidências de que esse elemento poderia ser relativamente importante para a saúde humana⁵.

Hoje sabe-se que o elemento selênio é essencial para a nutrição humana e de outros mamíferos e que quantidades adequadas desse elemento são diariamente requeridas. A deficiência moderada de selênio no organismo pode estar ligada a condições patológicas como o aumento de risco de câncer e de infecções, infertilidade masculina, diminuição das funções tireoidianas e imunológicas e situações neurológicas severas que incluem doenças de Alzheimer e Parkinson. Em aspectos terapêuticos, o selênio é conhecido principalmente pela sua atividade antioxidante agindo como quimiopreventivo, antiinflamatório, e com propriedades antivirais⁶.

Um exemplo interessante sobre a deficiência de selênio é a doença de Keshan, uma forma de cardiomiopatia potencialmente fatal e bastante incidente em crianças que habitam regiões da China com níveis extremamente baixos de selênio no solo (absorção de menos de 10 µg/dia). Acredita-se que a infecção de crianças que vivem nessas regiões pelo vírus Coxsackie B faz com que a virulência desse vírus seja maior devido à falta de selênio no organismo infantil, causando nessas crianças cardiomegalia, hipertensão, fadiga, entre outros sintomas⁷⁻⁹. Extraordinariamente, essa doença é prevenida ou completamente revertida através da suplementação com selênio¹⁰⁻¹¹. De acordo com o Conselho Nacional de Pesquisa Norte

Americano, a quantidade recomendada de selênio a ser ingerida é de 55 e 70 μ g/dia para mulheres e homens adultos, respectivamente¹²⁻¹³.

A porta de entrada para o elemento selênio nas dietas dos animais é através das plantas. Estas absorvem o elemento do solo em sua forma inorgânica, absorção essa que pode variar dependendo da disponibilidade desse nutriente no solo da região¹⁴. Nas plantas, o selênio inorgânico é convertido para compostos orgânicos de baixa massa molecular e posteriormente para selenometionina e selenocisteína. A selemometionina é o selenocomposto majoritário em grãos, legumes e soja, e é o principal precursor para a síntese de selenocisteína em animais; outros metabólitos de selênio, além da selenometionina, também estão disponíveis para esse processo¹⁵.

Diferentemente de outros elementos metálicos que interagem com proteínas na forma de cofatores, o selênio é cotraducionalmente incorporado na cadeia polipeptídica nascente como parte do aminoácido selenocisteína (Sec)¹⁶.

1.1.2 Selenocisteína e Selenoproteínas

A selenocisteína é o vigésimo primeiro aminoácido descrito na literatura e presente em um grande número de enzimas distribuídas nas três linhagens: eubactéria, arquea e eucarioto¹⁷.

Nos sistemas biológicos, o aminoácido selenocisteína, visto como um análogo do aminoácido cisteína (Cys), é provavelmente a forma biológica mais ativa do elemento selênio. A principal diferença entre os aminoácidos cisteína e selenocisteína está no fato de que em pHs fisiológicos, o grupo selenol (SeH) do aminoácido Sec se encontra ionizado enquanto que o grupo tiol (SH) do aminoácido Cys encontra-se protonado, ou seja, menos reativo¹⁸ (Figura 1). Esta importante diferença sugere que compostos contendo o elemento selênio apresentem um maior efeito antioxidante sendo, consequentemente mais potentes como agentes preventivos ao câncer do que análogos contendo enxofre ¹⁹⁻²⁰.



Figura 1 - Comparação entre os aminoácidos selenocisteína (A) e cisteína (B). Imagens extraídas dos sites: http://pt.wikipedia.org/wiki/Selenociste%C3%ADna e http://en.wikipedia.org/wiki/Cysteine. Acesso em: 15 de agosto de 2011.

O grupo de proteínas que contém o aminoácido selenocisteína como parte integrante da cadeia polipeptídica é definido como selenoproteínas, e como destacado anteriormente, as selenoproteínas são encontradas em três domínios de vida (bactérias, arqueas e eucariotos), mas nem todas as espécies desses domínios possuem selenoproteínas. Os mecanismos de incorporação de selenocisteínas em arqueas e eucariotos apresentam similaridades, mas são relativamente diferentes do mecanismo de incorporação desse aminoácido em bactérias²¹.

A maioria das selenoproteínas cuja função é conhecida atua como enzimas de oxidoredução tendo o resíduo selenocisteína em seu sítio ativo. Como pode ser visualizada na Figura 1, a estrutura química de Sec difere de Cys apenas pela substituição do átomo de enxofre pelo selênio; entretanto, a estrutura eletrônica do átomo de selênio gera o ânion selenolato, base conjugada de Sec, mais estável do que o correspondente tiolato do resíduo de Cys; e, como dito anteriormente, o grupo selenol (pKa 5.2) é mais ácido do que o grupo tiol (pKa 8.5), consequentemente isso faz com que o aminoácido selenocisteína encontre-se ionizado em pHs fisiológicos²².

1.1.3 A expansão do código genético

28

No início, foi relativamente difícil compreender e explicar como o aminoácido Sec era incorporado em proteínas, pois todos os 64 códons existentes contabilizavam para os 20 aminoácidos conhecidos ou para códons de terminação da tradução²³. Em 1980, Sunde e Hoekstra²⁴ publicaram um estudo empregando células de fígado de rato, sugerindo que a forma inorgânica do selênio era mais facilmente incorporada na enzima glutationa peroxidase para formar Sec do que quando se administrava selenocisteína. Esse estudo envolvendo a enzima glutationa peroxidase, também demonstrou que a cadeia carbônica de Sec é derivada

do aminoácido serina²⁴ e sugeriu, portanto, que o aminoácido Sec seria proveniente de uma modificação pós-traducional do resíduo de serina. Todavia, Hawkes e colaboradores²³ publicaram em 1982 um estudo apresentando evidências da presença de um RNA transportador (tRNA) que se ligava ao resíduo Sec. Infelizmente, os pesquisadores não conseguiram identificar o anticódon desse tRNA, e consequentemente surgiram duas hipóteses para a incorporação do resíduo Sec em selenoproteínas: a forma de incorporação co-traducional, mediada por um tRNA e a forma de modificação pós-traducional do resíduo de serina²⁵.

Em 1986, através do sequenciamento do cDNA da enzima glutationa peroxidase de camundongo, foi dado o primeiro passo em direção ao estabelecimento do mecanismo da incorporação de Sec em selenoproteínas. A sequência de aminoácidos da enzima do camundongo apresentou 86% de identidade com a enzima glutationa peroxidase bovina e a codificação para o resíduo 47, que é uma selenocisteína na enzima bovina, correspondeu a trinca de bases TGA na sequência de camundongo¹⁶. Pouco tempo depois, uma sequência TGA foi encontrada na sequência nucleotídica da enzima Formato Desidrogenase de *Escherichia coli (E. coli)* também correspondente ao resíduo Sec²⁶. Esses estudos levaram a conclusão de que a trinca de bases TGA (UGA no RNA mensageiro) que corresponde a um códon de terminação, especifica a incorporação do resíduo Sec na estrutura primária das selenoproteínas²⁵ indicando uma expansão do código genético conhecido. No código genético contemporâneo, a maioria dos aminoácidos é codificada por trincas de bases que diferem somente na terceira posição²⁷ (Figura 2).

			U		С		Α	G		
Primeira letra do códon		Phe		Ser		Tyr		Cys	U	ſ
		Phe		Ser		Tyr		Cys	С	
	U	Leu	• 500	Ser	STOP	STOP	Gin Leu Ala	STOP Cys Trp Sec	Α	
		Leu	•	Ser		STOP	Gin Pyl	Тгр	G	e
		Leu	Thr	Pro		His		Arg	U	Ce
	C	Leu	Thr	Pro		His		Arg	С	3
		Leu	Thr	Pro		GIn		Arg	Α	-
		Leu	• Thr Ser	Pro		Gln	•	Arg	G	Ť
		lle	•	Thr		Asn		Ser	U	a
	•	lle	•	Thr		Asn		Ser	С	0
	A	lle	• Met	Thr		Lys	Asn	Arg Ser Gly 🔤	Α	S,
		Met		Thr	•	Lys		Arg Ser Gly	G	ð
		Val		Ala		Asp		Gly	U	ž
	0	Val		Ala		Asp		Gly	С	
	G	Val		Ala		Glu		Gly	Α	
		Val	•	Ala		Glu		Gly	G	

Segunda letra do códon

Figura 2 - Código genético contemporâneo. Os códons de iniciação e terminação estão representados por pontos verdes e sinais de STOP, respectivamente. Exceções ao código genético padrão estão apresentadas na coluna da esquerda em verde (aminoácidos padrão), laranja (aminoácidos não padrão) e pequenos símbolos (códons de iniciação e terminação). Os marcados em tarjas amarelas indicam códons não usados em alguns organismos. O códon UGA representa o aminoácido Sec. Extraído e modificado de ²⁷.

Além do aminoácido selenocisteína, o aminoácido pirrolisina também pode ser citado exemplificando a expansão do código genético. A pirrolisina pode ser incorporada cotraducionalmente em proteínas nas posições especificadas pelo códon UAG, o qual também é um códon de terminação (Figura 2). A incorporação destes dois aminoácidos nas sequências das proteínas pode ser tratada como uma expansão do código genético padrão, porque para ambos existem tRNAs cognatos específicos que reconhecem códons específicos. Entretanto, ao contrário dos outros aminoácidos, a decodificação da selenocisteína requer uma maquinaria de síntese complexa e especializada com a participação de fatores proteícos diferenciados²⁷.

1.1.4 Biosíntese do aminoácido selenocisteína

A síntese de selenoproteínas é um processo evolucionariamente conservado, porém existem algumas diferenças marcantes no mecanismo de sua síntese entre procariotos, eucariotos e arqueas. Entretanto, algumas características comuns a todos esses organismos

quanto à incorporação de Sec são: a codificação desse aminoácido pelo códon UGA em fase de leitura, um tRNA específico, um elemento SECIS e algumas proteínas importantes da via²⁸.

Estudos genéticos iniciais realizados em *E. coli* permitiram a identificação de quatro produtos gênicos designados *selA*, *selB*, *selC* e *selD*, responsáveis pela incorporação de Sec em proteínas desse organismo²⁵.

O produto do gene selC é um tRNA específico denominado tRNAsec (tRNA de inserção de selenocisteína), cuja estrutura primária é substancialmente diferente dos outros tRNAs de E. coli²⁹. O tRNA^{sec} de E. coli é o mais longo da espécie (95 ribonucleotídeos) e possui uma região variável formada por um total de 22 ribonucleotídeos. Com base na análise genômica de três bactérias (E. coli, Bacillus subtilis e Mycoplasma capricolum) os tRNAs canônicos contêm 22 ribonucleotídeos invariantes ou semi-invariantes, sendo eles: U8, A14, R15, G18-G19, A21, U33, R37, Y48, R52-G-U-A-C-R-A58, Y60-C-Y62 e C74-C-A³⁰ (Figura 3). Como pode ser visualizado na figura a seguir, a maioria desses ribonucleotídeos estão localizados na região angular (cotovelo) do tRNA participando na estabilização da estrutura tridimensional da molécula (formato de L). A estrutura secundária de tRNAs canônicos de E. coli compreende 7 pares de bases no braço aceptor, 3 a 4 pares de bases no braço D, 5 pares de bases no braço anticódon e 5 pares de bases (pb) no braço T_WC. Ambos os braços anticódon e T\u00c0C, contêm 7 ribonucleotídeos despareados enquanto que o braço D usualmente tem de 8 a 10. Em contraste, a sequência primária do tRNA de inserção de selenocisteína varia em relação aos tRNAs canônicos nas seguintes posições: as posições 8 e 14 são conservadas em outros tRNAs e no tRNAse essas posições são ocupadas por outros ribonucleotídeos. O braço aceptor é estendido de 1 par de base e o braço D possui 6 pares de bases o que diminui o número de bases despareadas desse braço para 4. O comprimento do braço variável divide os tRNAs em duas classes: os pertencente a classe I possuem um braço variável pequeno com 4 a 5 ribonucleotídeos, e os tRNAs de classe II apresentam uma região variável contendo de 10 a 24 ribonucleotídeos. Consequentemente, o tRNA^{sec} é classificado como um tRNA de classe II³¹.



Figura 3 - Comparação entre a estrutura secundária dos tRNAs de Gln (A) e Sec (B) de E. coli. Os ribonucleotídeos 5a e 67a no tRNA^{sec} são nucleotídeos extras renomeados mantendo a numeração padrão. Os ribonucleotídeos circulados são invariantes ou semi-invariantes e os ribonucleotídeos em quadrados no tRNA^{sec} indicam variações da sequência consensus canônica. Extraído e modificado de ³¹.

No caso do tRNA^{sec} de *E. coli*, estudos mostram que apenas três interações na estrutura terciária entre os braços aceptor e anticódon foram identificadas³². Além da interação clássica entre G19 e C56, uma nova interação foi encontrada entre o ribonucleotídeo C16 do braço D e o C59 do braço T ψ C; mais ainda, o pareamento triplo canônico A21-[U8-A14] foi substituído por G8-[A21-U14]³³ (Figura 4).



Figura 4 - Comparação entre as estruturas terciárias dos tRNAs Gln (A) e Sec (B) de *E. coli*. Em A, a interação *triplet* canônica A21-[U8-A14] está destacada em verde. Em B, o pareamento triplo do tRNA^{sec} envolvendo as bases G8-[A21-U14] está indicado por uma caixa vermelha. Extraído e modificado de ³¹.

Embora as sequências sejam relativamente diferentes, comparações podem ser feitas entre o tRNA^{sec} de procariotos e de eucariotos em relação as estruturas secundárias: o comprimento coaxial do braço T ψ C juntamente com o braço aceptor possui 13pb e ambos apresentam 6 pb no braço D ao invés de 3 ou 4 como nos tRNAs canônicos^{29,32-35}. Porém, o braço aceptor e o braço T ψ C do tRNA^{sec} de eucariotos é formado respectivamente por 9pb e 4pb, enquanto que em procariotos essas mesmas regiões são formadas por 8pb e 5pb, respectivamente^{32,34} (Figura 5).



Figura 5 - Comparação entre as estruturas secundárias dos tRNAs Sec de *E. coli* (**A**) **e de eucarioto (B).** O braço aceptor e o braço TψC estão destacados em vermelho. Extraído e modificado de ³¹.

Os genomas de mamíferos contém uma única cópia do gene de tRNA^{sec}, que produz duas isoformas as quais diferem uma da outra apenas pela presença de um grupo metil na posição de ligação do anticódon: a isoforma não metilada referida como mcm⁵U (5-metilcarboximetiluridina) na posição 34 (U34) e a forma metilada referente à mcm⁵Um (5-metilcarboximetiluridina-2-O'-metiluridina)³⁶⁻³⁷. A quantidade relativa e a distribuição destas duas isoformas variam em diferentes tecidos e linhagens celulares³⁸⁻⁴⁰. Essa modificação associada ao mcm⁵U tem sido encontrada até agora somente em tRNA^{sec} e sua produção é atribuída a quantidade de selênio da dieta³⁷. Alguns estudos envolvendo camundongos concluíram que a modificação U34 tem grande influência na regulação da expressão de várias selenoproteínas de mamíferos²¹.

Em relação aos ribonucleotídeos conservados, os tRNAs de eucariotos superiores apresentam 26 ribonucleotídeos invariantes ou semi-invariantes com apenas algumas

exceções. Os ribonucleotídeos nos quais nenhuma exceção foi encontrada são: U9, Y11, G18-G19, Pu24, Py25, Py32, Pu37, G53, U55, C56, A58 e C74-C-A³⁰.

Devido ao fato do códon UGA presente no RNAm representar uma dupla função: servir como códon de terminação e como códon para selenocisteína (Tabela de códons, Figura 2), importantes questões são levantadas sobre a distinção entre essas duas funções pelo ambiente celular. Além do tRNA^{sec} e da presença do códon UGA de selenocisteína em fase de leitura no RNAm, existe outro fator determinante na leitura do códon UGA em fase no RNAm e que se encontra ligado a estrutura secundária desse RNAm na forma de alça. Esse fator é designado como elemento SECIS – Sequência de Inserção a SElenoCisteína (SEleno Cysteine Insertion Sequence)⁴⁰⁻⁴¹.

O elemento SECIS se apresenta como uma estrutura em alça e está localizado na região 3'-UTR (região não traduzida) do RNAm dos genes codificantes para selenoproteínas de eucariotos⁴¹, em alguns casos a distância entre o códon UGA e o elemento SECIS pode ser até de algumas quilobases⁴²⁻⁴⁴. Em arqueas, o elemento SECIS também está presente na região 3'-UTR dos genes, mas sua estrutura se diferencia da dos eucariotos⁴⁵. Já o elemento SECIS de bactérias difere de ambas as estruturas anteriores e está localizado em regiões codificantes de genes que codificam para selenoproteínas, imediatamente após o códon codificante para selenocisteína²².

Em *E. coli*, o elemento SECIS contêm pelo menos 40 nucleotídeos que formam uma alça na estrutura do RNAm, entretanto, estudos mostram que apenas os 17pb na região mais superior da estrutura de alça são suficientes para permitir a incorporação do resíduo de selenocisteína em condições nas quais esses 17pb estão localizados a 11pb do códon UGA⁴⁶, como destacado na Figura 6 a seguir.

Já em eucariotos, o elemento SECIS possue estruturas secundárias altamente conservadas e sequências consenso indispensáveis para a incorporação de Sec ⁴⁷ como: um motivo AAR conservado com duas bases AA consecutivas não pareadas ou duas bases CC, localizadas na alça apical; um quarteto de bases que não obedece o pareamento Watson-Crick (A-T e C-G), apresentando um G pareado com um A no núcleo do SECIS e um A pareado com G anterior ao núcleo do SECIS. O elemento SECIS de eucariotos pode ser classificado em duas formas baseadas na ausência (Forma I) ou presença (Forma II) de uma alça apical adicional²⁸.


Figura 6 - Sequências de Inserção de Sec (SECIS). Em A, SECIS para eubactérias (*E. coli*) localizado logo após o códon UGA para Sec. Delimitado pelo retângulo em verde encontra-se a região reconhecida pela proteína SELB a exatamente 11 nucleotídeos do códon UGA. Em B, SECIS para arqueas (*M. maripaludis*) localizado na região 3'-UTR a aproximadamente 25 nucleotídeos do stop códon. Em C e D, SECIS para eucariotos (mamíferos) em que respectivamente é ilustrada a forma I e II. Os nucleotídeos conservados necessários para a função do elemento SECIS incluem as bases AA ou CC na região do loop apical. Extraído e modificado de ^{28,45-46}.

Apesar da identificação de componentes chaves participantes da maquinaria de incorporação de selenocisteína em proteínas, o mecanismo pelo qual essa incorporação acontece principalmente em eucariotos, ainda não foi completamente elucidado. Já em *Escherichia coli*, essa via de biosíntese foi melhor estudada e caracterizada.

1.1.5 Incorporação de Sec em procariotos

As selenoproteínas mais estudadas em procariotos são referentes ao complexo formato desidrogenase. O formato é metabolizado por dois sistemas de enzimas alternativos que ocorrem quando o organismo procarioto é submetido às condições anaeróbicas de crescimento: o sistema formato-nitrato é induzido por nitrato e converte formato em CO₂ através da redução do nitrato a nitrito; já o sistema formato-hidrogênio liase converte o formato a CO₂ e H_2^{48-50} . Essas reações são catalizadas pelas selenoproteínas Formato desidrogenase N (FDH_N) e Formato desidrogenase H (FDH_H), respectivamente⁵¹.

A incorporação do aminoácido Sec em proteínas procarióticas começa através do carregamento do tRNA^{sec} com o aminoácido serina realizado pela enzima Seril-tRNA

36

sintetase⁵². Na primeira etapa da reação, o aminoácido serina é adenilado pela Seril-tRNA sintetase em uma reação dependente de ATP. Na segunda etapa, a enzima Seril-tRNA sintetase transfere do resíduo L-serina ativado para o tRNA^{sec} liberando dessa forma seril-tRNA^{sec} e AMP⁵³ (Figura 7):



Figura 7 - Reação de adenilação (A) do aminoácido serina e formação de seril-tRNA^{sec} (B) em E. coli.

Em seguida, o seril-tRNA^{sec} é convertido em selenocisteil-tRNA^{sec} pela enzima Selenocisteína sintase (SELA, EC 4.2.1.-), produto do gene *selA*⁵⁴. Em vários sistemas bacterianos, a enzima Selenocisteína sintase mostra-se ser estruturada como um homodecâmero composto por um único tipo de subunidade com massa molecular de 50,6 kDa⁵⁵⁻⁵⁶. Essa enzima contém o cofator piridoxal 5´-fosfato ligado covalentemente a sua estrutura através de resíduos de lisina e a reação de conversão empregando essa enzima ocorre em duas etapas. O primeiro passo da reação consiste na formação de uma base de Schiff (dupla ligação entre nitrogênio e carbono) entre o grupo alfa-amino do resíduo de serina com o grupo formil da molécula de piridoxal 5´-fosfato, resultando na desidratação do resíduo de serina e na formação de um intermediário denominado aminoacrilil-tRNA^{sec 54}. Paralelamente a esse processo, o produto do gene *selD*, uma enzima denominada Selenofosfato sintetase (SELD) catalisa a formação de um composto de selênio reativo (selenofosfato) a partir de seleneto e ATP⁵⁷. O seleneto é obtido a partir do selenito, um sal com ânion divalente (SeO₃²⁻) ou de selenocisteínas respectivamente pelas proteínas Selenotransferases e Selenocisteína liase que reduzem o selênio^{25,58}. O selenofosfato formado pela reação da enzima SELD é a forma ativa do selênio que é então transferida para a molécula intermediária (aminoacrililtRNA^{sec}) resultando na formação de selenocisteil-tRNA^{sec} o qual é subsequentemente liberado da enzima^{57,59}. Abaixo é apresentado um esquema detalhado sobre o processo de conversão do seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec}:



Figura 8 - Mecanismo de conversão em *E. coli* do seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec} pela enzima Selenocisteína sintase (SELA). Extraído e modificado de ³¹.

Embora a estrutura tridimensional da enzima SELA ainda não tenha sido determinada, dados de microscopia eletrônica mostram que essa proteína apresenta simetria rotacional de ordem cinco consistindo de cinco subunidades diméricas arranjadas ao redor de um orificio central⁶⁰ (Figura 9).



Figura 9 - Imagens da proteína Selenocisteína sintase (SELA) de *E. coli* obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) por negative staining. Para obtenção das imagens foram utilizados como marcadores acetato de uranila (A, C, D) e oxalato de urânio (B). Em A, vista frontal da proteína SELA, ilustrando a simetria encontrada. Em B, vista lateral, ilustrando uma subunidade dimérica. Em C e D, vista frontal e lateral respectivamente da proteína SELA ligada ao composto intermediário aminoacrilil-tRNA^{sec}. Extraído de ⁶⁰.

Estudos de cromatografia líquida de exclusão molecular⁵⁴ e microscopia eletrônica⁶⁰ da proteína SELA complexada com seu ligante seril-tRNA^{sec}, revelam que uma molécula do seril-tRNA^{sec} se liga a cada subunidade dimérica da proteína SELA, ou seja, uma estequiometria de 5 moléculas de tRNA para um homodecâmero.

A partir da formação do selenocisteil-tRNA^{sec}, inicia-se o processo de elongação, onde normalmente em *E. coli* os aminoacil-tRNAs se ligam a uma proteína citosólica denominada Fator de Elongação da Tradução (EF-Tu) complexada a uma molécula de GTP, e posteriormente a estrutura aminoacil-tRNA-EF-Tu-GTP, é direcionada ao sitío A da subunidade 70S do ribossomo⁵³.

Na via de incorporação de selenocisteína em procariotos, o seril-tRNA^{sec} não é utilizado na tradução devido ao fato de não ser reconhecido pelo fator de tradução EF-Tu, o qual se liga aos outros aminoacil-tRNAs; além disso, ensaios *in vitro* mostram que o fator EF-Tu se liga 100 vezes mais fracamente ao selenocisteil-tRNA^{sec} em comparação a outros aminoacil-tRNAs.

Após a conversão do seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec}, esse último se liga a um fator de elongação da tradução específico denominado SELB, o qual encaminha o selenocisteil-tRNA^{sec} (Sec-tRNA^{sec}) para o ribossomo⁶¹. O mecanismo de ação da proteína SELB foi sugerido baseado em ensaios cinéticos e medidas de afinidade⁶²⁻⁶³. Supõe-se que durante a tradução, SELB carregando uma molécula de GTP forme o complexo SELB-GTP-Sec-tRNA e posteriormente se ligue ao elemento SECIS no RNAm. Nesse momento, sugere-se que a parte inferior do elemento SECIS se desmanche a fim de posicionar o códon UGA dentro do sítio A do ribossomo, enquanto que a parte superior de SECIS permanece ligada a proteína SELB⁶¹. Simultaneamente, o anticódon do Sec-tRNA^{sec} realiza o pareamento com o códon UGA no interior do sítio A, e baseado em analogias funcionais, porém ainda sem evidências, acredita-se que essa interação códon-anticódon ative a hidrólise da molécula de GTP na proteína SELB⁶⁴. Após a hidrólise do GTP, a proteína SELB fica ligada a um GDP e se desprende do tRNA aminoacilado e da estrutura SECIS; dessa forma Sec-tRNA^{sec} se acomoda no sítio A do ribossomo e a incorporação do resíduo de selenocisteína à cadeia polipeptídica nascente é completada⁶⁵ (Figura 10).



Figura 10 - Esquema da incorporação do aminoácido selenocisteína em procariotos. Extraído e modificado de ⁶¹.

Diferentemente do EF-Tu, o fator SELB se liga somente ao Sec-tRNA^{sec}, ou seja, não se liga a nenhum outro tRNA aminoacilado, nem mesmo ao seril-tRNA^{sec 66}. Além disso, o fator de elongação SELB é um fator bifuncional, pois tem a capacidade de ligação tanto a Sec-tRNA^{sec} como ao elemento SECIS⁶⁷.

1.1.6 Incorporação de Sec em eucariotos

O genoma humano contém 25 genes conhecidos que codificam para selenoproteínas⁶⁸. Dentre esses genes destacam-se as selenoproteínas glutationa peroxidase, tioredoxina redutase, selenofosfato sintetase 2 e outras selenoproteínas ainda não completamente caracterizadas como Sep15, SelH, SelI, SelK, SelM, SelN, SelO, SelP/SepP, SelR, SelS, SelT, SelV e SelW²⁸.

O mecanismo de incorporação de Sec em proteínas eucarióticas é relativamente mais complexo do que a via procariótica, pois envolve um maior número de fatores proteicos. Dentre esses fatores encontram-se: sequência de inserção de selenocisteína (SECIS), os nucleotídeos do códon UGA, que direcionam a incorporação de Sec, a proteína SBP2 (proteína ligante ao elemento SECIS), o fator de elongação específico para Sec (EFSec), o Sec-tRNA^{sec} e o fator de terminação eucariótico (eRF1-fator de liberação 1)⁴⁰.

Assim como ocorre para procariotos, em eucariotos, a forma ativa do selênio também é o monoselenofosfato, o qual é transferido para o seril-tRNA^{sec} para gerar o selenocisteil-tRNA^{sec 57,69-70}. Dois homólogos da proteína Selenofosfato sintetase (SELD) de bactéria, designados como Selenofosfato sintetase 1 (SPS1) e Selenofosfato sintetase 2 (SPS2) estão presentes em mamíferos⁷¹⁻⁷³ e interessantemente, SPS2 é uma selenoproteína⁷³. Recentemente, publicou-se que a SPS2 possue a capacidade de sintetizar selenofosfato *in vitro* enquanto que SPS1 não apresentaria essa capacidade⁶⁹⁻⁷⁰. Especula-se que SPS1 tenha sua função ligada à reciclagem de selenocisteína e ao resgate do selênio⁷⁴.

Em eucariotos, o tRNA^{sec} é inicialmente aminoacilado com serina e, diferentemente do que ocorre nos organismos procarióticos, a serina é subsequentemente fosforilada pela enzima Fosfoseril-tRNA quinase (PSTK) resultando no produto fosfoseril-tRNA^{sec 69-70}. Durante anos, a identificação da enzima fosfoseril quinase permaneceu elusiva, sendo finalmente revelada através de estudos recentes de análises *in silico* dos genomas de arqueas e eucariotos; posteriormente essa enzima foi clonada e caracterizada como uma proteína que fosforila o motivo seril do seril-tRNA^{sec} na presença de ATP e Mg^{+2 75}.

Como detalhado anteriormente, a via de síntese e incorporação do aminoácido selenocisteína em procariotos foi estabelecida no início da década de 1990 na qual a formação da molécula de selenocisteil-tRNA^{sec} é catalizada pela enzima bacteriana Selenocisteína sintase (SELA) dependente de piridoxal fosfato^{54,56}. Estudo recentes, identificaram um antígeno solúvel hepático (SLA *– Soluble Liver Antigen*) como sendo SEPSECS, uma proteína de 48 kDa capaz de se ligar ao tRNA^{sec} de eucarioto, com função correspondente a enzima SELA de procariotos^{69-70,76}. A proteína SEPSECS eucariótica é também uma enzima dependente de piridoxal fosfato⁷⁷ cuja função é desfosforilar o *O*-fosfoseril tRNA^{sec} e transferir o monoselenofosfato para o tRNA formando selenocisteil-tRNA^{sec 69-70} (Figura 11).



Figura 11 - Síntese de selenocisteil-tRNA^{sec} em eucariotos. A biosíntese é iniciada com a ligação do resíduo de serina ao tRNA^{sec} pela enzima Seril-tRNA sintetase (SerRS) formando seril-tRNA. Em seguida, a enzima fosfoseril-tRNA quinase (PSTK) fosforila o complexo e posteriormente o fosfato é trocado por selênio proveniente do selenofosfato produzido pela enzima selenofosfato sintetase 2 (SPS2). A molécula resultante é o selenocisteil-tRNA^{sec}. Extraído e modificado de ⁵⁹.

A proteína ligante do elemento SECIS 2 (SBP2 – *SECIS Binding Protein 2*)^{78,79} e o fator de elongação específico para Sec (mSelB/eEFSec)⁸⁰⁻⁸¹ eram até poucos anos atrás os únicos fatores protéicos conhecidos na via eucariótica. No entanto, recentemente três novas proteínas foram identificadas apresentando funções na maquinaria de biosíntese de Sec em eucariotos. Estas incluem: a proteína ribossomal L30⁸², a proteína ligante de RNA denominada SECp43, e a proteína antígeno solúvel hepática, SEPSECS descrita anteriormente⁸³.

A proteína SBP2 estimula a incorporação de Sec *in vivo* e *in vitro*^{78-79,84} através da sua associação com o elemento SECIS e recrutamento do complexo eEFSec-selenocisteil-tRNA^{sec} ao ribossomo⁸¹. Essa proteína se liga a subunidade maior da ribossomo e também ao domínio conservado da alça interna de SECIS⁸⁴⁻⁸⁵. Recentemente, demonstrou-se que em algumas circustâncias, a proteína SBP2 participa de um complexo multiprotéico na biosíntese de Sec com os fatores de incorporação EFSec, SECp43, SPS1 e SEPSECS⁸⁶.

A decodificação de Sec emprega um fator de elongação específico tanto em procariotos (SELB) como em eucariotos (eEFSec), entretanto algumas diferenças são verificadas entre ambos. Em procariotos, SELB entrega o selenocisteil-tRNA^{sec} ao sítio A do ribossomo para que Sec seja incorporada a cadeia polipeptídica nascente⁸⁷ em seguida, se dissocia do ribossomo e do elemento SECIS e se rearranja com o selenocisteil-tRNA^{sec} para a subsequente incorporação de Sec⁶³. Em contrapartida, nos eucariotos, eEFSec se liga ao selenocisteil-tRNA^{sec} porém não se associa diretamente ao elemento SECIS⁸⁰⁻⁸¹. Em vez

41

disso, eEFSec associa-se com com a proteína SBP2 na presença de selenocisteil-tRNA^{sec}, formando o aparato de decodificação de $Sec^{81,88}$.

A proteína ribossomal L30 interage com o elemento SECIS em uma região de sobreposição ao sítio de ligação de SBP2, ou seja, a proteína L30 compete com SBP2 pela ligação ao SECIS sob certas condições. Supõe-se que durante o reconhecimento do códon UGA, a proteína L30 desloca SBP2 do RNA mensageiro induzindo uma mudança conformacional no elemento SECIS e promovendo a entrega do selenocisteil-tRNA^{sec} ao sítio A do ribossomo⁸².

Outro elemento participante da via, a proteína SECp43, foi identificada em experimentos de PCR que buscavam proteínas ligantes de RNA e consequentemente, SECp43 mostrou se ligar ao selenocisteil-tRNA^{sec 89}. Estudos empregando a técnica de RNA de interferência em fibroblastos embrionários e células de rim, ambos de rato, tendo o gene SecP43 como alvo, demonstraram que a proteína é necessária para a metilação do grupo 2′-hidroxiribosil da posição *wobble* do selenocisteil-tRNA^{sec}, melhorando a incorporação de selenoproteínas^{83,86} (Figura 12).

Na via de incorporação eucariótica do aminoácido selenocisteína foi verificado que os componentes SECp43, SEPSECS e Sec-tRNA^{sec} formam um complexo em lisados celulares⁸³ e que a proteína SECp43 desempenha um papel fundamental na formação ou estabilização do complexo EFSec/SBP2/Sec-tRNA^{sec} bem como, participando da formação do complexo SPS1/SEPSECS/SECp43⁸⁶. O complexo proteico supramolecular formado por EFSec, SecP43, SEPSECS, SPS1, SBP2 e L30 parece se associar e dissociar dinamicamente seja no núcleo, na região citoplasmática ou em contato com o ribossomo. Acredita-se que a proteína SBP2, por estar ligada ao elemento SECIS do RNA mensageiro de selenoproteínas, seja responsável pelo transporte deste do núcleo para o citoplasma, dando prosseguimento a tradução do mesmo no ribossomo²⁸.



Figura 12 - Complexo protéico envolvido na síntese de selenoproteínas eucarióticas. Complexos multiprotéicos envolvidos na biosíntese e incorporação de Sec. Inicialmente o complexo SPS1/SecP43/EFSec/Sec-tRNA é importado para o núcleo e em seguida se associa a proteína SBP2 que se encontra ligada ao elemento SECIS. À esquerda, está representada a saída para o citoplasma do complexo proteico ligado ao SECIS. Extraído e modificado de ⁵⁹.

Fatores adicionais devem existir no processo de biosíntese e inserção do aminoácido selenocisteína em proteínas eucarióticas e, consequentemente a descoberta e o entendimento aprofundado dessa via tanto em procariotos como em eucariotos é de extrema importância para a compreensão do comportamento desse mecanismo evolucionariamente. Alguns modelos descrevendo o mecanismo de incorporação de Sec em eucariotos têm sido propostos, entretanto vários detalhes desse mecanismo ainda não foram elucidados.

Capítulo 2 – Objetivos propostos

Este trabalho visa à realização de estudos biofísicos e bioquímicos da proteína Selenocisteína sintase (SELA) de *Escherichia coli* na busca de um melhor entendimento sobre sua interação com o ligante específico (SELC) e com respectivos mutantes desse ligante.

2.1 Estudos biofísicos e bioquímicos da proteína SELA

A fim de obtermos um maior conhecimento sobre os parâmetros biofísicos e bioquímicos da proteína Selenocisteína sintase, estudos envolvendo as técnicas de dicroísmo circular, fluorescência intrínseca, cromatografia por filtração em gel e eletroforese por gel não desnaturante foram aplicadas para uma melhor caracterização da proteína de interesse.

2.2 Estudos de afinidade de ligação entre a proteína SELA com seu ligante específico tRNA^{sec} (SELC) e com respectivos mutantes

Diferentes técnicas foram empregadas a fim de se determinar a afinidade de ligação da proteína SELA com seu ligante e com mutantes de SELC. Empregando a técnica de anisotropia de fluorescência, foi possível avaliarmos alguns parâmetros qualitativos dessas interações.

2.3 Estudos estequiométricos entre a proteína SELA e seu ligante SELC

Novamente, a técnica de anisotropia de fluorescência foi empregada para determinação da estequiometria de ligação entre a proteína SELA e seu ligante específico.

2.4 Ensaios de expressão e purificação da proteína SEPSECS de *Trypanosoma brucei*

Ensaios de expressão do gene codificante para a proteína SEPSECS de *Trypanosoma brucei* foram realizados e tentativas de purificação dessa proteína foram avaliadas.

$\mathcal{C}apítulo$ 3 – Metodologias utilizadas

Neste capítulo serão brevemente apresentadas as principais técnicas utilizadas durante este trabalho. Além de clonagem, expressão e estabelecimento de um novo protocolo de purificação para a proteína SELA, serão descritas também como foram aplicadas outras diversas técnicas para estudos de oligomerização da proteína SELA e de sua ligação com o ligante específico tRNA^{sec} e com outros ligantes.

3.1 Informações sobre o clone da proteína Selenocisteína sintase (SELA)

A construção do clone contendo o gene codificante para a proteína SELA inicialmente descrita e purificada em 1991^{54,56} foi obtida em nosso grupo através da amplificação do gene *selA* (número de acesso: P0A821) pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) a partir do DNA genômico da bactéria *Escherichia coli* K12 e posterior subclonagem do fragmento amplificado em vetor de expressão pET29a(+) (Novagen) que possui marca de seleção para o antibiótico canamicina. O vetor contendo o gene de interesse foi primeiramente transformado em células de *E. coli*, linhagem DH5 α , para propagação do plasmídeo. As células transformadas foram utilizadas para o crescimento de uma pequena cultura a partir da qual realizou-se a extração do DNA plasmidial e a verificação por sequenciamento de DNA de um clone sem mutações. Uma alíquota do DNA plasmidial foi então transformada em bactérias *E. coli* na linhagem específica BL21(DE3) competentes para a expressão do gene de interesse.

3.2 Transformação dos plasmídeos em células *E. coli* competentes

O produto de ligação (vetor + inserto) ou uma alíquota do DNA plasmidial foram transformados em células competentes de *E. coli* (DH5 α ou BL21(DE3)) preparadas de acordo com protocolo estabelecido ⁹⁰. As células previamente descongeladas permaneceram em gelo por 30 minutos na presença do DNA de interesse e em seguida, foram submetidas a um choque térmico de 42°C por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 250 µL de meio SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose, pH 7.4) e deixou-se em agitação por 1 hora a 250 rpm e 37°C. Decorrido esse tempo, 100 e 200 µL das células foram plaqueados em placas de petri contendo meio LB sólido com os antibióticos adequados.

O protocolo para expressão do gene *selA* na construção pET29(+)-*selA* foi estabelecido em nosso laboratório. Para expressão em larga escala, fez-se um inóculo da colônia transformante com a construção pET29(+)-*selA* em 5 mL de meio LB contendo canamicina (30 µg/mL) incubando durante a noite (14 horas) sob agitação de 250 rpm, a 37°C. Posteriormente, transferiu-se uma alíquota para um inóculo maior na proporção (1:100) o qual permaneceu em agitação de 250 rpm e 37°C até que a absorbância a 600 nm fosse igual a 1.0. Nesse instante, 0,1 mM do agente indutor IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado e a cultura foi mantida por mais 2 horas nas condições acima citadas. Em seguida, as células foram sedimentadas por centrifugação a 7.000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Os sedimentos foram rapidamente congelados a -20°C ou usados imediatamente para o preparo do extrato protéico.

3.4 Purificação da proteína Selenocisteína sintase (SELA)

Devido a termo-sensibilidade da proteína em questão, todos os procedimentos para produção do extrato protéico, purificação da proteína de interesse e ensaios de ligação, foram realizados mantendo-se a proteína em gelo até o instante do uso.

Para o preparo do extrato protéico o sedimento bacteriano foi ressuspendido em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5, contendo 10 μ M de piridoxal 5'-fosfato (PLP) seguindo a relação: para cada 1g de célula (peso úmido) adicionou-se 3 mL de tampão. Em seguida, adicionou-se lisozima em concentração final de 10 μ g/mL e deixou-se em repouso por 30 minutos em gelo. As células foram submetidas à disrupção por sonicação através de 4 pulsos de 20 segundos seguidos por intervalos de 45 segundos entre cada ciclo. Posteriormente, o lisado foi centrifugado por 30 minutos a 14.000 rpm, à tempertarura de 4°C.

O sobrenadante foi então transferido para um béquer em banho de gelo, ao qual acrescentou-se 25% de sulfato de amônio macerado sob agitação branda e constante. Após homogeneização, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 12.000 rpm, 4°C. As proteínas precipitadas pós-sulfato de amônio foram ressuspendidas em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 contendo 10 µM de PLP. Posteriormente, essas proteínas foram aplicadas na

coluna *HiTrap Desalting* (GE) previamente equilibrada no mesmo tampão, para retirada do sulfato de amônio.

Em seguida, a solução protéica foi aplicada em uma coluna de troca iônica Hidroxiapatita (Bio-Rad - ceramic type II), previamente equilibrada no tampão descrito acima. A fração contendo a proteína SELA, obtida durante o passo de lavagem da coluna, foi posteriormente submetida a uma segunda coluna de troca aniônica HiTrap Q HP (GE) previamente equilibrada no mesmo tampão. A proteína foi eluída durante um gradiente linear de cloreto de potássio (20-1000 mM) em dois picos principais. A fração referente ao primeiro desses dois picos foi novamente submetida à coluna *HiTrap Desalting* (GE) para retirada do cloreto de potássio. Ao final do processo, adicionou-se 10% de glicerol à proteína purificada para aumentar sua estabilidade em solução e em seguida concentrou-se a mesma até a concentração desejada. Para os experimentos de purificação foi utilizado o equipamento AKTA Explorer Automated Liquid Chromatografy System (GE) e para concentração da proteína SELA, concentradores com corte de 30 kDa (Millipore) em rotação de 3.000 rpm, a 4°C. A concentração foi determinada através da medida de absorção no comprimento de onda de 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar ($\varepsilon = 35410 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) predito através do programa ProtParam⁹¹. Durante todo o processo de purificação alíquotas foram coletadas e posteriormente submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) seguindo metodologia padronizada⁹².

As etapas descritas nos itens **3.1**, **3.3** e a adaptação do protocolo de purificação de Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁶ referente à proteína SELA (item 3.4) fazem parte da dissertação de mestrado do aluno Alexandre Cassago defendida em 2005 sob orientação do Prof. Dr. Otavio H. Thiemann.

3.5 Inserção de um novo passo para a purificação da proteína SELA

Analisando mais detalhadamente a purificação da proteína SELA, percebeu-se que a mesma não estava apropriadamente purificada, apresentando quando concentrada, uma considerável quantidade de contaminantes protéicos.

Consequentemente, mais um passo de purificação foi acrescido ao final do processo com o objetivo de alcançarmos um maior grau de pureza da proteína em estudo, bem como possibilitar a separação de diferentes possíveis oligômeros da proteína SELA presentes na amostra. Após a passagem da amostra pela coluna *HiTrap Desalting* para retirada do cloreto de potássio, a porção proteica foi concentrada e submetida à coluna de exclusão molecular *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm) (GE) pré-equilibrada com tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 sem PLP. A amostra de proteína foi aplicada na coluna e realizou-se eluição isocrática utilizando 1,5 volumes de coluna e fluxo constante de 1 mL/min. Todos os passos foram realizados com as soluções em gelo e a coluna em banho término na temperatura de 4°C.

Quantificações da proteína SELA purificada realizadas no equipamento *Qubit Fluorometer* (Invitrogen) o qual apresenta certa especificidade para quantificações de RNA e DNA separadamente, identificaram a presença de RNA na amostra de proteína em questão. Frente a isso, algumas tentativas foram realizadas com o intuito de retirar esse aparente RNA ligado à proteína SELA devido à possibilidade de sua ligação ao sítio ativo da proteína poder contribuir para possíveis erros na determinação de constantes de dissociação e nos experimentos de análise estequiométrica.

Um ensaio empregando cloreto de guanidina foi realizado com o objetivo de promover o desligamento do artefato. Para isso, incubou-se aproximadamente 2,0 mg/mL da proteína SELA purificada, com cloreto de guanidina por 1 hora a 25°C para determinar até qual concentração desse reagente a proteína aparentemente mantinha sua estrutura quaternária. As concentrações de cloreto de guanidina utilizadas foram: 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 M e os danos na estrutura quaternária foram visualizados através de gel nativo do sistema Phast System com gradiente de poliacrilamida de 4 a 15% corado por nitrato de prata. Para essa metodologia de coloração, o gel foi incubado por 1 hora em solução de fixação (50% de metanol, 12% de ácido acético e 0,0185% de formaldeído). Em seguida, realizou-se três lavagens com etanol 50% de 20 minutos cada com posterior lavagem com água por 5 minutos. Adicionou-se solução de tiossulfato de sódio (0,2 g/L) durante 1 minuto, repetiu-se a lavagem com água e adicionou-se a solução de impregnação (0,2% de nitrato de prata (m/v) e 0,028% de formaldeído) por 20 minutos. Decorrido o tempo determinado, duas lavagens com água foram feitas e incubou-se o gel com solução de revelação (6% de carbonato de sódio (m/v) e 0,0185% de formaldeído) até que as bandas de proteína adquirissem a coloração desejada. A reação foi interrompida com 50% de metanol e 12% de ácido acético.

Adotou-se a concentração de 1,5 M para um teste mais completo, no qual incubou-se 2,0 mg/mL da proteína previamente purificada com 1,5 M de cloreto de guanidina por 30 minutos à temperatura de 25°C. Aplicou-se a reação em uma coluna de exclusão molecular

Superdex 200 XK (1,6 x 40 cm) (GE) equilibrada com o mesmo tampão em que estava a reação (20 mM de fosfato de potássio, 1,5 M de cloreto de guanidina).

Uma outra abordagem a fim de promover o desligamento do artefato foi testada utilizando a proteína SELD de *Trypanosoma brucei*. Nesse ensaio as condições empregadas foram as da proteína SELD, para a qual a reação já estava parcialmente padronizada. Utilizou-se uma concentração final de 75 mM de tricina, 3 mM de DTT, 3,75 mM de ATP, 25 mM de cloreto de magnésio, 10 mM de seleneto de sódio, 10 μ M da proteína SELD e 4 μ M da proteína SELA. A reação foi efetuada em câmara de nitrogênio para evitar a oxidação do seleneto e incubada a 30°C por 24 horas. O resultado desse teste não foi satisfatório, aparentemente houve proteólise ou algo semelhante durante a reação.

Outras tentativas utilizando RNAses e mesmo o reagente borohidreto de sódio foram efetuadas; entretanto essas opções não resultaram em experimentos bem sucedidos.

Frente a esse problema e após várias pesquisas, encontrou-se na literatura uma linhagem de *E. coli* deficiente no gene *selC*, a qual consequentemente não produz o tRNA^{sec}, ligante específico da proteína SELA.

3.6 Propagação dos fagos e lisogenia da linhagem bacteriana WL81460

A linhagem bacteriana WL81460 (FM433 Δ (selC)400) foi gentilmente cedida ao nosso grupo pelo Prof. Dr. August Böck do Instituto de Biociências Moleculares da Universidade de Frankfurt, Alemanha. Essa linhagem apresenta deficiência no gene *selC* não produzindo o ligante tRNA^{sec} e possui resistência ao antibiótico canamicina. Entretanto, a bactéria WL81460 em questão não possuía a capacidade de expressar genes inseridos em vetores do sistema pET e, consequentemente, o procedimento de lisogenia para integração do prófago λ DE3 foi realizado.

A linhagem WL81460 foi convertida em WL81460(DE3) expressando a enzima T7 RNA polimerase, pela integração do prófago λ DE3 utilizando os fagos presentes no kit " λ DE3 Lysogenization" (Stratagene). O kit " λ DE3 Lysogenization" é designado para integração sítio-específica do prófago λ DE3 no cromossomo celular da célula hospedeira *E. coli*, e dessa forma, o hospedeiro lisogenizado pode ser usado para expressar genes alvos clonados em vetores pET.

Primeiramente, os quatro fagos presentes no kit (λDE3, Helper, Seleção e Tester) foram propagados em células de E. coli DH5a segundo protocolo estabelecido por Sambrook e Russel, 2000⁹⁰ no qual 10⁶ pfu de cada bacteriófago foram separadamente incubados com 100 µL de células bacterianas em absorbância a 600 nm de 0.5, a 37°C por 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se 3 mL de top agar (1% de triptona, 0,5% NaCl e 0,6% agar) a 47°C em cada mistura. Seguida à homogeneização, o conteúdo foi distribuído em placas de petri contendo meio LB sólido. As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 16 horas sem inversão e, após o período de incubação, 5 mL da solução SM (100 mM NaCl, 8 mM de MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) foram adicionados em cada placa prosseguindo-se em agitação por 2 horas a 4°C. O líquido de cada placa foi transferido para tubos e repetiu-se o passo anterior com 1 mL de solução SM por 15 minutos de agitação. As placas foram então descartadas e 100 µL de clorofórmio foram adicionados em cada tubo seguido de homogeneização e centrifugação para remoção dos resíduos bacterianos. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos limpos e uma concentração final de 10% de PEG 8000 (m/v) foi adicionada aos sobrenadantes. Após a dissolução do PEG, a solução foi incubada em gelo por 2 horas para que os bacteriófagos precipitassem. As partículas de fagos foram recuperadas por centrifugação de 10 minutos a 4°C, 12.000 rpm. Os fagos foram ressuspendidos em 250 µL de solução SM e incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Igual volume de clorofórmio foi adicionado, misturado e submetido à centrifugação de 1.500 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa recuperada continha as partículas de bacteriófagos. Os fagos foram testados em algumas diluições para padronização da quantidade a ser utilizada de cada um.

Para obtenção da linhagem hospedeira WL81460(DE3) foi necessário integrar o prófago λ DE3 ao cromossomo bacteriano. O prófago λ DE3 é um fago recombinante carregador do gene para a T7 RNA polimerase sobre o controle do promotor *lac*UV5.

Para esse procedimento, cresceu-se a linhagem hospedeira WL81460 em 50 mL de meio LB suplementado com 0,2% de maltose, 10 mM de MgSO₄ e 30 µg/mL de canamicina até absorbância a 600 nm de 0.5. Misturou-se 10^8 pfu do fago λ DE3, 10^8 pfu do fago "Helper", 10^8 pfu do fago Seleção, variando-se de 1 a 10 µL da célula hospedeira WL81460. A mistura da célula com os fagos foi incubada a 37°C por 20 minutos permitindo desta forma que o fago fosse adsorvido pela célula hospedeira. Após incubação plaqueou-se a mistura em meio LB sólido contendo o antibiótico canamicina deixando-se as placas em incubação durante a noite, a 37°C. As colônias eram possíveis lisógenos λ DE3 e foram obtidas aproximadamente 400 colônias. Para seleção dos lisógenos, algumas colônias foram crescidas em meio LB suplementado até atingirem absorbância a 600 nm de 0.5 e então, 100 µL de cada

crescimento foi misturado com 100 μ L do fago "Tester" a 10³ pfu. Foi realizada incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e adicionou-se 3 mL de *top agar* em cada tubo. A mistura foi colocada em placa com meio LB sólido e incubada durante a noite à 37°C. Os lisógenos λ DE3 produziram halos nas placas de meio LB sólido.

Uma vez selecionado o lisógeno WL81460(λ DE3), este foi submetido à preparação de células competentes de acordo com o protocolo estabelecido por Sambrook e Russel, 2000⁹⁰.

3.7 Nova construção do plasmídeo pET29a(+)-selA com o vetor pETDuet-1

Devido à linhagem WL81460(λ DE3) ser resistente ao antibiótico canamicina, foi necessário que o gene codificante para a proteína SELA fosse inserido em outro vetor de expressão, pois o vetor pET29a(+) (Novagen) no qual se encontrava o gene *selA* também apresentava resistência única ao antibiótico canamicina. Como a busca por vetores com outras marcas de seleção não foi bem sucedida, realizou-se a clonagem do plasmídeo pET29a(+) contendo o gene *selA* com o vetor de expressão pETDuet-1 (Novagen) que contém o gene de resistência para o antibiótico ampicilina. Essa clonagem foi feita utilizando-se as enzimas de restrição *Dra*III e *Sap*I (Fermentas) que não apresentam sítio de clivagem dentro do gene *selA*

As células contendo separadamente o plasmídeo pET29a(+)-*selA* e o vetor pETDuet-1 foram crescidas em 5 mL de meio LB com os respectivos antibióticos e os plasmídeos extraídos utilizando o kit "*GeneJETTM Plasmid Miniprep*" (Fermentas). A reação de digestão com as enzimas de restrição foi incubada a 37°C por 40 minutos e a posição em que essas enzimas realizaram a clivagem nos vetores são apresentadas a seguir:

	pET29a(+)-selA	pETDuet-1
DNA plasmidial	2 µg	2 µg
Tampão [10X]	2 µL	2 µL
Enzima DraIII FastDigest	1 µL	1 µL
Enzima SapI FastDigest	1 µL	1 µL
Água q.s.p.	11 µL	11 µL

Tabela 1 - Reação de digestão dos vetores pET29a(+)-selA e pETDuet-1.



Os fragmentos de interesse foram recuperados de gel de agarose 1% através do kit *"Invisorb Fragment Clean Up*" (Uniscience) e submetidos à reação de ligação utilizando 10 μ L (750 ng/ μ L) do fragmento pET29a(+)-*selA*, 4 μ L (125 ng/ μ L) do fragmento pETDuet-1 contendo o gene de resistência a ampicilina, 2 μ L de tampão [10X], 2 μ L de T4 DNA ligase (400.000 U/mL – New England Biolabs) e 2 μ L de água milli-Q autoclavada. A reação foi incubada durante a noite à temperatura ambiente e posteriormente toda reação foi transformada em linhagem *E. coli* DH5α competente. Das colônias obtidas, algumas foram selecionadas e tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III para verificar a liberação do gene *selA*.

Tabela 2 – Reação de digestão para liberação do inserto referente ao gene selA.

Reação de digestão			
DNA plasmidial	2 µg		
Enzima NdeI (20.000 U/ mL)	1 µL		
Enzima <i>Hind</i> III (20.000 U/ mL)	1 µL		
Tampão [10X]	$2~\mu L$		
Água milli-Q q.s.p.	15 µL		

A reação de digestão foi incubada a 37°C por 4 horas e analisada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

O plasmídeo contendo a construção correta foi posteriormente sequenciado, transformado em células WL81460(DE3) competentes e realizou-se o ensaio de expressão e purificação de acordo com o protocolo já descrito anteriormente.

3.8 Amplificação do gene de Inserção de Selenocisteína-tRNA^{sec} (*selC*) de *E. coli* e mutantes

O gene de inserção de selenocisteína (tRNA^{sec}) de *E. coli* foi amplificado através da técnica de PCR a partir de oligonucleotídeos comercialmente sintetizados e que apresentam uma região interna de sobreposição complementar, destacada em vermelho a seguir:

SELC-1 5' ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCC GGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATCCAGTTG 3'

SELC-2 5' TGGCGGAAGATCACAGGAGTCGAACCTGCCCGGGACCGCTG GCGGCCCCCAACTGGATTTGAAGTCCAG 3'

56

A princípio, um sítio para a enzima *Bst*NI encontrava-se na região 5´ do oligonucleotídeo SELC-2, fato que exigia uma digestão com essa enzima após a síntese do fragmento desejado para a formação da extremidade CCA dos tRNAs. Para essa reação de digestão específica eram utilizados 2 μ g do gene *selC* purificado, 2 μ L de enzima *Bst*NI [10 U/ μ L], 5 μ L de tampão [10X] e 1 μ L de BSA [100X] resultando em um volume final de 50 μ L de reação que permanecia a 60°C por 4 horas.

Posteriormente, novos oligonucleotídeos foram desenhados (ilustrados acima) eliminando esse sítio e consequentemente descartando a necessidade da digestão com a enzima *Bst*NI assim como, mais um passo para a obtenção final do tRNA desejado.

Para os mutantes do tRNA^{sec} de *E. coli* foram desenhados oligonucleotídeos cujas regiões modificadas foram substituídas por regiões correspondentes de uma isoforma do tRNA carregador do aminoácido serina (tRNA^{ser}) de *E. coli*. Nos oligonucleotídeos para amplificação dos mutantes, assim como para o gene *selC*, foi colocada a sequência promotora para ligação da enzima T7 RNA polimerase.

Uma outra isoforma do tRNA^{ser} de *E. coli* diferente da utilizada para os mutantes, e o tRNA^{sec} (SELC) de *Trypanosoma brucei* também tiveram seus genes sintetizados da mesma forma descrita no parágrafo anterior.

A sequência dos genes *selC* e tRNA^{ser} de *E. coli, selC* de *T. brucei* e de cada mutante são mostrados abaixo sendo destacada nos mutantes as regiões que foram substituídas pelas regiões de uma isoforma do tRNA carregador de serina:

Gene selC de E. coli

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGAC TTCAAATCCAGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTCGACTCCTGTGATCTTCCGC CA 3´

* sítio para enzimas de restrição - EcoRI (G'AATTC)

* região promotora para enzima T7 RNA polimerase

* gene selC (95pb)

Gene do tRNA^{ser} (carregador de serina) de *E. coli* - Isoforma contendo GGA na trinca de bases do anticódon. Abaixo estão ilustrandas as regiões que foram substituídas nos tRNAs mutantes. Esse gene não foi amplificado, transcrito ou utilizado em ensaios.

5'GGTGAGGTGTCCGAGTGGCTGAAGGAGCACGCCTGGAAAGTGTGTATACGGCAACGTA TCGGGGGGTTCGAATCCCCCCCCTCACCGCCA 3'

- * região substituída no mutante do braço aceptor (14 bases);
- * região substituída no mutante do braço D (17 bases);
- * região substituída no mutante do braço anticódon (17 bases);
- * região substituída no mutante do braço variável (14 bases);
- * região substituída no mutante do braço T ψ C (17 bases).

Mutante do braço aceptor

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGAGGGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACT TCAAATCCAGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTCGACTCCTGTCCTCACCGCCA 3'

Mutante do braço D

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTTCCGAGTGGCTGAAGGAGCTGG ACTTCAAATCCAGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTCGACTCCTGTGATCTTCC GCCA 3'

Mutante do braço anticódon

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCACGCC TGGAAAGTGTGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTCGACTCCTGTGATCTTCCGC CA 3'

Mutante do braço variável através de deleção total do braço (Var1)

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGAC TTCAAATCCAGTGGCAGGTTCGACTCCTGTGATCTTCCGCCA 3'

Mutante do braço variável através de substituição total do braço (Var2)

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGAC TTCAAATCCAGTATACGGCAACGTATGGCAGGTTCGACTCCTGTGACTTTCCGCCA 3'

Mutante do braço TYC

Gene do tRNA^{ser} de *E. coli* – Isoforma amplificada e utilizada nos ensaios

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGAGGTGGGCCGAGAGGCTGAAGGCGCTCCC CTGCTAAGGGAGTATGCGGTCAAAAGCTGCATCCGGGGTTCGAATCCCCGCCTCACCGCC A 3'

Gene do tRNA^{sec} de *T. brucei*

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGCCACGATGAGCTCAGCTGGTGCTGGGTGCGGG CTTCAAACCCGTAGGCGAGTTGGACTCGCAGCCGTTCGATTCGGCCTTTGTGGTGCCA 3'

Para amplificação dos fragmentos dos genes *selC*, do tRNA^{ser} e dos mutantes, o seguinte protocolo (Tabela 3) foi utilizado:

Reagentes	Volume (µL)
Tampão sem cloreto de magnésio [10X]	10
dNTP (10 mM) (N= A, G, T, C)	2
Cloreto de Magnésio (50 mM)	3
Oligonucleotídeo 100 pmol/µL (5' do gene)	1
Oligonucleotídeo 100 pmol/µL (3´ do gene)	1
Taq DNA Polimerase Titanium (5 U/ μ L)	1
Água milli-Q q.s.p.	100

Tabela 3 - Condições da reação de amplificação para os genes selC, tRNAser e mutantes.

Em seguida, as reações foram submetidas a um programa específico (Tabela 4) em um termociclador para realização das amplificações.

Amplificação dos fragmentos					
Ciclo	1X		35 vezes		
T (°C)	94	94	40	72	4
Tempo	3 min	30 s	30 s	30 s	indefinido

Tabela 4 - Programa utilizado na reação	de PCR para amplificaçã	ăo dos genes <i>selC</i> ,	tRNA ^{ser} e mutantes	; +
região promotora T7.				

Os fragmentos amplificados acrescidos da região promotora foram purificados do gel de agarose 2% utilizando o kit "*Perfect Gel Cleanup*" (Eppendorf) obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 100 ng/µL para cada fragmento.

3.9 Transcrição in vitro e purificação dos tRNAs

Após o processo de purificação dos fragmentos do gel de agarose, seguiu-se a reação de transcrição *in vitro*, a qual a princípio era realizada da seguinte maneira:

Reagentes	Volume (µL)
Tampão de transcrição - (Tris-HCl 0,4 M; NaCl	
0,05 M; MgCl ₂ 0,22 M; DTT 0,1 M; Spermidine	5
0,02 M)- [10X]	
rdNTP (25 mM) (ribonucleotídeos)	10
Inibidor de RNAse [39,8 U/mL]	0,5
Pirofofatase (USB) [40 U/mL]	0,5
DNA molde	aproximadamente 2 µg
Enzima T7 RNA polimerase [100 U/uL] (Biolabs)	1
Água livre de RNAse q.s.p.	50

Tabela 5 - Condições da reação de transcrição in vitro dos tRNAs.

Os reagentes foram misturados e incubados a 37°C por 24 horas.

A partir da reação de transcrição, várias modificações foram feitas no protocolo de purificação do transcrito com o intuito de melhorarmos sua qualidade e obtermos uma forma mais pura e homogênea dos tRNAs a serem estudados. Tais modificações foram baseadas na bibliografia *Handbook of RNA Biochemistry*, 2005⁹³.

A princípio, após a reação de transcrição *in vitro*, os transcritos eram submetidos ao tratamento com DNAse I - BioLabs (2.000 U/mL) sendo adicionada 10 U da enzima DNase I para cada 200 μ L de reação, seguido de 20 minutos de incubação a 37°C. Esse passo era realizado para que o DNA molde fosse digerido e mais facilmente removido da amostra. Em seguida, efetuava-se a precipitação do transcrito com adição de 2,5 volumes de etanol absoluto e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M, pH 4.7. Posteriormente, os transcritos eram submetidos à centrifugação de 13.200 rpm por 45 minutos, a 4°C e o precipitado lavado com etanol 70% seguido de 15 minutos de centrifugação a 13.200 rpm, 4°C. Após secagem, a amostra era ressuspendida em um pequeno volume de água livre de RNAse (aproximadamente 50 μ L) e em seguida, adicionado 10 μ L de formamida deionizada juntamente com 30 μ L de *loading buffer* [2X] (100 mM de MOPS, 1 mM EDTA, 12% de formaldeído (v/v), 62% de formamida, pH 7.0). A mistura era aquecida a 95°C por 3 a 5 minutos, imediatamente colocada em gelo e aplicada em gel de poliacrilamida 8% com 6 M de uréia. A corrida eletroforética era realizada nas condições de 100 V por 60 minutos em tampão TBE [1X].

Terminada a corrida, o gel era corado com brometo de etídio por 20 minutos e a banda de interesse excisada do gel. À banda recortada adicionava-se 5 volumes do tampão de eluição (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM EDTA; 0,1% SDS; 0,3 M NaCl) e deixava-se que a eluição ocorresse durante a noite, a temperatura ambiente e em leve agitação. O sobrenadante era coletado e seguia-se nova eluição com mais 3 volumes de tampão de eluição. Uma segunda precipitação com etanol absoluto era realizada, porém dessa vez sem adição de sal devido à alta quantidade deste presente no tampão. O precipitado era lavado com etanol 70% e deixado secar a temperatura ambiente.

Posteriormente, esse protocolo foi totalmente substituído pelo emprego do kit "Megashortscript T7" (Ambion) para a realização das transcrições e purificação dos transcritos em consequência das reações de transcrição realizadas por meio desse kit apresentarem um maior rendimento em relação à metodologia descrita anteriormente (Figura 15); consecutivamente às transcrições feitas pelo kit seguiu-se pelas etapas de tratamento das amostras com DNAse, extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol absoluto segundo o protocolo do fabricante.



Figura 15 - Esquema representativo da transcrição dos tRNAs a partir dos fragmentos gênicos amplificados.

Depois de purificados, os tRNAs foram ressuspendidos em água livre de RNAse, enovelados por um prévio aquecimento entre 70-80°C e deixados resfriar vagarosamente até aproximadamente 35°C. Nessa temperatura foi adicionado 20 mM de MgCl₂ e deixou-se que a amostra alcançasse a temperatura de 25°C lentamente. Posteriormente, a amostra foi quantificada por medida de absorção em comprimento de onda de 260 nm. A metodologia utilizando o kit "*Megashortscript T7*" (Ambion) para o preparo e purificação dos tRNAs foi empregada para todos os experimentos que envolveram essas moléculas.

3.10 Gel filtração analítica

62

Através da técnica de gel filtração ou exclusão molecular, moléculas em solução são separadas de acordo com diferenças em seus tamanhos e formas moleculares enquanto migram por uma matriz. A matriz é um polímero com poros de tamanhos selecionados e adequados para determinados intervalos de separação. Proteínas com maior massa molecular migram mais rapidamente, pois tendem a não penetrar nos poros da matriz enquanto que moléculas com massa molecular menor migram mais vagarosamente já que tendem a entrar nesses poros.

Para a realização dessa análise utilizou-se a coluna *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm) (GE) a qual apresenta um intervalo de separação de 10 a 600 kDa de massa molecular. A coluna foi previamente calibrada com o kit "*Gel Filtration HMW / LMW Calibration*" (GE) seguindo as orientações do fabricante.

Em síntese, um conjunto de proteínas padrão contendo as proteínas Ribonuclease A (13,7 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Ovoalbumina (44 kDa), Conalbumina (75 kDa), Aldolase (158 kDa), Ferritina (440 kDa), na concentração, volume e fluxo indicados pelo

fabricante foram aplicados na coluna em questão. O reagente *Blue Dextran* 2000 foi utilizado para determinar o volume morto (Vo) da coluna. Sabendo-se o volume de eluição (Ve) das proteínas padrão, calcularam-se os *Kavs* para cada uma segundo a equação:

$$Kav = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo}$$
, onde Vt é o volume total da coluna.

Os valores de *Kav* determinados para cada proteína foram plotados contra o logaritmo das respectivas massas moleculares e a equação da reta obtida através de regressão linear dos dados foi utilizada para o cálculo da massa molecular da proteína em estudo.

Para estimativa do cálculo da massa molecular para a proteína de interesse, a coluna *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm) foi previamente equilibrada com tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 e a passagem da amostra de interesse pela coluna se deu a taxa de fluxo de 1 mL/min tendo sido aplicado o volume de 1 mL de amostra. As frações obtidas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% e quantificadas por absorção em 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar ($\varepsilon = 35410 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) predito através do programa *ProtParam*⁹¹. A banda correspondente à proteína SELA pôde ser visualizada através da coloração do gel com *Comassie brilliant*.

3.11 Análise por eletroforese em gel não desnaturante (gel nativo)

A eletroforese em gel não desnaturante, também chamado de gel nativo, é uma técnica de separação empregada para análise da composição e estrutura de proteínas nativas desde que a conformação e a atividade biológica das mesmas permaneçam intactas durante o desenvolvimento da técnica. Essa técnica possibilita a determinação da homogeneidade da amostra baseando seu princípio de separação em 3 propriedades gerais das proteínas: diferença de cargas, massa molecular e conformação. Esse experimento foi efetuado para verificação visual de possíveis estados oligoméricos da proteína SELA.

Para os experimentos foram utilizados géis nativos do sistema *Phast System* (GE) com um gradiente de poliacrilamida variando de 4 a 15%, característica que permite a separação de

proteínas de alta massa molecular, mais especificamente dentro do intervalo de 150 kDa até 1.000 kDa.

A proteína de interesse foi submetida à eletroforese nativa após a passagem pela coluna de exclusão molecular, sob condições padrão do equipamento. A concentração protéica utilizada foi de 2,0 mg/mL e juntamente à amostra de interesse, um padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas foi submetido à eletroforese (kit de calibração de eletroforese GE – alto peso molecular contendo tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa) e aldolase (140 kDa)). Os géis foram corados com 0,1% da solução *PhastGel Blue* 350 (GE) e descorados em solução contendo 30% metanol e 10% ácido acético.

Utilizando-se a distância relativa de migração no gel *PhastGel* 4-15% (GE) de cada proteína padrão e o logaritmo das massas moleculares das mesmas, construiu-se um gráfico cuja regressão linear descreveu a equação da reta utilizada para determinação da massa molecular da proteína em estudo.

3.12 Determinação do ponto isoelétrico experimental (pI)

A focalização isoelétrica é um procedimento utilizado para a separação de proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pH no qual a somatória de cargas é nula). Nesse processo, um gradiente de pH é estabelecido em um gel de poliacrilamida através de uma mistura de ácidos e bases orgânicos de baixa massa molecular (anfólitos). Quando uma mistura de proteínas é aplicada nesse meio contendo variação de pH e é submetida a um campo elétrico, elas migram por esse gel até o ponto no qual o valor de pH for igual ao seu pI. Nesse ponto, sendo a somatória de cargas nula, a molécula protéica não irá migrar mais⁵³.

Esse experimento foi realizado no sistema *Phast System* (GE) utilizando-se géis *PhastGel IEF 3-9* (GE) os quais abrangem uma faixa de pH entre 3 a 9. A corrida eletroforética foi constituída basicamente por 3 passos: o primeiro caracteriza-se pela formação do gradiente de pH no gel de poliacrilamida; no passo seguinte, as amostras foram aplicadas no gel e no terceiro passo ocorreu a migração das proteínas até seus pontos isoelétricos.

Para o ensaio utilizou-se 4 μ L da proteína concentrada a 2,0 mg/mL em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 juntamente com padrões de pI (kit de calibração – GE) para que fosse possível a estimativa do ponto isoelétrico da proteína de interesse. Após a eletroforese, realizou-se a fixação das proteínas no gel utilizando 20% de ácido tricloroacético e seguiu-se o processo de coloração com 0,02% da solução "*PhastGel Blue R*" (GE) em solução aquosa de 30% metanol e 10% ácido acético. A descoloração foi realizada em solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Abaixo encontra-se a tabela com os padrões utilizados e seus respectivos pontos isoelétricos:

Padrões de pI utilizados	pI
Banda básica de lectina	8.65
Banda média de lectina	8.45
Banda ácida de lectina	8.15
Mioglobina básica	7.35
Mioglobina ácida	6.85
Anidrase carbônica humana	6.55
Anidrase carbônica bovina	5.85
β-Lactoglobulina A	5.20
Inibidor de tripsina de soja	4.55
Amiloglicosidase	3.50

Tabela 6 - Padrões de ponto isoelétrico utilizados no sistema Phast System (GE).

A distância percorrida por cada proteína padrão foi medida a partir da extremidade superior do gel e esses valores foram plotados em relação ao pI de cada proteína. A partir desse gráfico, obteve-se a equação de uma reta descendente que foi empregada para a estimativa do valor do ponto isoelétrico experimental da proteína SELA de *E. coli*.

3.13 Ensaios de Dicroísmo Circular (CD)

A metodologia de dicroísmo circular é caracterizada como um tipo de espectroscopia de absorção que utiliza luz circularmente polarizada. Essa técnica é notavelmente sensível à quiralidade das moléculas, bem como a conformação e ao ambiente molecular das mesmas. Consequentemente, o dicroísmo circular é amplamente usado para caracterizar conformações estruturais de proteínas, ácidos nucléicos e sacarídeos, e também para monitorar mudanças conformacionais nas estruturas de tais moléculas induzidas por temperatura, composição do solvente, ligação de um ligante, entre outras.

A medida de dicroísmo circular é baseada nas diferenças de absorção da luz circularmente polarizada para a direita e para a esquerda por uma determinada amostra⁹⁴. Essas diferenças de absorções da luz são extremamente úteis nas análises de biomoléculas, pois geram informações importantes a respeito de suas estruturas secundárias, através de um espectro de CD⁹⁵.

Ensaios de dicroísmo circular foram aplicados utilizando-se espectros de *far* UV no intervalo de 190 a 250 nm utilizando 0,2 mg/mL de proteína SELA em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5. As medidas foram realizadas no espectropolarímetro J-715 (JASCO Corporation, Japão) equipado com sistema de controle térmico (Peltier), em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico, temperatura de 25°C e utilizando-se média de 16 acumulações para o cálculo da estimativa de regiões de estruturas secundárias. As análises dos espectros foram efetuadas no programa CDSSTR utilizando os conjuntos de dados SP29 e SP37A.

Estudos envolvendo desnaturação térmica foram realizados a fim de monitorar o comportamento da proteína SELA frente a variações na temperatura e possibilitar uma melhor compreensão das mudanças conformacionais dessa proteína. Para realização desses experimentos 0,2 mg/mL de proteína SELA em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 contendo 10 mM de DTT, foram submetidos a desnaturação térmica e o sinal foi monitorado no comprimento de onda de 222 nm. O procedimento foi realizado inicialmente equilibrando a proteína SELA na temperatura de 10°C e então promovendo um aquecimento gradual de 1°Cmin⁻¹ até a temperatura de 90°C. Utilizou-se velocidade de varredura de 100 nm/min, média espectral de 16 acumulações, largura da banda de 1 nm e tempo de resposta de 0,5s.

Ensaios envolvendo variação de temperatura também foram aplicados ao tRNA^{sec} de *E. coli* com o intuito de acompanhar as mudanças em sua estrutura secundária. Nesse experimento, o mesmo equipamento foi utilizado onde 0,6 mg/mL de tRNA^{sec} em água livre de RNAse e contendo 20 mM de cloreto de magnésio tiveram os espectros de CD registrados. O intervalo de comprimento de onda registrado foi de 210 a 320 nm e a faixa de temperatura

66

foi de 85° C (inicial) a 5° C (final) sendo a varredura dos espectros realizada a cada 10° C de abaixamento gradual da temperatura.

A análise do pareamento das bases do tRNA para formação da estrutura secundária foi acompanhada pela mudança na elipcidade⁹⁶.

Os espectros de CD provenientes dos experimentos acima foram tratados no programa Origin versão 7.0 e todos os ensaios foram realizados em triplicata tendo a contribuição do tampão subtraída das medidas protéicas e nucléicas.

Esses ensaios envolvendo a técnica de dicroísmo circular foram realizados no Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC – USP).

3.14 Crosslinking químico

O *crosslinking* é uma técnica bioquímica muito versátil e que permite a visualização de estados oligoméricos, pois promove a ligação covalente de moléculas que estão associadas naturalmente como, por exemplo, subunidades de um oligômero. Todas as classes de macromoléculas podem sofrer o processo de *crosslinking*.

Essa metodologia envolve a participação de um reagente bifuncional cuja região entre seus grupos funcionais é denominada de braço espaçador. Variando as propriedades químicas e físicas dos grupos reativos contidos no espaçador pode-se gerar reagentes bifuncionais com diferentes propriedades e usos. Quando os dois grupos do reagente bifuncional são idênticos, esse reagente é denominado de homobifuncional e quando são diferentes, heterobifuncional. Dentre os reagentes homobifuncionais mais utilizados encontram-se os aldeídos: formaldeído e glutaraldeído, sendo este último o mais frequentemente utilizado na técnica de *crosslinking* químico entre macromoléculas⁹⁴.

Em nossos estudos, optamos pelo emprego do glutaraldeído para a realização dos *crosslinking* químicos tanto entre as subunidades da proteína SELA como para a verificação da ligação SELA-tRNA^{sec}. As tabelas a seguir, resumem as reações realizadas:

SELA (µM de	Glutaraldeído	Volume
monômeros)	(concentração final)	final (µL)
30	0%	20
30	0,01%	20
30	0,02%	20
30	0,05%	20
30	0,07%	20
30	0,1%	20
30	0,2%	20
30	0,5%	20
30	1%	20
30	2%	20
30	3%	20
30	5%	20

Tabela 7 - Reações da proteína SELA com o reagente glutaraldeído.

Tabela 8 - Reações da proteína SELA com o reagente glutaraldeído na presença do ligante tRNA^{sec}.

SELA (µM de monômeros)	tRNA (μM)	Glutaraldeído (concentração final)	Volume final (µL)
30	0	0,1%	20
30	0	0,2%	20
30	15	0,1%	20
30	15	0,2%	20
30	30	0,1%	20
30	30	0,2%	20
30	60	0,1%	20
30	60	0,2%	20

As reações envolvendo somente a proteína SELA e o reagente glutaraldeído foram incubadas por 3 horas a 25°C e posteriormente analisadas por meio de corridas eletroforéticas nativas e desnaturantes. Para as reações envolvendo SELA e tRNA^{sec}, estes foram previamente incubados por 40 minutos a 25°C e em seguida, foi acrescentado glutaraldeído na concentração final especificada na Tabela 8, seguindo por mais 3 hora de incubação a 25°C. Para essa análise, realizou-se eletroforese em gel SDS-PAGE 10%.

3.15 Ensaios de Microcalorimetria

Ensaios de microcalorimetria envolvendo a proteína SELA e seu ligante tRNA^{sec} foram realizados no equipamento VP-ITC Microcalorimeter (MicroCal) tanto no Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC - USP) como no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o objetivo de determinar a constante de afinidade da macromolécula por seu ligante específico e por diferentes tRNA mutantes, bem como definir parâmetros energéticos envolvidos nessas ligações e por fim, a estequiometria de ligação da proteína SELA com o tRNA^{sec}. Entretanto, devido às dificuldades encontradas no emprego dessa técnica, optamos por outras metodologias para alcançarmos os objetivos propostos, dentre elas a técnica de espectroscopia de fluorescência intrínseca.

3.16 Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca

Em proteínas, a fluorescência intrínseca é encontrada nos aminoácidos aromáticos: triptofano, tirosina e fenilalanina. Os grupos indol dos resíduos de triptofano são uma fonte dominante de absorção de luz ultravioleta em proteínas. A emissão desse aminoácido é altamente sensível às alterações no ambiente local e, por essa razão essa emissão é frequentemente utilizada no monitoramento de mudanças conformacionais em proteínas. Alterações espectrais no perfil de emissão podem ser observadas como resultado da ligação de ligantes, associação proteína-proteína e desenovelamento protéico⁹⁷.

Ensaios envolvendo essa técnica foram empregados utilizando o equipamento *Photon Counting Spectrofluorometer* PC-1 (ISS, Champaing, IL) utilizando 0,1 mg/mL de proteína SELA em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5. As medidas foram realizadas a temperatura de 25°C em cubeta de quartzo 10 x 2 mm utilizando-se comprimento de onda de excitação de 295 nm com filtro *cutoff* de 305 nm (corte de 50% da intensidade em 305 nm) e monitorando o espectro de emissão no intervalo de 300 a 450 nm. As medidas foram feitas em triplicatas e corrigidas para contribuição do tampão. Essa metodologia também foi aplicada em ensaios de fluorescência monitorando a emissão dos triptofanos intrínsecos da proteína SELA, frente à adição do ligante (tRNA^{sec}). Os espectros de emissão foram registrados entre 300 a 450 nm utilizando-se filtro *cutoff* de 335 nm (corte de 50% da intensidade em 335 nm) com excitação da amostra em 290 nm. A concentração de proteína no ensaio foi de 5000 nM de monômeros em tampão contendo 20 mM de fosfato de potássio sem piridoxal 5'-fosfato. O ligante tRNA^{sec} foi adicionado em proporções molares iniciando o experimento na relação (monômero:tRNA) 1:0,1 e finalizando em 1:1,5; uma titulação controle somente com tampão e proteína foi realizada para posterior subtração de sua contribuição. Para cada proporção, incubou-se a reação por 20 minutos a 25°C antes da medição dos espectros.

3.17 Medidas de espectroscopia de fluorescência extrínseca

Uma nova metodologia foi utilizada na busca da confirmação da ligação da proteína SELA ao tRNA^{sec}, a técnica de espectroscopia de fluorescência extrínseca.

Frequentemente, as moléculas de interesse são não fluorescentes ou a fluorescência intrínseca não é adequada para o experimento desejado. Nesses casos, a fluorescência pode ser obtida ligando-se um marcador extrínseco a molécula.

A emissão intrínseca de moléculas de DNA e RNA apresenta-se muito fraca, e felizmente, há numerosos marcadores que se ligam espontaneamente a essas moléculas e oferecem um aumento ou um ganho na emissão. Numerosos fluoróforos estão disponíveis tanto para marcação covalente como para não-covalente de ácidos nucléicos. Um dos mais largamente utilizados é o reagente brometo de etídio, o qual é fracamente fluorescente na sua forma livre e tem sua intensidade de fluorescência aumentada cerca de 30 vezes quando ligado aos ácidos nucléicos⁹⁷.

Um ensaio preliminar utilizando o equipamento *Photon Counting Spectrofluorometer* PC-1 (ISS, Champaing, IL) foi efetuado através da monitoração da fluorescência extrínseca utilizando-se como sonda o reagente brometo de etídio. Nesse ensaio foi monitorada a emissão do brometo de etídio frente à excitação de 254 nm. Esse comprimento de onda foi escolhido, pois, segundo Sambrook e Russel, 2000⁹⁰ os ácidos nucléicos absorvem a radiação
UV nessa região e a "transmitem" para as moléculas de brometo de etídio ligadas em sua estrutura.

Dessa forma, incubou-se 0,2 μ M de tRNA^{sec} de *E. coli* puro e enovelado com 0,1 μ M de brometo de etídio por 15 minutos a 25°C em tampão contendo 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5. Realizou-se então a adição sucessiva de pequenos volumes até a concentração final 10 μ M de proteína SELA e para cada adição de proteína, a reação foi incubada por 20 minutos a 25°C antes da realização da medida. Os espectros foram registrados de 500 a 700 nm com excitação da amostra em 254 nm e um filtro *cutoff* 550 nm foi utilizado para retirar o espalhamento da luz. A emissão foi monitorada a 600 nm que é o pico de emissão do brometo de etídio e a cubeta utilizada apresentava 1 cm de caminho óptico. Um controle foi realizado com adição sucessiva apenas de tampão para acompanharmos o efeito da diluição na emissão do brometo de etídio e possibilitar a correção dos dados.

Observadas as mudanças espectrais, ensaios com menores concentrações de tRNA^{sec} (0,1 μ M, 0,05 μ M) foram realizados na tentativa de determinar o valor da constante de dissociação do complexo SELA-tRNA^{sec}.

3.18 Marcação covalente do tRNA^{sec} de *E. coli* com reagentes fluorescentes

Buscando alternativas para seguirmos com os ensaios de fluorescência extrínseca, optamos pelo emprego de fluoróforos mais sensíveis, mais eficientes e que possibilitassem a realização de marcação da molécula de tRNA^{sec} de *E. coli* de forma covalente e mais homogênea (como por exemplo, 1 molécula de tRNA : 1 molécula de fluoróforo).

Primeiramente, realizou-se várias tentativas para marcação da extremidade 3'OH do $tRNA^{sec}$ cujo procedimento baseava-se resumidamente em deacilar o tRNA puro a 42°C por 1 hora na presença de 0,5 M de Tris-HCl, pH 8.0. Após precipitação desse tRNA, o mesmo era ressuspendido em 92 µL de uma solução contendo 3 M de acetato de sódio, pH 4,5 e 1 mM de EDTA. O volume era então completado para 100 µL com 0,5 M de periodato de sódio e a reação incubada em gelo por 1 hora. Por fim, era adicionado 10 µL de cloreto de potássio 3 M e incubava-se a mistura em gelo por mais 10 minutos para precipitação do periodato de sódio. O sobrenadante era aplicado em uma coluna contendo resina *Sephadex*

G25 grau DNA (Sigma) para remover o excesso de periodato de sódio e a amostra era precipitada com etanol absoluto. O tRNA era ressuspendido em 10 mM de acetato de sódio, pH 4.5 e adicionava-se o fluoróforo *Alexa Fluor Cadaverina* 594 (Invitrogen) ressuspendido em dimetilformamida em uma concentração final de 2 mM. Essa reação era incubada a temperatura ambiente por 2 horas e posteriormente o tRNA marcado era purificado por meio de gel de poliacrilamida. Entretanto, após realização de uma varredura de absorção da amostra no espectrofotômetro *Hitachi U-2000 Spectrophotometer*, constatou-se a falta de absorção no comprimento de onda específico para o fluoróforo escolhido (594 nm) logo, observou-se que a marcação não havia sido bem sucedida.

Optou-se então pela tentativa de marcação da extremidade 5´ do tRNA, realizando para isso, uma prévia desfosforilação (segundo protocolo do *Handbook of RNA Biochemistry*⁹³) e subsequente marcação com o fluoróforo 5-iodoacetaminofluoresceina (5-IAF - Invitrogen) ressuspendido em dimetilformamida. O excesso do fluoróforo 5-IAF foi removido através da resina *Sephadex* G25 e seguiu-se a precipitação do tRNA com posterior purificação em gel de poliacrilamida. Como anteriormente, não foi observada absorção da amostra no comprimento de onda de absorção correspondente ao fluoróforo 5-IAF, o qual seria por volta de 492 nm.

Na busca por alternativas de marcação do tRNA^{sec} de *E. coli*, encontrou-se na literatura o kit "5′ *EndTag Nucleic Acid Labelling System*" (Vector laboratories) o qual promove a ligação covalente de uma variedade de fluoróforos na extremidade 5′ de DNAs ou RNAs. Nessa metodologia, primeiramente o tiofosfato é transferido a partir do ATPγS para a extremidade 5′-OH do ácido nucléico pela enzima T4 Polinucleotídeo quinase e em seguida um fluoróforo que reage com grupos tiol é quimicamente acoplado ao ácido nucléico, de acordo com o esquema abaixo:



Figura 16 - Esquema ilustrativo do processo de marcação da extremidade 5´ de ácidos nucléicos pelo kit "5´ EndTag Nucleic Acid Labelling System" (Vector laboratories). Adaptado do protocolo do fabricante.

O método de marcação da extremidade 5´ e purificação dos produtos marcados foram realizados seguindo o protocolo do fabricante e esse procedimento foi empregado com sucesso para todos os tRNAs a serem estudados. Para conferência da marcação e verificação da presença de fluoróforos livres, uma pequena alíquota do tRNA^{sec} de *E. coli* marcado foi aplicada em coluna *HiTrap Desalting* (GE) conectada ao cromatógrafo com monitoração dos comprimentos de onda de absorção do tRNA (260 nm) e da sonda utilizada (fluoresceína – 495 nm).

3.19 Novo protocolo de purificação para a proteína SELA

Com o objetivo de obter maior rendimento para os ensaios de ligação SELA-tRNA desenvolveu-se um novo protocolo para purificação da proteína em estudo. A metodologia de expressão foi mantida como descrito no item 3.3 do capítulo Metodologias e o processo de purificação manteve-se inalterado até o passo da primeira passagem pela coluna *HiTrap Desalting* (GE) após precipitação com 25% de sulfato de amônio. Após a passagem por essa coluna, adicionou-se à mistura proteica uma concentração final de 20% de solução do reagente Nycodenz® preparado em 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7.5 sem PLP e concentrou-se a amostra até aproximadamente 3 mL. A amostra concentrada foi submetida à cromatografia em coluna *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm) (GE) previamente equilibrada em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 sem PLP. As frações obtidas foram concentradas utilizando concentrador Amicon com corte de 100 kDa e analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante de acordo com a metodologia padronizada⁹² para verificação da qualidade da amostra.

3.20 Medidas de Anisotropia de Fluorescência

A metodologia de anisotropia de fluorescência é uma ferramenta poderosa na pesquisa bioquímica. A anisotropia é baseada na existência de momentos de transição entre a absorção e a emissão de fótons que estão orientados ao longo de direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. Em uma solução homogênea os fluoróforos estão orientados aleatoriamente. Quando expostos à luz polarizada aqueles fluoróforos que têm seus momentos de absorção de transição orientados ao longo do vetor elétrico da luz incidente são preferencialmente excitados, ou seja, a população do estado excitado está parcialmente orientada.

A emissão dos fluoróforos pode ser despolarizada por vários motivos, dentre eles a difusão rotacional, que depende da viscosidade do meio e do tamanho e forma da molécula. Medições de anisotropia revelam o deslocamento angular médio do fluoróforo entre os momentos de absorção e emissão de um fóton. Tal deslocamento angular depende da taxa e da extensão da difusão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado.

Para fluoróforos pequenos em meio de baixa viscosidade, a taxa de difusão rotacional é mais rápida que a taxa de emissão, consequentemente, a emissão é despolarizada e o valor de anisotropia praticamente nulo⁹⁷.

No estudo em questão, essa técnica foi utilizada para investigação da interação entre monômeros da SELA, com o objetivo de encontrar a constante de dissociação do decâmero, o que proporcionaria um melhor conhecimento em relação ao seu processo de formação para posteriormente estudarmos a associação SELA-tRNA determinando parâmetros bioquímicos envolvidos nessa ligação.

Mais uma vez as medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro *Photon Counting Spectrofluorometer* PC-1 (ISS, Champaign, IL) montado em geometria L para a esquerda, à 25°C. O comprimento de onda de excitação das amostras foi de 495 nm e utilizouse filtro *cutoff* de 515 nm (corte de 50% da intensidade em 515 nm). Os valores de anisotropia foram calculados pelo programa Vinci-ISS da seguinte maneira:

$$A = \left(\frac{Ipar - Iper}{Ipar + 2Iper}\right)$$

onde, *Ipar* é a intensidade de luz polarizada quando os polarizadores estão em paralelo e *Iper* é a intensidade quando os polarizadores estão perpendiculares.

Para cada experimento foram realizadas no mínimo 3 medidas para cada condição, utilizando-se amostras diferentes em dias diferentes, e as medições foram feitas até que os erros absolutos atingissem 0,005.

74

3.20.1 Ensaio de titulação da interação entre monômeros da proteína SELA

Para a aplicação da técnica de espectroscopia de anisotropia de fluorescência ao sistema estudado, houve a necessidade de marcar a proteína SELA com um fluoróforo que não interferisse nos comprimentos de onda que são absorvidos pela proteína. Para isso, escolheu-se o reagente fluoresceína (Invitrogen) que apresenta um ótimo rendimento quântico e uma boa solubilidade em água.

O ensaio de marcação foi preparado incubando-se 100 μ L da proteína SELA purificada a 1,5 mg/mL com 5 μ L de fluoresceína à 25 mM, por 14 horas à 10°C. Após este processo, o complexo proteína-fluoróforo foi aplicado em coluna *HiTrap Desalting* (GE) acoplada ao cromatógrafo para a separação do complexo SELA-fluoresceína do excesso de fluoresceína livre. As amostras foram monitoradas a 280 nm para acompanhamento da proteína e a 495 nm para checagem da fluoresceína.

Nos ensaios de anisotropia de fluorescência, titulou-se em pequenos passos 30 nM de proteína SELA marcada com fluoresceína através de adições sucessivas de proteína SELA não marcada em uma faixa de concentração de 50 a 11000 nM, em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5. Após cada adição de proteína incubou-se o sistema por 3 minutos antes da realização das medidas a fim de que o equilíbrio do sistema fosse alcançado.

Esses ensaios foram realizados a 25°C, porém, com o cuidado para que o volume final não excedesse em mais de 20% o volume inicial devido às adições.

3.20.2 Ensaios de titulação da interação entre tRNAs marcados com monômeros da proteína SELA

Para os ensaios de ligação da proteína SELA com os ácidos nucléicos de interesse, a posição 5´ dos mesmos foi marcada com fluoresceína utilizando-se para isso o kit "5´ EndTag Nucleic Acid Labeling System" (Vector Laboratories) de acordo com o protocolo do fabricante.

As medidas de anisotropia de fluorescência da proteína SELA com o tRNA^{sec} de *E*. *coli* foram realizadas a 25°C, utilizando-se 10 nM do tRNA marcado com fluoresceína seguindo-se adições sucessivas da proteína SELA. Após cada adição de proteína incubou-se o sistema por 3 minutos a 25°C para que fosse atingido o equilíbrio.

Além do tampão contendo 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5, duas outras condições de tampões com força iônica mais elevada foram testadas para o ensaio de ligação da proteína SELA com o tRNA^{sec} e com uma isoforma do tRNA^{ser} ambos de *E. coli*, para verificarmos a possível influência do sal nas ligações. Esses tampões eram constituídos por:

Tampão 1: 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5, 100 mM de NaCl e 20 mM de MgCl₂;
Tampão 2: 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5, 300 mM de NaCl e 50 mM de MgCl₂.

Para os ensaios envolvendo ligação da proteína SELA com os tRNAs marcados: tRNA^{sec} de *Trypanosoma brucei*, um oligonucleotídeo de DNA fita simples de aproximadamente 80 nucleotídeos utilizado para amplificação do gene *selA* de *M. jannaschii*, e os 6 mutantes, somente o tampão padrão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 foi testado e as condições de 25°C, bem como o período de incubação entre as adições foram mantidos.

Em todos os ensaios envolvendo ligação SELA-tRNA com a finalidade de determinação de constantes aparentes, as concentrações monomérica de proteína adicionada foram de 1 até 25000 nM, respeitando-se a variação de 20% do volume.

Estudos para determinação da estequiometria de ligação SELA-tRNA^{sec} foram efetuados através da técnica de anisotropia de fluorescência utilizando 40 μ M de tRNA dos quais 10 nM estavam marcados com fluoresceína e titulou-se proteína SELA na concentração monomérica de 0,1 a 120 μ M através de adições sucessivas. Esse ensaio foi realizado em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5, em triplicata e respeitando-se as condições de 25°C, incubação por 3 minutos após cada adição e a variação máxima de 20% do volume.

3.20.3 Ensaios de titulação da interação entre proteína SELA com tRNA^{sec} de *E. coli* (titulação reversa)

Para confirmação da estequiometria de ligação SELA-tRNA^{sec} realizou-se o experimento de titulação inverso ao descrito acima.

Para esses ensaios de anisotropia de fluorescência, titulou-se a proteína SELA marcada com fluoresceína através de adições sucessivas de tRNA^{sec} (não marcado) em uma faixa de concentração de 500 a 15000 nM de tRNA, em solução tampão de 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 contendo 10 μ M de monômeros da proteína dos quais 30 nM estavam marcados. Esse experimento foi feito em duplicata por meio de adições sucessivas, à temperatura de 25°C e com 3 minutos de incubação após cada adição de tRNA^{sec}.

Os dados obtidos através dos experimentos envolvendo espectroscopia de anisotropia de fluorescência foram corrigidos para diluição em relação à concentração de proteína ou ligante e analisados no programa SigmaPlot 2006 (versão 10.0).

Todas as metodologias e resultados relacionados às isotermas de interação entre SELA-tRNA foram planejados, analisados e discutidos juntamente com o Prof. Dr. Luis Maurício Trambaioli da Rocha e Lima da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

3.21 Estudos de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

A metodologia de espalhamento de luz dinâmico permite a determinação da massa molecular e o raio de giro de macromoléculas em solução a partir das flutuações de luz espalhada pelas amostras. As frequências das flutuações dependem do quão rapidamente as moléculas estão se movendo por difusão, e essa técnica permite relacionar esse fato com o tamanho da molécula estudada⁹⁴.

A técnica de DLS foi empregada para avaliarmos o estado de oligomerização em solução da proteína SELA com e sem o ligante específico. Para isso, utilizou-se o equipamento Zetasizer UV (Malvern) do Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC - USP). As amostras de proteína-ligante foram incubadas previamente por 30 minutos a 25°C e todas as medidas foram realizadas nesta mesma temperatura com incubação prévia do equipamento de 60 segundos, tempo de aquisição de aproximadamente 130 segundos e 3 medidas sequenciais para cada amostra. As concentrações de SELA sem ligante foram variadas de 1000 a 12000 nM e o ensaio com o ligante tRNA^{sec} foi realizado com 5000 nM de monômeros de SELA incubados com 5000 nM de tRNA em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5.

Capítulo 4 – Estudos Bioquímicos e Biofísicos da proteína SELA e do tRNA^{sec}

Conforme descrito no capítulo introdutório, o produto do gene *selA*, a proteína Selenocisteína sintase, é uma enzima homodecamérica que apresenta o cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP) ligado covalentemente a sua estrutura em um resíduo de lisina⁵⁴.

Estudos de Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁶ determinaram uma massa molecular aparente de 600 kDa para a proteína SELA nativa por meio das técnicas de permeação em gel e eletroforese nativa em gel de poliacrilamida. Tais estudos também verificaram que a proteína SELA apresentava-se com a coloração amarela, mostrando uma absorção máxima no comprimento de onda de 412 nm, característica de enzimas contendo PLP como grupo prostético. Também foi demonstrado nesses estudos que o borohidreto de sódio provocava uma reação de redução entre o PLP e o grupo amino da proteína SELA eliminando a capacidade da mesma em absorver no comprimento de onda de 412 nm e causando a inatividade da enzima em questão.

80

Nesse capítulo serão apresentados resultados referentes às características bioquímicas e biofísicas da proteína SELA de *E. coli* determinadas por técnicas específicas como cromatografia de exclusão molecular, eletroforese nativa e desnaturante, dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência bem como, dados relacionados a amplificações, transcrições dos ligantes a serem estudados e enovelamento do tRNA^{sec} específico.

4.1 Resultados

4.1.1 Purificação da proteína SELA

Após todos os passos de purificação previamente estabelecidos⁹⁸ e detalhados no item 3.4 da seção Metodologias, realizou-se uma análise mais aprofundada da amostra de proteína SELA após concentração da mesma e observou-se que uma considerável quantidade de contaminantes ainda estava presente. Consequentemente, mais um passo de purificação foi incluído ao fim do processo com a finalidade de alcançar um maior grau de pureza da proteína em estudo, bem como possibilitar a separação de diferentes possíveis oligômeros da proteína SELA presentes na amostra.

Após o último passo de purificação realizado para retirada do cloreto de potássio, a porção proteica foi concentrada e submetida à coluna de exclusão molecular *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm) (GE). O perfil cromatográfico referente à passagem pela coluna em questão, bem como a eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para análise encontram-se a seguir:



Figura 17 - Perfil cromatográfico e SDS-PAGE 15% referente à eluição isocrática da proteína SELA pela coluna Superdex 200 HL (1,6 x 60 cm). Em A, perfil cromatográfico da passagem da proteína SELA pela coluna de exclusão molecular. A seta em vermelho indica o pico referente à eluição da proteína SELA. Em B, SDS-PAGE 15% para análise da proteína SELA. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína SELA concentrada até o volume de 1 mL após a retirada do cloreto de potássio (volume inicial: 15 mL); 3) proteína eluída da coluna de exclusão molecular (15 mL); 4) fração da proteína SELA eluída concentrada até 1 mL; 5 e 6) frações minoritárias correspondentes as setas em preto do perfil cromatográfico.

Através do resultado obtido na Figura 17B, verificou-se a presença de vários contaminantes na amostra de SELA concentrada após o passo de purificação para retirada do cloreto de potássio. Como pode ser visualizado, o passo de purificação utilizando a coluna de exclusão molecular acrescido ao final do protocolo proporcionou um maior refinamento da metodologia utilizada à medida que resultou em uma maior pureza da amostra, bem como uma maior homogeneidade. O rendimento apresentado ao final da purificação foi de aproximadamente 2,5 mg de SELA por litro de cultura.

Entretanto, um detalhe importante foi observado durante o desenvolvimento do projeto em relação à expressão da proteína SELA em células tradicionais de *E. coli*. Devido à proteína SELA ser uma proteína naturalmente presente nas células de *E. coli* e estar-se realizando, portanto, expressão homóloga, havia a possibilidade de a proteína SELA purificada trazer ligada a sua estrutura decamérica moléculas do ligante específico seril-tRNA^{sec}. Tal fato considerado plausível poderia influenciar no resultado de experimentos futuros de caracterização e ligação. Essa possibilidade foi comprovada submetendo a proteína SELA, após todos os passos de purificação, às quantificações no equipamento *Qubit Fluorometer* (Invitrogen). Esse equipamento permite uma quantificação altamente sensível baseada em fluorescência, e através da utilização de kits específicos promove uma medida seletiva para quantificação de RNAs, DNAs ou proteínas. Empregou-se para a amostra em estudo o kit seletivo para RNA, o qual realiza a leitura exclusiva de RNAs presentes, não detectando DNAs, proteínas ou nucleotídeos livres; e através da leitura dada pelo equipamento, constatouse a real presença de RNAs na amostra de proteína SELA purificada.

Frente a isso, algumas tentativas foram realizadas com o objetivo de retirar esse RNA contaminante, o qual acreditava-se estar ligado à proteína, visto que a coluna de exclusão molecular não foi capaz de removê-lo.

Uma primeira abordagem foi a adição de quantidades moderadas de cloreto de guanidina com a intenção de promover um leve relaxamento na estrutura quaternária da proteína e fazer com que o artefato desligasse.

Algumas concentrações de cloreto de guanidina foram testadas a fim de se encontrar uma concentração na qual a proteína não sofresse danos consideráveis em sua estrutura, porém liberasse o artefato (Figura 18).



Figura 18 - Análise da variação das concentrações de cloreto de guanidina (GuHCl) sob a proteína SELA em gel nativo *PhastGel* 4-15% corado com nitrato de prata. 1) padrão de massa molecular (kDa); 0 - 2,0) proteína SELA nas concentrações molares de GuHCl especificadas na figura. Todas as amostras estão na mesma concentração final de proteína SELA (2,0 mg/mL).

Como pode ser observado, a partir da concentração de 2,0 M de cloreto de guanidina, a proteína sofreu alterações conformacionais drásticas em sua estrutura. Consequentemente, adotou-se a concentração imediatamente inferior, a de 1,5 M para o prosseguimento do ensaio descrito no item 3.5 - Metodologias. Entretanto, ao final da incubação com 1,5 M de cloreto de guanidina e após a passagem da mistura pela coluna de exclusão molecular *Superdex* 200 XK (1,6 x 40 cm) (GE) para retirada de oligômeros proteicos com estruturas conformacionais diferentes e também do ácido nucléico contaminante, ainda detectava-se a presença de RNAs na amostra.

82

O fato de não termos conseguido desligar o artefato através da tentativa de promover um relaxamento na estrutura proteica sugeriu a possibilidade desse RNA estar ligado covalentemente à macromolécula. Dessa forma, o que poderia estar ocorrendo seria que, sendo a SELA uma proteína natural de *E. coli*, durante o ciclo celular e a indução de sua expressão, a mesma poderia reconhecer normalmente o seu ligante específico na célula não havendo nada que impedisse a ligação covalente de moléculas de seril-tRNA^{sec} à proteína SELA. E, devido à super-expressão dessa macromolécula com a indução por IPTG, o selenofosfato produzido pela proteína SELD bacteriana poderia não ser suficiente para a continuação da via por completo. Admitindo essa hipótese, um ensaio utilizando a proteína SELD de *Trypanosoma brucei* foi feito com o propósito de fornecer selenofosfato para a proteína SELA purificada e assim, esta realizar a incorporação do selênio ao aminoácido serina liberando a molécula de tRNA. Entretanto, o resultado não foi satisfatório, pois amostras aplicadas em gel não desnaturante revelaram aparente proteólise ou degradação proteica (dados não mostrados).

Outras abordagens foram testadas, dentre as quais a incubação da proteína SELA com RNAses e mesmo com o reagente borohidreto de sódio, o qual promove a redução da ligação entre o aminoácido serina carregado pelo tRNA^{sec} e a molécula de PLP; no entanto, essas alternativas não apresentaram resultados bem sucedidos. Acredita-se que no caso da RNAse, a proteína SELA poderia estar protegendo esse RNA ligado, o que impediria a enzima de realizar a digestão do substrato.

Na busca por novas opções para solucionar essa questão, encontrou-se na literatura a linhagem de *E. coli* WL81460 que apresenta deficiência do gene *selC*, consequentemente não produzindo o tRNA^{sec}, ligante específico da proteína SELA. Dessa forma, expressando o gene codificante para SELA nessa célula bacteriana teria-se maior garantia de que nenhum ligante específico endógeno estaria interferindo em ensaios posteriores.

4.1.2 Lisogenia da linhagem bacteriana WL81460

A linhagem bacteriana WL81460 (FM433 Δ (selC)400) foi gentilmente cedida ao nosso grupo pelo Prof. Dr. August Böck do Instituto de Biociências Moleculares da Universidade de Frankfurt, Alemanha, e como descrito acima, apresenta deficiência no gene *selC* não produzindo o ligante específico (tRNA^{sec}) da proteína SELA. Devido ao fato dessa bactéria não possuir o prófago λ DE3 integrado em seu cromossomo e consequentemente não ser capaz de expressar genes clonados em sistema pET, tal linhagem foi submetida ao protocolo de lisogenia descrito em Metodologias (item 3.6) utilizando-se o kit "*Lambda DE3 Lysogenization*" (Stratagene). O λ DE3 é um fago recombinante que carrega o gene para a enzima T7 RNA polimerase sob controle do promotor *lac*UV5. A lisogenia é preparada através de co-infecção com 3 fagos e é verificada pelo plaqueamento com o Fago T7 Tester (um mutante com deleção da enzima T7 RNA polimerase). Consequentemente, este fago é incapaz de fazer halos em placas de células em que falta a enzima T7 RNA polimerase, somente conseguindo tal fato em placas com células que incorporaram o prófago λ DE3.

Primeiramente os fagos presentes no kit foram propagados e após padronizada a condição de uso dos mesmos seguiu-se a lisogenia da bactéria WL81460 para a incorporação do prófago λ DE3, e posterior realização da verificação de lisogenia com o fago "Tester". Abaixo encontram-se as placas de lisogenia de duas colônias relativas à linhagem WL81460(λ DE3) na presença do fago "Tester":





Figura 19 - Placas de lisogenia das colônias 1 e 2 da linhagem WL81460 mostrando os halos característicos da ação do fago "Tester" sobre lisógenos λDE3. Em A, resultado relativo à colônia 1. Em B, resultado relativo à colônia 2.

Os halos observados nas placas da Figura 19 revelam que as colônias testadas incorporaram o fago λ DE3 nos cromossomos sendo agora, capazes de expressar genes clonados em vetores de expressão do sistema pET. Uma vez selecionado o lisógeno WL81460(λ DE3) este foi submetido ao preparo de células competentes.

84

4.1.3 Clonagem do gene *selA* – substituição da marca de seleção do vetor pET29a(+)-*selA*

A linhagem WL81460(DE3), por apresentar resistência ao antibiótico canamicina fez com que fosse necessário substituir o vetor de expressão (pET29a(+)) em que o gene da proteína SELA estava inserido, devido ao fato deste vetor apresentar marca de seleção para o mesmo antibiótico que a célula. Uma análise foi realizada na tentativa de encontrar vetores de expressão resistentes a outro antibiótico e que possuíssem sítio de clivagem para as enzimas de restrição para *Nde*I e *Hind*III (New England Biolabs) utilizadas para clonagem do gene *selA* no vetor de expressão pET29a(+).

Após uma busca não satisfatória por vetores de expressão para subclonagem do gene de interesse, optou-se por clonar o vetor de expressão pET29a(+) contendo o gene *selA* com o vetor pETDuet-1 com marca de seleção para o antibiótico ampicilina. Para isso, ambos os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Dra*III e *Sap*I (Fermentas) e submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 1% para recuperação dos fragmentos de interesse.

A clivagem do plasmídeo pET29a(+)-*selA* com as enzimas de restrição citadas resultou em um fragmento de interesse de aproximadamente 4600pb que continha o gene *selA* (1392pb). Já a clivagem do plasmídeo pETDuet-1 resultou no fragmento de interesse de aproximadamente 2200pb que carregava o gene de resistência à ampicilina. Após a reação de ligação, a marca de seleção para o antibiótico ampicilina foi adicionada ao plasmídeo pET29a(+)-*selA* ficando este agora resistente aos antibióticos canamicina e ampicilina. Em seguida, o produto de ligação foi transformado em células DH5 α , extraiu-se o DNA plasmidial o qual foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III para verificar a liberação do inserto referente ao gene *selA*. As eletroforeses a seguir apresentam as etapas realizadas.



Figura 20 – Adição da marca de seleção para ampicilina ao plasmídeo pET29a(+) contendo o gene selA. Em A, reação de digestão com as enzimas de restrição DraIII e SapI da construção pET29a(+)-selA e do vetor pETDuet-1. 1) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2) vetor pETDuet-1 não digerido; 3) vetor pETDuet-1 digerido; 4) plasmídeo pET29(+)-selA não digerido; 5) plasmídeo pET29(+)-selA digerido. Em B, reação de digestão da nova construção com as enzimas de restrição NdeI e HindIII. 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) DNA plasmidial da nova construção; 3) digestão do DNA plasmidial da nova construção. A seta em azul mostra o fragmento correspondente ao gene selA.

Após a confirmação da ligação, esse mesmo DNA plasmidial foi sequenciado e transformado em células WL81460(DE3) competentes para expressão do gene de interesse. As metodologias para a expressão gênica e para purificação da proteína SELA foram realizadas de acordo com os protocolos descritos nos itens 3.3, 3.4 e 3.5 do capítulo Metodologias. As etapas de purificação da proteína SELA com a nova construção são apresentadas abaixo:



Figura 21 - Análise em SDS-PAGE 15% das etapas de purificação da proteína SELA expressa em células WL81460(DE3). Em A, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) fração precipitada após adição de 25% de sulfato de amônio; 3) fração coletada após passagem pela coluna *HiTrap Desalting*; 4) fração de proteína SELA durante a fase de lavagem da coluna Hidroxiapatita; 5) 6) 7) e 8) proteína SELA eluída da coluna *HiTrap Q HP* em gradiente linear de KCl; 9) proteína SELA diluída após passagem pela coluna *HiTrap Desalting*. Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína após coluna *HiTrap Desalting* concentrada; 3) proteína SELA concentrada após passagem pela coluna de exclusão molecular. A seta indica a proteína SELA purificada.

86

Após os passos de purificação estabelecidos, obteve-se a proteína com rendimento de aproximadamente 2,5 mg por litro de cultura.

Essa proteína purificada foi submetida à quantificação de RNA presente na amostra através do equipamento *Qubit Fluoremeter* (Invitrogen) nas mesmas condições de concentração proteica (2,0 mg/mL) testadas anteriormente. Satisfatoriamente, não foi registrada pelo equipamento a presença de tal contaminante.

Os resultados obtidos através da lisogenia das células WL81460, bem como da nova construção e purificação da proteína SELA mostraram-se satisfatórios quanto ao seu grau de pureza, possibilitando assim o prosseguimento dos experimentos.

4.1.4 Estudos de Gel filtração analítica

Além do objetivo de melhorar a homogeneidade e a pureza da amostra, os experimentos de gel filtração analítica foram realizados a fim de estimar a massa molecular da proteína SELA e consequentemente o estado oligomérico.

Para se estimar o volume de eluição da proteína, a coluna *Superdex* 200 HL (1,6 x 60 cm) foi previamente calibrada utilizando-se proteínas padrão presentes nos kits de calibração de coluna de gel filtração (GE) e através dessa calibração foi possível prever a localização do pico de eluição (Ve) da proteína SELA e calcular sua massa molecular de forma aproximada como detalhado no capítulo Metodologias, item 3.10.

Utilizando-se o volume de eluição de cada proteína padrão, os valores de *Kavs* foram determinados e plotados contra o logaritmo das respectivas massas moleculares dessas proteínas e a equação da reta que descreve o comportamento apresentado foi estabelecida como sendo: $y = -0.3049 \log(x) + 1.8695 \text{ com } r^2 = 0.9936$.



Figura 22 - Calibração da coluna Superdex 200 HL (1,6 x 60 cm) e cromatograma da etapa de purificação da proteína SELA utilizando essa coluna. Em A, calibração da coluna Superdex 200 HL (1,6 x 60 cm) utilizando proteínas padrão. Em B, cromatograma referente à passagem da amostra de proteína SELA pela coluna Superdex 200 HL (1,6 x 60 cm) indicando o volume de eluição da proteína em estudo. A seta em preto indica a proteína eluída em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5.

O perfil obtido no cromatograma da Figura 22B forneceu um volume de eluição de 48,55 mL para a proteína SELA, o qual aplicado na equação da reta estimou o valor para sua massa molecular de aproximadamente 560 kDa. Considerando a massa molecular do monômero estimada por gel desnaturante de poliacrilamida-SDS 15% como sendo de aproximadamente 50 kDa, pode-se concluir que as proteínas eluídas na fração majoritária do cromatograma se apresentavam na forma decamérica.

4.1.5 Eletroforese em gel não desnaturante

Para examinar o estado oligomérico da proteína SELA por outra metodologia, a proteína purificada foi submetida à eletroforese em gel *PhastGel* 4-15% sob condições não desnaturantes na concentração de 2,0 mg/mL. Juntamente com a amostra de interesse, um conjunto de proteínas de massas moleculares conhecidas foi aplicado como padrão. A distância relativa percorrida no gel por cada proteína padrão foi plotada em relação ao logaritmo da massa molecular de cada uma obtendo-se um gráfico cuja regressão linear apresentou a equação da reta dada por LogMM = -1,9692x + 3,79972, sendo o r² = 0,99657.



Figura 23 - Análise do estado oligomérico da proteína SELA em gel não desnaturante Phast System 4-15% (GE) após passagem pela coluna de exclusão molecular. Em A, a seta indica a proteína SELA em sua estrutura decamérica. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2 e 3) proteína SELA a 2,0 mg/mL, duplicata. Em B, regressão linear relacionando o logaritmo das massas moleculares das proteínas padrão com as respectivas distâncias relativas percorridas no gel.

As análises por meio dessa técnica também estimaram uma massa molecular de aproximadamente 600 kDa para a proteína SELA mostrando o estado decamérico da proteína em estudo; esses dados que estão de acordo com os resultados publicados por Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁶.

4.1.6 Determinação do ponto isoelétrico (pI)

O pI das proteínas pode ser determinado experimentalmente, e é definido como o pH no qual a molécula não migra quando submetida ao campo elétrico. Cada proteína possui um pI característico, que reflete a proporção entre aminoácidos ácidos e básicos presentes na sua estrutura.

O pI experimental da proteína SELA foi determinado como descrito no item 3.12 de Metodologias, empregando-se a distância de migração no gel da proteína de interesse na equação da reta obtida através da migração de proteínas padrão, pI = -0,14695 + 9,34182, com $r^2 = 0,98309$.



Figura 24 - Análise do ponto isoelétrico experimental da proteína SELA. Em A, *PhastGel* IEF 3-9: 1) proteínas padrão de pI; 2) proteína SELA a 2,0 mg/mL. Em B, gráfico apresentando o perfil de migração das proteínas padrão (distância percorrida versus pI).

O ponto isoelétrico determinado experimentalmente para a proteína SELA purificada foi de 6.03, levemente inferior ao valor teórico predito pelo programa $ProtParam^{91}$ (pI = 6.21).

4.1.7 Estudos de dicroísmo circular

A análise da composição da estrutura secundária da proteína SELA foi realizada empregando-se a técnica de dicroísmo circular e os resultados obtidos foram analisados através do programa CDSSTR utilizando-se com os conjuntos de dados SP29 e SP37A.



Figura 25 - Espectro de dicroísmo circular da proteína SELA purificada. Média dos espectros de CD relativa a três experimentos medidos de 250 a 190 nm. A concentração de proteína SELA utilizada foi de 0,2 mg/mL em 20 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7.5, a 25°C.

As quantidades estimadas do conteúdo de estruturas em α -hélices e folhas- β foram de 74 a 76% e de 10 a 13%, respectivamente. Já as estruturas em alças, foram estipuladas entre 2 a 4% e por fim, as regiões não estruturadas, entre 9 a 12%. Essa análise indica que a proteína SELA é majoritariamente constituída por estruturas em α -hélices, o que também pode ser observado pelo perfil de sua curva no espectro de CD, constituído por duas bandas fortemente negativas e de magnitude comparável próximo a 220 e 208 nm e uma banda fortemente positiva próxima a 190 nm.

O estudo de dicroísmo circular da proteína SELA por meio de desnaturação térmica em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 teve 10 mM de DTT acrescido ao experimento para que se evitasse a interferência de ligações de sulfeto durante o processo de desnaturação. O gráfico a seguir relaciona as mudanças estruturais em relação à temperatura registradas pelo dicroísmo circular no comprimento de onda de 222 nm.



Figura 26 - Curva de transição referente à desnaturação térmica da proteína SELA. O experimento foi realizado monitorando mudanças a 222 nm em função da temperatura (10 a 90°C) utilizando 0,2 mg/mL de proteína SELA em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 contendo 10 mM de DTT.

Os resultados obtidos foram média de 3 experimentos independentes e a análise do efeito da temperatura na estrutura secundária da proteína SELA sob as condições testadas mostrou que a proteína manteve sua estrutura secundária e estabilidade até aproximadamente 45°C. Entre as temperaturas de 60 a 70°C, foi observada uma transição acentuada e acima de 70°C não houve mais mudanças aparentes em relação a elipcidade indicando provavelmente perda total da estrutura secundária.

4.1.8 Estudos de espectroscopia de fluorescência intrínseca da proteína SELA

A estrutura terciária da proteína SELA de *E. coli* foi estudada por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência intrínseca através dos resíduos de triptofanos existentes na estrutura, uma vez que o espectro de emissão dos triptofanos é sensível ao ambiente em que se encontram fazendo disso uma característica útil para obtenção de informações sobre a proteína em seu estado nativo.



Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência intrínseca da proteína SELA a 25°C. Para o experimento utilizou-se 0,1 mg/mL de proteína SELA em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5. Os espectros de emissão foram registrados entre os comprimentos de onda de 300 a 450 nm utilizando excitação em 295 nm e filtro *cutoff* de 305 nm na emissão.

Como visualizado na figura acima, o espectro de emissão apresenta um máximo de intensidade de fluorescência em aproximadamente 339 nm. O sinal de intensidade de fluorescência obtido trata-se de uma média das contribuições dos 4 resíduos de triptofanos presentes em cada monômero da estrutura da proteína em estudo e aparentemente o perfil de emissão sugere que esses resíduos de triptofano encontram-se relativamente internalizados na molécula de proteína indicando que a proteína em questão apresentava-se estruturada.

4.1.9 Amplificação do gene de Inserção de Selenocisteína-tRNA^{sec} (*selC*) e mutantes

Como descrito no item 3.8 da seção Metodologias, o gene *selC* de *E. coli* e *T. brucei*, o gene para uma das isoformas do tRNA^{ser} de *E. coli* e os genes com as mutações em cada braço referente ao tRNA^{sec} foram amplificados através de oligonucleotídeos que apresentavam uma região complementar e posteriormente, os produtos amplificados foram purificados de gel de agarose 2% utilizando o kit "*Perfect Gel Cleanup*" (Eppendorf).



Figura 28 - Fragmentos amplificados correspondentes aos genes selC e tRNA^{ser} de E. coli, selC de T. brucei e aos mutantes. Em A, 1) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2) gene selC de T. brucei (117pb) e gene para o tRNA^{ser} de E. coli (119pb). Em B, 1) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2) gene selC de E. coli (121pb); 3), 4), 5), 6), 7) e 8) amplificação dos genes mutantes, respectivamente: mutante aceptor (119pb), D (122pb), anticódon (121pb), TψC (121pb), variável 1 (região deletada – 101pb) e variável 2 (região substituída – 115pb).

Através dos resultados obtidos referentes às eletroforeses acima, verificou-se que os fragmentos foram perfeitamente amplificados e as bandas de interesse assinaladas foram recuperadas no gel satisfatoriamente.

Em seguida, os fragmentos moldes purificados foram submetidos à reação de transcrição *in vitro* empregando-se o kit "*Megashortscript T7*" (Ambion) devido ao mesmo proporcionar maior rendimento de produto transcrito (item 3.9 do capítulo Metodologia). Após realizada as reações de transcrição *in vitro*, seguiu-se o protocolo para purificação do transcrito de acordo com as especificações do fabricante. Os transcritos purificados foram solubilizados em água livre de RNAse, enovelados e analisados por eletroforese em gel de agarose 2% para verificação de sua pureza e integridade.



Figura 29 - Produtos da reação de transcrição *in vitro* após procedimento de purificação. Em A, 1) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2) SELC de *T. brucei* (91 bases); 3) tRNA^{ser} de *E. coli* (93 bases). Em B, 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) SELC de *E. coli* (95 bases); 3), 4), 5), 6), 7) e 8) amplificação dos genes mutantes, respectivamente: mutante aceptor (93 bases), D (96 bases), anticódon (95 bases), TψC (95 bases), variável 1 (região deletada – 75 bases) e variável 2 (região substituída – 89 bases).

Como visualizado na Figura 29, as reações de transcrição de todos os genes molde foram bem sucedidas não havendo traços visíveis de impurezas ou qualquer degradação do produto.

Os transcritos foram armazenados a temperatura de -20°C até o momento de sua utilização.

4.1.10 Ensaio de dicroísmo circular do tRNA^{sec} de E. coli

O ensaio de dicroísmo circular do tRNA^{sec} de *E. coli* empregando variação de temperatura foi realizado com finalidade de acompanhar as mudanças em sua estrutura em relação ao pareamento de bases. O mesmo equipamento empregado para os experimentos envolvendo a proteína SELA foi utilizado e as condições experimentais encontram-se descritas em Metodologia (item 3.13).



Figura 30 - Espectros de dicroísmo circular apresentando as mudanças conformacionais em função da temperatura do tRNA^{sec} de *E. coli* sintetizado *in vitro*. As diferentes cores representam as mudanças na elipcidade em função da temperatura de 85°C (inicial) a 5°C (final).

Como pode ser visualizado nesse experimento, o apropriado pareamento de nucleotídeos e consequentemente, o enovelamento, é relativamente mais encontrado em

96

baixas temperaturas. Isso é constatado devido ao aumento da elipcidade no comprimento de onda de 270 nm (o que representa a formação de pareamentos de bases) em relação à diminuição gradual da temperatura. Esse dado mostra que a técnica empregada para o enovelamento de moléculas de tRNA (aquecimento e depois resfriamento gradativo e lento) é adequada pois promoveu o pareamento das bases e um enovelamento mais completo.

4.2 Discussão dos Resultados

O estudo da síntese do aminoácido selenocisteína e a sua incorporação cotraducional em fase de leitura a códons de terminação (UGA) é uma via complexa que envolve muitas características particulares, quando comparada aos outros aminoácidos, consequentemente a incorporação do elemento selênio em proteínas na forma do aminoácido selenocisteína representa uma expansão do código genético²⁷.

Em *Escherichia coli*, esse processo ocorre cotraducionalmente por meio de uma complexa via enzimática e a proteína Selenocisteína sintase (SELA) desse organismo é uma enzima participante da via de incorporação do aminoácido selenocisteína em proteínas apresentando uma molécula de piridoxal 5´-fosfato covalentemente ligada a sua estrutura por intermédio de resíduos de lisina. Essa enzima foi identificada e primeiramente purificada na década de 90 por Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁶.

O protocolo de purificação previamente estabelecido na literatura foi posteriormente modificado em nosso laboratório acrescentando mais uma etapa de purificação utilizando cromatografia de exclusão por tamanho, o que possibilitou uma considerável melhora na pureza e homogeneidade da amostra final favorecendo a confiabilidade dos resultados.

Entretanto, a possibilidade posteriormente comprovada da existência de RNAs contaminantes ligados a proteína SELA devido à realização de expressão homóloga, desencadeou várias tentativas com a finalidade de promover a separação desse contaminante da macromolécula em estudo, as quais não apresentaram sucesso. Felizmente, a abordagem de expressão do gene de interesse utilizando a linhagem de *E. coli* WL81460(DE3) promoveu resultados importantes e satisfatórios para o andamento dos estudos, uma vez que esse sistema garantiu a produção da proteína SELA ausente de artefatos endógenos ligados a sua estrutura, fato que causaria interferência nos experimentos de ligação posteriores.

As análises bioquímicas por gel filtração analítica assim como os resultados obtidos pelos experimentos de eletroforese em gel não desnaturante demonstram que a proteína SELA apresenta-se com um homodecâmero em solução. Esses dados também encontram-se em concordância com os resultados publicados por Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁶.

Análises biofísicas da proteína SELA apresentaram um ponto isoelétrico experimental de 6.03, consistente com o valor predito a partir da sequência de aminoácidos.

Na tentativa de melhor compreensão do comportamento estrutural e dinâmico da proteína Selenocisteína sintase, experimentos para análise de sua estrutura secundária bem como de desnaturação térmica através da técnica de dicroísmo circular foram realizados. Os experimentos de dicroísmo circular para análise do conteúdo de estruturas secundárias revelou a predominância de estruturas em α-hélices (cerca de 74%) na macromolécula em estudo, valor relativamente superior ao teórico (54%) predito por Forchhammer e colaboradores⁵⁶ baseado na sequência de aminoácidos da proteína. Já o processo de desnaturação térmica mostrou a preservação das estruturas secundárias até a temperatura de aproximadamente 45°C, condizente para suportar a temperatura normal de crescimento (aproximadamente 37°C) de bactérias *E. coli* sem danos em sua estrutura secundária.

Ensaios de espectroscopia de fluorescência intrínseca indicaram um máximo de emissão dos resíduos de triptofano próximo a 339 nm, o que presumivelmente aponta para o fato desses resíduos estarem internalizados em um ambiente hidrofóbico da proteína, sugerindo dessa forma, que a proteína encontra-se estruturada.

Outra abordagem satisfatória foi a alteração dos protocolos para produção dos moldes de DNA, transcrições desses moldes e processos de purificação dos tRNAs transcritos; essas modificações promoveram uma maior facilidade para a síntese dessas moléculas e a obtenção de maior quantidade e qualidade do produto final. Todos os tRNAs: SELC de *E. coli*, SELC de *T. brucei*, tRNA^{ser} de *E. coli*, e os 6 mutantes de SELC de *E. coli* desenvolvidos, foram produzidos e purificados de maneira bem sucedida mostrando-se puros, íntegros e confiáveis para participação em experimentos subsequentes.

Para ser uma molécula funcional, o tRNA precisa apresentar uma estrutura tridimensional adequada e espera-se que o enovelamento dessa molécula seja menos evidente em altas temperaturas⁹⁶. A técnica de dicroísmo circular mais uma vez foi utilizada para verificar o enovelamento dos tRNAs. Com o intuito de determinar se realmente o protocolo de enovelamento em uso promovia um pareamento de bases na molécula empregou-se o processo de desnaturação térmica reversa, ou seja, iniciou-se o experimento a temperatura de

98

85°C e promoveu-se o resfriamento gradual. Esse ensaio para tRNAs relaciona a medida direta da quantidade de estrutura secundária em função da temperatura, e os resultados obtidos encontram-se de acordo com os experimentos realizados por Moulton e colaboradores⁹⁶ os quais relatam um aumento do pico em 270 nm e uma acentuação do vale a 210 nm a medida que a molécula de tRNA adquire uma conformação enovelada. Consequentemente, tal fato sugere que a técnica de enovelamento utilizada para as moléculas de tRNA (aquecimento e depois resfriamento gradativo e lento) foi adequada pois promoveu o pareamento das bases complementares e consequentemente um enovelamento mais apropriado da molécula de tRNA aumentando a confiabilidade da amostra para os ensaios seguintes.

Parte desses resultados foi organizada em um artigo científico, o qual está sendo submetido para a revista internacional *Protein Expression and Purification* (Anexo 1).

Capítulo 5 – Estudos de Interação da proteína SELA com ligantes

O aminoácido selenocisteína (Sec) foi descoberto em meados de 1960^{99} e é considerado o 21° aminoácido⁴⁰ presente em enzimas de organismos dos três domínios de vida: eubactéria, arqueas e eucarioto.

A síntese e incorporação de Sec na cadeia polipeptídica são realizadas através de uma complexa via, dirigida pelo códon de terminação UGA presente no RNA mensageiro⁵⁶. Em *Escherichia coli*, as etapas da via de incorporação de selenocisteína envolvem primeiramente a aminoacilação do tRNA^{sec} com o aminoácido serina pela enzima Seril-tRNA sintetase seguida pela conversão do seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec} pela enzima Selenocisteína sintase^{18,31}.

Em 1992, imagens da proteína Selenocisteína sintase foram obtidas por Engelhardt e colaboradores⁶⁰ através de microscopia eletrônica usando a técnica de *negative staining* (Figura 31).



Figura 31 - Projeção da proteína SELA obtida por microscopia eletrônica utilizando a técnica de *negative staining*. A preparação foi realizada utilizando acetato de uranila. Extraído de ⁶⁰.

Entretanto, as projeções obtidas não eram suficientes para elucidar se a proteína SELA era formada por 5 subunidades provenientes de **um** polipeptídeo cada ou **mais do que um**. As projeções da proteína SELA (Figura 31) permitiram estimar o volume aproximado de uma unidade morfológica como sendo 190 nm³, assumindo que a espessura da molécula fosse uniforme. Essa análise proporcionou a estimativa de uma massa molecular inferior a 150 kDa, o que corresponde a presença de pelo menos 2 monômeros por subunidade⁶⁰. Essas informações corroboram os ensaios de cromatografia de permeação em gel realizados por Forchhammer e colaboradores⁵⁶, os quais estimaram uma massa molecular de 600 kDa para a enzima SELA intacta, sugerindo que uma molécula de SELA era composta por 10 monômeros (massa molecular do monômero 50,667 kDa). Estudos da enzima SELA realizados para determinação da estequiometria de ligação do complexo SELA-tRNA^{sec} se liga a cada dímero da macromolécula SELA, perfazendo um total de 5 moléculas de tRNA^{sec}

O alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína SELA de *E. coli* com homólogos em: *Moorella thermoacetica, Desulfomicrobium baculatum e Haemophilus influenzae*, revelou a presença de 3 resíduos de lisina conservados localizados nas posições 224, 295 e 328 (numeração referente a sequência de *E. coli*) candidatos a ligação com PLP⁵⁵.

1 1 1	eq:mtetrflysqlpaidrllrdssflslrdtyghtrvvellrqmldearevtrgsqtlpawcenwaqemperimented of the statement of the statemen	E.coli D. baculatum H. influenzae M. thermoacetica
68	VDARLITKEAQSALRPVINLTGTVLHTNLGRALQAEAAVEAVAQAMRSPVTLEYDLDDAGRGHRDRALAQL	E.coli
67	AGAYVRTRSRPHFRRVVNATGVVIHTNLGRSILAEEAVLAVAEGCRHVSNLEMDLDTGORGSRYSHVEKL	D. baculatum
67	IHSHLQKQNQVQIKAVHNLTGTVLHTNLGRALWSEAAQQAALSAMQKNVSLEYDLDEGKRSHRDNYISEL	H. influenzae
65	IENRYHEAGRSSLRPVINATGVVLHTNLGRAILSPAARAAALTAAGRYTNLEYDLEKGQRGNRYSHVTGL	M. thermoacetica
138	LCRITGAEDACIVNNNAAAVLLMLAATASGKEVVVSRGELVEIGGAFRIPDVMRQAGCTLHEVGTTNRTH	E.coli
137	LCRLTGAEAGLVVNNNAAAVLLVLDTLAKGREVVVSRGQLVEIGGSFRIPEVMKKSGAVLREVGATNRTH	D. baculatum
137	LCKLTGAEAACIVNNNAAAVLLMLATFAQGKEVIISRGELIEIGGAFRIPDIMEQAGCHLVEVGTTNRTH	H. influenzae
135	LKELTGAEEALVVNNNAAAVLLALSTLAAGRETIISRGQLVEIGGSFRIPEVMGQSGTRLVEVGTTNKTY	M. thermoacetica
208 207 207 205	$\label{eq:constraint} \begin{tabular}{lllllllllllllllllllllllllllllllllll$	E.coli D. baculatum H. influenzae M. thermoacetica
	* (295) (328) *	
278	POELIAAGVSLVSFSGDKLLGGPQAGIIVGKKEMIARLQSHPLKRALRADKMTLAALEATLRLYLHPEAL	E.coli
277	VQQVLRSGVDVVTFSGDKLLGGPQAGVIVGRREFIERIKKNQLNRALRIDKMTLAALEATLRLYLDPEQA	D. baculatum
277	VQEKIAQGVDLVSFSGDKLLGGVQAGIIVGKKEWIEQLQAHPLKRVLRCDKVILAGLEATLRLYLNPEKL	H. influenzae
275	VQAEINQGVDVVTFSGDKLLGGPQAGIIVGRRDLVAAMAGHPLTRALRIDKMNLAALEATLRAYRNPDRA	M. thermoacetica
348 347 347 345	SEKLPTLRLLTRSAEVIQIQAQRLQAPLAAHYGAEFAVQVMPCLSQIGSGSLPVDRLPSAALTFTPHDGR RRTVPTLAMITAAPKELHARAGRLRRRLSRDLAGLASVAVKPGFSRVGGGSFPEQDLSTTLVSVAPTGM-TEKLPTLRLLTQPLKQLKINAMRLKERLESRLNSQFELQIEASQAQIGSGSQPMERIPSVAVTIAEKT VKEIPTLAALVALPEDLRLRAEELQKLLTSVLGSRARVGLMPTTSQAGGGSLPVTELPSWAITIRPEQG-	E.coli D. baculatum H. influenzae M. thermoacetica
418	GSHLESLAARWRELPVPVIGRIYDGRLWLDLRCLEDEQRFLEMLLK	E.coli
416	DVDSLRQGLLAEDIPVVGRVEDGAFCLDPRTIMDAEFALVAGAMKAVLAR	D. baculatum
415	NAKLSALSARFKQLSQPIIGRMENGKIWLDLRSLADIETLLNTLDEL	H. influenzae
414	GAAGLVTALRRTDPPVLARVQDDLLLLDVRTLLPGEGEELARALVQALEGAVHGGES	M. thermoacetica

Figura 32 - Alinhamento das sequências da enzima Selenocisteína sintase de diferentes organismos. Os resíduos de lisina conservados estão destacados com asteriscos. Extraído e modificado de ⁵⁵.

Quando em *E. coli*, esses resíduos foram separadamente substituídos por resíduos de asparagina por meio de mutagênese sítio-dirigida, observou-se que a substituição do resíduo de lisina da posição 295 aboliu a atividade catalítica da enzima bem como a ligação ao PLP, constatando, portanto que o resíduo de lisina dessa posição é essencial para a atividade da proteína SELA de *E. coli*. Todas as sequências de aminoácidos referentes à proteína Selenocisteína sintase, inclusive as do gênero *Methanococcus*, apresentam o resíduo de lisina homólogo a lisina 295 de *E. coli*⁵⁵.

Nesse capítulo, serão principalmente descritos os estudos e as técnicas utilizadas para investigação do comportamento da proteína SELA em solução e da interação da mesma com seu ligante específico (tRNA^{sec}) e com tRNAs diferentes.

5.1 Resultados

5.1.1 Ensaios de Microcalorimetria por Titulação Isotérmica

A técnica de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) vem sendo amplamente utilizada para a avaliação termodinâmica da interação de pequenas moléculas com moléculas maiores como, por exemplo, proteínas¹⁰⁰. Essa técnica possibilita a medida direta do calor trocado durante a ligação de uma molécula à proteína de interesse, permitindo a determinação de parâmetros como variação de entalpia do processo, constante de afinidade e estequiometria de reação. A partir desses parâmetros podem ser calculadas a variação de entropia e a energia livre de Gibbs o que consequentemente fornece um panorama completo do mecanismo termodinâmico da reação em questão¹⁰¹.

Como inicialmente pretendido, diferentes testes em várias condições foram realizados tanto no Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) como no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com o objetivo de determinarmos os parâmetros de interesse para a reação em questão.

Infelizmente, diversos problemas ocorreram em relação ao equipamento e ao preparo das amostras, dentre os quais podemos citar: a recém-instalação do equipamento no IFSC, bem como a pouca experiência no manuseio do mesmo e conhecimento da técnica, à climatização da sala de operação, oscilação da rede elétrica, interferências de alguns reagentes no sinal resposta, quantidade insuficiente de amostras para realização das medidas, variação de pH entre titulante e titulado, entre outros. Como já dito anteriormente, trata-se de uma técnica muito interessante, que fornece parâmetros de ligação importantes e confiáveis, entretanto sua aplicabilidade para o sistema estudado não foi satisfatória.

Devido aos empecilhos encontrados e ao nosso grande interesse em determinar pelo menos alguns dos parâmetros envolvidos nessa interação, optamos por outras técnicas para alcançarmos o objetivo proposto.

5.1.2 Medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca

Ensaios de titulação da proteína SELA com seu ligante específico tRNA^{sec} foram realizados através do emprego da técnica de espectroscopia de fluorescência intrínseca, monitorando possíveis variações na emissão dos resíduos de aminoácidos aromáticos da proteína SELA, a fim de verificarmos a ligação da proteína SELA com seu ligante.

Através da análise dos espectros foi observada uma diminuição da intensidade de emissão na região de 339 nm em função de concentrações crescentes de tRNA (Figura 33A e B) o que sugere uma possível interação entre a proteína e o ligante.



Figura 33 - Titulação da proteína SELA com tRNA^{sec} através da técnica de espectroscopia de fluorescência intrínseca. Em A, o gráfico apresenta a diminuição da intensidade de emissão do pico em 339 nm em relação à quantidade de tRNA adicionada. (○) representa a diminuição da intensidade de fluorescência a 339 nm. Em B, espectros de emissão da proteína SELA na ausência e na presença de diferentes concentrações do ligante. Detalhes experimentais encontram-se na seção Metodologias item 3.16.

104

Devido ao uso de filtro *cutoff* de 335 nm (corte de 50% da intensidade em 335 nm) para registro dos espectros de emissão, a intensidade de emissão na região do comprimento de onda de 339 nm foi relativamente diminuída. Entretanto, como o pico de emissão da proteína apresenta-se nessa região (item 4.1.8. do Capítulo 4), optou-se por manter a construção e análise das curvas de titulação no comprimento de onda de 339 nm.

Todavia, a concentração de SELA utilizada (5000 nM de monômero) é considerada elevada para determinação de parâmetros como constantes de ligação, e os resultados empregando concentrações menores, cerca de 50 e 30 nM de monômeros, não foram satisfatórios devido a deficiência de um sinal adequado para o experimento (Figura 34) e ao aspecto ruidoso dos espectros obtidos referentes a essas quantidades.



Figura 34 - Espectro de emissão da proteína SELA na concentração de 50 e 30 nM de monômeros. A excitação dos resíduos de triptofanos foi realizada no comprimento de onda de 290 nm e os espectros de emissão registrados entre 300 a 450 nm, a 25°C.

Visto que esses fatores não favoreciam a credibilidade do ensaio, bem como não garantiam confiabilidade para a continuidade desse experimento, novas abordagens foram testadas na tentativa de determinarmos a princípio, a ocorrência e os parâmetros da ligação em estudo com maior credibilidade.

5.1.3 Ensaios de espectroscopia de fluorescência extrínseca

Outro ensaio desenvolvido visando medir a interação entre o tRNA e a proteína SELA foi baseado na medida de fluorescência de brometo de etídio após intercalação com ácido nucléico. Uma quantidade fixa de brometo de etídio foi adicionada à amostra de tRNA e a fluorescência desse reagente foi registrada em função da concentração de SELA frente à excitação no comprimento de onda de 254 nm. Os espectros foram registrados de 500 a 700 nm e a emissão no ponto de 600 nm (pico de emissão do brometo de etídio) foi utilizada para a análise da isoterma de interação. Um controle foi realizado com a adição sucessiva apenas de tampão ao tRNA com brometo de etídio para posteriormente subtrair a contribuição deste dos resultados de titulação com a proteína de interesse.



Figura 35 - Isoterma de ligação de SELA - tRNA^{sec}. Isoterma de ligação referente à titulação do tRNA^{sec} (200 nM) na presença de brometo de etídio (100 nM) pela adição de proteína SELA. (•) representa a diminuição da intensidade de fluorescência a 600 nm.

Nesse experimento, observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 600 nm em função do aumento da concentração de SELA. A diminuição do valor de intensidade poderia estar acontecendo devido a algumas moléculas de brometo de etídio ligadas ao tRNA serem deslocadas quando esse interagisse com a proteína SELA. Como realizou-se a excitação em 254 nm, as moléculas de brometo livre em solução não seriam tão excitadas quanto aquelas ligadas ao tRNA. Dessa forma, a diminuição da intensidade de fluorescência a 600 nm sugere que um menor número de moléculas de brometo

de etídio estão sendo excitadas, ou seja, mais moléculas de brometo estariam livres em solução devido ao fato da formação do complexo SELA-tRNA ter deslocado moléculas de brometo de etídio que estavam ligadas na região de interação. O plateau final que a intensidade de emissão alcança poderia ser explicado pelas moléculas de brometo de etídio ligadas em outros sítios do tRNA já complexado e que não participam da interação. Dessa forma, esses resultados sugerem que a proteína SELA e o tRNA^{sec} estão interagindo nas condições experimentais testadas.

Consequentemente, optou-se por diminuir a concentração do tRNA marcado com brometo de etídio a fim de determinar algum parâmetro de ligação. Para isso, concentrações de 100 e 50 nM de tRNA foram testadas mantendo-se a concentração de brometo de etídio do ensaio anterior. Entretanto, concentrações mais baixas de tRNA não permitiram a detecção de variações relevantes no sinal de fluorescência. Como pode ser visualizado na Figura 36, os valores de emissão do brometo de etídio não sofreram alterações consideráveis em função do aumento da concentração de proteína.



Figura 36 - Interação da proteína SELA com tRNA^{sec}. Ensaio de ligação referente à titulação do tRNA^{sec} (100 nM) na presença de brometo de etídio (100 nM) pela adição de proteína SELA.

5.1.4 Ensaios de crosslinking químico

Visando caracterizar o estado oligomérico em que se encontrava a proteína SELA livre ou na presença de tRNA, realizou-se ensaios de *crosslinking* empregando o reagente glutaraldeído, seguido por análise da reação em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

106
De acordo com a Tabela 7, apresentada no item 3.14 do capítulo Metodologias, os resultados obtidos a partir da interação da proteína SELA com o reagente glutaraldeído na ausência de tRNA mostram que aparentemente a reação de *crosslinking* aconteceu entre os monômeros da proteína SELA. A partir da Figura 37, observa-se uma banda majoritária com massa molecular aproximada entre os padrões de 445 e 669 kDa, o que sugere um decâmero (10 x 50,6 kDa = 507 kDa). Esses resultados corroboram dados de cromatografia de permeação em gel (Forchhammer e colaboradores, 1991)⁵⁶ os quais sugeriam a existência de SELA na forma decamérica, com massa molecular de aproximadamente 600 kDa.



Figura 37 - Crosslinking químico da proteína SELA com o reagente glutaraldeído em análise por gel nativo Phast System (GE). Géis nativos PhastGel 4-15% de poliacrilamida mostrando o resultado do crosslinking químico da proteína SELA. Em A, 1) proteína SELA sem crosslinking; 2) SELA com 0,02% de glutaraldeído; 3) SELA com 0,05% de glutaraldeído; 4) SELA com 0,1% de glutaraldeído; 5) SELA com 0,2% de glutaraldeído; 6) SELA com 0,5% de glutaraldeído. Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína SELA sem crosslinking; 3) SELA com 1% de glutaraldeído; 4) SELA com 2% de glutaraldeído; 5) SELA com 3% de glutaraldeído; 6) SELA com 5% de glutaraldeído.



Figura 38 - Crosslinking químico da proteína SELA com o reagente glutaraldeído em gel SDS-PAGE 10%. Em A e B, 1 e 10) padrão de massa molecular (kDa); 2 e 11) proteína SELA sem crosslinking; 3) SELA com 0,01% de glutaraldeído; 4) SELA com 0,02% de glutaraldeído; 5) SELA com 0,05% de glutaraldeído; 6) SELA com 0,07% de glutaraldeído; 7) SELA com 0,1% de glutaraldeído; 8) SELA com 0,2% de glutaraldeído; 9) SELA com 0,5% de glutaraldeído; 12) SELA com 1,0% de glutaraldeído; 13) SELA com 2,0% de glutaraldeído; 14) SELA com 3,0% de glutaraldeído e 15) SELA com 5,0% de glutaraldeído.

Os resultados de eletroforese nativa mostram que a partir da concentração de 1,0% de glutaraldeído 3 estados oligoméricos menores que o decâmero são detectados na amostra (massas moleculares de aproximadamente 100, 200 e 300 kDa) e cuja população aumenta progressivamente em função do aumento da concentração do agente de *crosslinking*. Frente a esse resultado, acreditamos que o sistema SELA possa apresentar uma transição entre diversos estados oligoméricos menores na montagem do decâmero consolidado. Consequentemente, o reagente glutaraldeído em concentrações mais elevadas agiu como se tivesse registrando uma imagem instantânea, do que estava acontecendo. Isto sugere que a proteína SELA forma a estrutura homodecamérica através de uma via populada por passos de oligomerização intermediários, e não através de um passo único de montagem.

De outra forma, sugerimos que a formação do decâmero SELA não ocorre em apenas duas etapas:

Monômero→ Decâmero,

e sim, através da associação de estados oligoméricos intermediários como, por exemplo,

 $Monômero \rightarrow Dímero \rightarrow Tetrâmero \rightarrow Hexâmero \rightarrow Decâmero$

As análises das reações de *crosslinking* da proteína SELA por gel SDS-PAGE aparentemente corroboram com a hipótese apresentada acima, pois mesmo após a reação de *crosslinking* com altas concentrações de glutaraldeído ainda é possível observar a presença de bandas correspondentes a estruturas monoméricas, sugerindo que algumas moléculas do sistema realmente poderiam estar em equilíbrio na solução.

Os ensaios de *crosslinking* também foram feitos incubando-se 30 μ M de proteína SELA com o ligante tRNA^{sec} de *E. coli* e posteriormente adicionando o reagente glutaraldeído (Tabela 8 – capítulo Metodologias). Optou-se por utilizar somente duas concentrações de glutaraldeído (0,1 e 0,2%) para esses ensaios e realizou-se somente a análise em gel SDS-PAGE 10%.



Figura 39 - *Crosslinking* químico da proteína SELA com o ligante tRNA^{sec} em gel SDS-PAGE 10%. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) SELA com 15 μ M de tRNA^{sec} e 0,1% de glutaraldeído; 3) SELA com 15 μ M de tRNA^{sec} e 0,2% de glutaraldeído; 4) SELA com 30 μ M de tRNA^{sec} e 0,1% de glutaraldeído; 5) SELA com 30 μ M de tRNA^{sec} e 0,2% de glutaraldeído; 6) SELA com 60 μ M de tRNA^{sec} e 0,1% de glutaraldeído; 7) SELA com 60 μ M de tRNA^{sec} e 0,2% de glutaraldeído.

Aparentemente, esses resultados sugerem que o *crosslinking* entre proteína SELA e o ligante tRNA^{sec} (SELC) foi possível nas condições testadas, visto que uma banda de massa molecular consideravelmente elevada e ausente no gel anterior (*crosslinking* SELA sem tRNA) foi verificada. Tal banda indicada pela seta vermelha na figura acima, fica proporcionalmente mais evidente com o aumento da concentração de tRNA^{sec} na reação, indicando interação entre a proteína e o ligante de interesse.

5.1.5 Marcação da proteína SELA e dos tRNAs com fluoróforo extrínseco

Após confirmada a interação entre a proteína SELA e o tRNA^{sec} por meio das técnicas de fluorescência extrínseca utilizando brometo de etídio e *crosslinking* químico com o emprego do reagente glutaraldeído, estudou-se novamente possíveis metodologias aplicáveis para a determinação dos parâmetros de ligação envolvidos na formação do complexo.

Optou-se pela tentativa de utilização da técnica de anisotropia de fluorescência para observação da formação do oligômero da proteína SELA em solução, bem como para investigar forças dominantes e parâmetros envolvidos na interação SELA-tRNA^{sec}. A anisotropia de fluorescência mede, indiretamente, a movimentação de moléculas em solução; complexos maiores apresentam valores maiores de anisotropia pelo fato de se movimentarem mais lentamente. Através dessa técnica teria-se a possibilidade de utilização de fluoróforos mais sensíveis, mais eficientes e, para os ensaios envolvendo tRNAs, a marcação da molécula de ligante aconteceria de forma covalente e mais homogênea (1 molécula de tRNA : 1 molécula de fluoróforo).

Para o desenvolvimento dos estudos de oligomerização da proteína SELA em solução, foi necessário realizar a marcação da proteína com o fluoróforo fluoresceína de acordo com o protocolo do item 3.20.1, seção Metodologias. Após o tempo de incubação necessário para a marcação, a amostra de proteína foi submetida à coluna *HiTrap Desalting* (GE) em sistema *Akta Purifier* (GE) para a separação do complexo SELA-fluoresceína do excesso de fluoresceína livre. Esse passo foi monitorado em dois comprimentos de onda distintos: 280 nm para acompanhamento da proteína e 495 nm para acompanhamento do fluoróforo.



Figura 40 - Cromatograma referente à separação da proteína SELA marcada do excesso de sonda livre. Em A, pico referente à SELA marcada com fluoresceína. Em B e C, picos referentes ao excesso de fluoresceína. O reagente de fluoresceína utilizado é um marcador eficiente que se liga covalentemente em aminas primárias da cadeia polipetídica, ou seja, na porção N-terminal proteica e em cadeias laterais de resíduos de lisina e arginina.

Como pode ser observado no cromatograma acima, a proteína SELA foi eluída conjuntamente com uma fração do fluoróforo, indicando o sucesso na marcação da proteína de interesse.

Os tRNAs: SELC e tRNA^{ser} de *E. coli*, SELC de *T. brucei*, mutantes e um oligonucleotídeo de DNA fita simples também foram marcados para serem aplicados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. Para essas moléculas, alguns protocolos de marcação para as regiões 5' e 3' livres foram testados, entretanto, somente a marcação da região 5' empregando o kit "5' *EndTag Nucleic Acid Labelling System*" (Vector laboratories) foi bem sucedida e consequentemente, esse método foi empregado para todos os ácidos nucléicos utilizados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. A purificação das moléculas marcadas foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante do kit citado e, em nível de conferência, uma pequena fração do produto marcado e purificado foi submetida à coluna *HiTrap Desalting* (GE) para verificação da marcação e da presença de fluoróforos livres.



Figura 41 - Cromatograma referente à marcação do tRNA^{sec} de *E. coli* realizada utilizando o kit "5′ *EndTag Nucleic Acid Labelling System*". A seta indica a eluição do tRNA^{sec} ocorrendo conjuntamente com o fluoróforo.

Como pode ser observado pela sobreposição das absorções em 260 e 495 nm, a amostra de tRNA foi eluída juntamente com o fluoróforo indicando que o procedimento de marcação foi feito com êxito. Além disso, não são observados no cromatograma outros picos nos comprimentos de onda utilizados, mostrando que não houve degradação da amostra de tRNA e que todo o fluoróforo em excesso foi removido durante as etapas de purificação

112

realizadas. Esse fato mostrou que o protocolo utilizado para marcação e purificação dos tRNAs foi adequado e satisfatório.

Análise de eletroforese em gel de agarose 2% também foi realizada com os ácidos nucléicos marcados e purificados, com o intuito de verificar a integridade dos mesmos para os ensaios posteriores.



Figura 42 - Análise dos ligantes marcados com fluoresceína em gel de agarose 2%. Em A, 1) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2) tRNA^{sec} de *E. coli* marcado; 3) tRNA^{sec} de *Trypanosoma brucei* marcado; 4) oligonucleotídeo de DNA marcado; 5) tRNA carregador de serina de *E. coli* marcado. Em B, 1 e 3) padrão de massa molecular 1kb Plus (Fermentas); 2), 4), 5), 6), 7) e 8) mutantes marcados: aceptor, D, anticódon, TψC, variável 1 (braço deletado), variável 2 (braço substituído), respectivamente.

As eletroforeses acima mostram que os tRNAs marcados não apresentam contaminante ou degradação após o processo de marcação e purificação que possam vir interferir nos ensaios de anisotropia de fluorescência. Dessa forma, assegura-se a boa qualidade da amostra e minimiza-se possíveis resultados provenientes de artefatos.

Depois de verificada a qualidade da macromolécula marcada e dos ligantes marcados, os últimos foram enovelados e armazenados a -80°C para os ensaios seguintes.

5.1.6 Novo protocolo de purificação para a proteína SELA

Devido à necessidade de concentrações elevadas de proteína SELA para a realização dos ensaios de anisotropia de fluorescência, um novo protocolo de purificação foi desenvolvido com o auxílio do aluno de doutorado do Instituto de Física de São Carlos, Marcos Michel de Souza.

O protocolo inicial foi mantido até a etapa de precipitação da amostra com 25% de sulfato de amônio e passagem da proteína pela coluna *HiTrap Desalting* (GE) para remoção

do sal. Após esse passo, foi acrescido à proteína a concentração final de 20% de solução de Nycodenz® preparada em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5 sem PLP. O reagente Nycodenz® é um derivado triiodado do ácido benzóico contendo três cadeias alifáticas e é rotineiramente empregado no isolamento e separação de partículas biológicas como ácidos nucléicos, proteínas, polisacarídeos, organelas e vírus, por meio de técnicas de centrifugação (http://www.freewebs.com/eldri123/Nycodenz.pdf; http://www.freewebs.com/eldri123/ Nycodenz.pdf). Após a adição desse reagente, a amostra foi concentrada e submetida à cromatografia de exclusão molecular para o alcance de melhor pureza da proteína e retirada do reagente Nycodenz®. A proteína eluída foi novamente concentrada em concentradores de corte de 100 kDa e o resultado analisado em gel de SDS-PAGE 15%.



Figura 43 - Análise das etapas de purificação da proteína SELA pela metodologia empregando o reagente Nycodenz®. Em A, cromatograma referente à passagem da amostra pela coluna Superdex 200 HL (1,6 x 60 cm). A seta em preto representa a eluição da proteína SELA e a seta em verde, a eluição do reagente Nycodenz®. Em B, gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna HiTrap Desalting (GE); 4) amostra com Nycodenz® concentrada a 2 mL; 5) amostra eluída da coluna de exclusão molecular; 6) amostra eluída concentrada em concentrador de corte de 100 kDa.

A análise do cromatograma mostra que a proteína manteve o perfil de eluição (próximo a 48 mL) em relação à purificação inicialmente utilizada e que o reagente de Nycodenz® foi removido da amostra após a etapa de exclusão molecular (eluição do Nycodenz® indicada pela seta verde). O resultado da eletroforese em gel desnaturante mostrou que a proteína encontrava-se consideravelmente pura após as etapas empregadas e consequentemente, adequada para os próximos experimentos.

A nova metodologia mostrou-se muito satisfatória, rápida e simples de ser realizada em comparação à utilizada anteriormente, além disso, o novo processo de purificação proporcionou um rendimento de aproximadamente 6,5 mg por litro de cultura, consideravelmente superior ao previamente obtido.

Essa amostra foi submetida à análise por eletroforese em condições não desnaturantes e ensaios dicroísmo circular (dados não mostrados) exibindo as mesmas características da amostra purificada de acordo com o protocolo inicial.

5.1.7 Ensaios de anisotropia de fluorescência referente à interação entre monômeros da proteína SELA

Nesses ensaios buscou-se informações sobre o processo de oligomerização da proteína SELA, como por exemplo, a constante de dissociação e a presença de intermediários no processo de oligomerização. Devido aos ensaios de *crosslinking* mostrarem a presença de estruturas com organizações estruturais inferiores ao decâmero, acreditávamos que em concentrações muito baixas de proteína como por exemplo, 30 nM, obteríamos uma maior quantidade de estruturas no estado monomérico e, com a adição sucessiva de proteína, essas estruturas iriam se organizando formando o decâmero estruturado. Para verificar essa hipótese realizou-se o ensaio utilizando 30 nM de monômeros de proteína SELA marcados com fluoresceína e titulou-se sucessivamente proteína SELA não marcada na faixa de concentração monomérica de 50 a 11000 nM. Esse experimento foi realizado com a proteína SELA purificada de acordo com as duas metodologias descritas e ambas as proteínas purificadas apresentaram exatamente o mesmo perfil de titulação. O gráfico a seguir é referente à primeira metodologia de purificação.



Figura 44 - Curvas de anisotropia de fluorescência da titulação SELA-SELA. Cada curva refere-se à média de 3 experimentos independentes.

Como pode ser observado, os valores de anisotropia aumentam gradativamente de forma proporcional a adição de maiores concentrações de proteína SELA. Verifica-se também que não se consegue alcançar um plateau ao final da curva de titulação, o que a princípio, indicaria que a estrutura decamérica ainda não teria sido completamente formada.

Entretanto, analisando mais cuidadosamente os resultados obtidos, verificamos que a concentração de 10000 nM de monômeros (equivalente a 0,5 mg/mL) é uma concentração relativamente elevada para que a proteína ainda não se estabeleça na estrutura de decâmero, concentração essa (10000 nM) que provavelmente não é encontrada em ambientes celulares de *E. coli*. Essa questão será novamente abordada e elucidada nos próximos tópicos.

5.1.8 Ensaios de titulação da interação entre tRNAs marcados com a proteína SELA

A princípio, alguns tRNAs foram selecionados para os ensaios de ligação com a proteína SELA. O organismo *Escherichia coli* possui 4 isoformas do tRNA de serina e dentre elas, uma foi escolhida para os ensaios de ligação envolvendo anisotropia de fluorescência. A

116

isoforma escolhida (destacada em azul na figura abaixo) para o ensaio apresenta a trinca GCT na região do braço anticódon a qual é completamente diferente da trinca do tRNA^{sec} (TCA). Além disso, essa isoforma apresenta um número de bases próximo ao da molécula de tRNA^{sec} (tRNA^{sec} – 95 bases e tRNA^{ser} – 93 bases).

Para os mutantes, as substituições foram realizadas utilizando outra isoforma do tRNA de serina (destacada em vermelho na figura abaixo), que apresenta a trinca de bases GGA na região do braço do anticódon. As regiões substituídas incluem o pareamento das bases e a alça formada na extremidade do braço.



Figura 45 - Isoformas do tRNA de serina de *E. coli*. A isoforma utilizada para o ensaio de ligação com a proteína SELA apresenta-se destacada em azul. Já a utilizada para os ensaios de substituição de regiões do tRNA^{sec} está destacada em vermelho.

A escolha pelo tRNA^{sec} de *T. brucei* para os ensaios de ligação foi baseada na distância filogenética entre os organismos e na semelhança da trinca na região anticódon (ambos com TCA). Por fim, o DNA fita simples foi selecionado a fim de estabelecermos um comportamento de ligação inespecífica para o experimento.

As medidas de anisotropia de fluorescência da proteína SELA com o tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli* foram realizadas em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5, bem como nos tampões:

Tampão 1: 20 mM de fosfato de potássio pH 7.5, 100 mM de NaCl e 20 mM de MgCl₂;
Tampão 2: 20 mM de fosfato de potássio pH 7.5, 300 mM de NaCl e 50 mM de MgCl₂.

Paralelamente, realizou-se a titulação do tRNA^{sec} de *T. brucei* e do DNA fita simples marcados, pela adição de proteína SELA. Para esses dois ligantes somente foi testada a condição em tampão 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5.



Figura 46 - Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação da proteína SELA com ligantes de *E. coli* na presença de tampões contendo concentrações variadas de NaCl e MgCl₂. Em A, tRNA^{sec} de *E. coli*. Em B, tRNA^{ser} de *E. coli*.



Figura 47 - Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação SELA-ligantes. Em **A**, tRNA^{sec} de *T. brucei*. Em **B**, DNA fita simples (controle negativo).



Figura 48 - Sobreposição das curvas de anisotropia de fluorescência da ligação SELA com os ligantes tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli*, tRNA^{sec} de *T. brucei* e DNA fita simples. As curvas utilizadas são referentes aos experimentos realizados na condição de 20 mM de fosfato de potássio, pH 7.5.

Através da análise dos gráficos acima foi possível observar o comportamento de ligação inespecífica entre o DNA fita simples e a proteína SELA (Figura 47B), o qual serviu como controle para esse tipo de interação durante os experimentos.

Notou-se também que aparentemente, a presença de elevadas quantidades dos sais NaCl e MgCl₂ não interferiu na ligação dos tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli* com a proteína SELA, pois não observou-se deslocamentos consideráveis para a direita das curvas contendo sal em relação àquelas ausentes de sal. Entretanto, pode-se sugerir que o tRNA^{ser} de *E. coli* mostra menor tendência à ligação ou menor afinidade com a proteína SELA ou ainda um mecanismo de interação distinto, visto que o perfil de sua curva não se assemelha à do ligante específico ou à curva controle para ligação inespecífica.

As curvas referentes ao tRNA^{ser} de *E. coli* (vermelha) e tRNA^{sec} de *T. brucei* (verde) parecem convergir de modo similar em baixas concentrações; entretanto, a medida que as concentrações de SELA aumentam, a curva em verde (tRNA^{sec} de *T. brucei*) segue aumentando seu valor de anisotropia, o que pode sugerir uma possível interação adicional não-específica.

Uma possível explicação para esse fato estaria na diferença estrutural entre as moléculas e consequentemente em determinadas regiões do tRNA essenciais para o reconhecimento dos ligantes pela proteína SELA. Comparando primeiramente o tRNA^{sec} com o tRNA^{ser} de *E. coli*, nota-se que a base U14 presente no tRNA^{sec} é ocupada pela base A14 no tRNA^{ser} e mais ainda, o braço aceptor no tRNA^{sec} é constituído por 8 pb enquanto que no tRNA^{ser} apenas 7pb.

De acordo com estudos de Baron e colaboradores, 1990¹⁰² a substituição da base U14 por A14 diminui a atividade *in vivo* para decodificação do UGA₁₄₀ presente no RNA mensageiro da enzima FDHF de células contendo esse mutante. Já a diminuição do tamanho do braço aceptor do tRNA^{sec} de *E. coli* de 8pb para 7pb aboliu completamente essa atividade nas células. Esse estudo é compatível com os resultados acima obtidos nos quais a afinidade da proteína SELA pelo tRNA^{ser} é relativamente inferior comparada ao tRNA^{sec}, visto que o tRNA de serina testado apresenta a base A14 e 7pb na região do braço aceptor.

Esse mesmo estudo mostra que o aumento de nucleotídeos na região do braço variável não causa alteração na atividade das células, entretanto, a diminuição do número de ribonucleotídeos nesse braço promove uma moderada queda na atividade. Acreditamos que essa poderia ser é a situação principal que ocorre para o tRNA^{sec} de *T. brucei*, o qual é formado por 17 ribonucleotídeos na região do braço variável contra 22 do SELC de *E. coli*. Nossos resultados mostram uma pequena diminuição da afinidade de ligação do SELC de *T. brucei* pela proteína SELA em relação ao SELC de *E. coli*. Entretanto, essa diminuição é menos drástica do que para o tRNA de serina mostrando que a diminuição do tamanho do braço aceptor pode ser extremamente relevante.

Um estudo posterior poderia ser realizado para avaliar se o aumento do número de ribonucleotídeos no braço aceptor no tRNA^{sec} de *E. coli* interfere na sua ligação com a proteína SELA, visto que o SELC de *T. brucei* apresenta 9pb no braço aceptor, um pareamento a mais do que o SELC de *E. coli*.



Tabela 9 - Comparação do número de pareamentos de bases dos braços constituintes dos tRNAs: tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli* e tRNA^{sec} de *T. brucei*.

Região (braço)	tRNA ^{sec} de <i>E. coli</i> (pb)	tRNA ^{ser} de <i>E. coli</i> (pb)	tRNA ^{sec} de T. brucei (pb)
Aceptor	8	7	9
D	6	3	6
Anticódon	5	5	6
Variável	9	7	5
ΤψC	5	5	4

Figura 49 - Estrutura secundária dos tRNAs: tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli* e tRNA^{sec} de *T. brucei.* Em A, B, e C estão representadas as estruturas secundárias do tRNA^{sec} de *E. coli* (extraído e modificado de ³¹, tRNA^{ser} de *E. coli* (extraído do site: http://gtrnadb.ucsc.edu/Esch_coli_K12/Esch_coli_K12-structs.html, data: 13/11/2011) e tRNA^{sec} de *T. brucei* (extraído e modificado de ¹⁰³), respectivamente. Abaixo da figura, tabela apresentando o pareamento de bases de cada região desses tRNAs.

Com o objetivo de realizarmos um mapeamento prévio em relação às regiões do tRNA^{sec} de *E. coli* importantes para a ligação e formação do complexo SELA-tRNA^{sec}, mutantes dessa molécula foram sintetizados (itens 3.8 e 3.9, Metodologias) e submetidos aos ensaios de ligação com a proteína SELA através da técnica de anisotropia de fluorescência. A seguir, se encontra um esquema ilustrativo apresentando os mutantes sintetizados e testados, e em seguida as respectivas curvas de ligação anisotrópicas.



Figura 50 - Esquema ilustrando as substituições realizadas separadamente no tRNA^{sec} de *E. coli*. As regiões em cores foram substituídas por regiões equivalentes de uma isoforma do tRNA^{ser} de *E. coli*.



Figura 51 - Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação da proteína SELA com os diferentes mutantes do tRNA^{sec}. Os mutantes utilizados (A a F) estão indicados nas legendas dos gráficos em diferentes cores. As curvas em preto em todos os gráficos, representam a ligação da proteína SELA ao tRNA^{sec} (SELC) para comparação dos perfis de ligação com os respectivos mutantes.

124

De acordo com os resultados acima, as substituições das regiões do braço variável e do braço D do tRNA^{sec} de *E. coli* (Figura 51, painéis A e B) levaram a uma diminuição da afinidade desses mutantes pela proteína SELA, indicando que essas regiões podem apresentar alguma base ou pareamento de bases importante para a formação do complexo. Novamente, estudos de Baron e colaboradores, 1990¹⁰² também relatam que mudanças nessas regiões diminuem a atividade dos respectivos mutantes nas células hospedeiras, dentre elas a diminuição do braço variável e a substituição de U14 por A14 como citado anteriormente.

Nossos dados também mostram que as substituições realizadas nas regiões dos braços anticódon e T ψ C (Figura 51, painéis C e D) não apresentaram alteração em relação à afinidade de ligação dos respectivos mutantes para com a proteína, visto que os perfis da curva de ligação praticamente são sobrepostos ao do ligante específico. A surpresa desse ensaio reside no fato da não alteração do perfil de ligação em relação ao mutante da região do braço anticódon, visto que o esperado era que houvesse interação inespecífica desse ligante com a proteína indicando a importância dessa região para a ligação. Esse resultado sugere que a proteína SELA poderia não utilizar a região do selenocisteil-tRNA^{sec} em outras regiões dessa molécula. Em relação ao mutante do braço T ψ C, a não alteração do perfil de ligação pode ser atribuída a elevada quantidade de ribonucleotídeos invariantes ou semi-variantes entre os tRNAs nessa região que consequentemente, são comuns para o tRNA^{sec} e a região substituída no mutante do braço T ψ C:

GCAGGTTCGACTCCTGT - tRNA^{sec}

GGGGGTTCGAATCCCCC - região substituída no mutante

Os resultados das curvas de anisotropia de fluorescência em relação aos tRNAs que tiveram a região do braço aceptor substituída e a região do braço variável deletada (Figura 51, painéis E e F) apresentaram afinidade de ligação baixa ou desprezível pela proteína SELA, sendo seu comportamento semelhante ao apresentado pelo controle de ligação inespecífica (DNA fita simples). Consequentemente, a interação que esses dois mutantes apresentaram com a proteína SELA foi inespecífica em relação à ligação do ligante específico, o que sugere que essas duas regiões são relativamente importantes para a ligação com a proteína SELA interferindo no reconhecimento do ligante pela proteína. Em relação ao mutante com o braço aceptor substituído, aplica-se aqui o mesmo anteriormente exposto para o tRNA^{ser} de *E. coli*, ou seja, a diminuição do pareamento de bases de 8pb para 7pb na região aceptora pode ser o

principal motivo da considerável diminuição da afinidade de formação do complexo. Em relação ao mutante com completa deleção da região do braço variável, o resultado mostra o que já era esperado, essa região é relativamente importante para o reconhecimento da molécula SELC e sua interação com a proteína SELA.

Em síntese, podemos inferir que as regiões do braço aceptor, variável e D apresentamse essenciais para a perfeita interação do tRNA com a proteína SELA e provavelmente mais estudos focados nessas regiões podem ser realizados a fim de elucidar um panorama mais específico sobre a ligação em questão.

Esses experimentos foram realizados primeiramente com a proteína SELA purificada de acordo com a metodologia inicial e posteriormente, repetidos de acordo com a nova metodologia. Ambos os ensaios mostraram exatamente o mesmo perfil de titulação e os resultados apresentados neste tópico foram em relação à proteína purificada pela nova metodologia.

Tentativas de análises dos dados não permitiram a estimativa de valores de constantes de dissociação aparente (K_d) condizentes, ou seja, na maioria das vezes esses valores ficavam em torno de 25 μ M, considerados extremamente elevados para o sistema em estudo.

Na busca de um melhor entendimento para os resultados de anisotropia obtidos, o aluno de mestrado Vitor Hugo Balasco Serrão, através da metodologia de *negative staining* realizou medidas da proteína SELA sem ligante na concentração de 0,5 mg/mL de SELA, em colaboração com os Drs. Rodrigo Villares Portugal e Jéferson Bettini no LNNano, Campinas/SP.





Figura 52 - Imagens de negative staining da proteína SELA na concentração de 0,5 mg/mL ou 10 μM de monômeros. Imagens de transmissão obtidas por contraste negativo utilizando 2% de acetato de uranila. Em A, estruturas decaméricas associadas lado a lado. Em B, estruturas decaméricas associadas em nanotubos ou pilhas.

126

De acordo com os dados de anisotropia de fluorescência e as imagens de microscopia eletrônica utilizando a técnica de *negative staining*, verifica-se que a na concentração de 0,5 mg/mL (10 µM de monômero) a proteína SELA já se encontra decamérica e mais ainda, formando estruturas supramoleculares, por associação lateral e também empilhamentos, resultando na montagem de nanotubos. A partir desses dados interpretamos as isotermas de ligação SELA-SELA medidas por anisotropia de fluorescência como resultado da formação dessas estruturas supramoleculares a partir de decâmeros da proteína SELA. Dessa forma, podemos sugerir que a concentração de formação do decâmero completo residiria na faixa picomolar, visto que em concentrações nanomolares de monômeros já são observadas estruturas supramoleculares. Deste modo, entendemos que a constante de dissociação dos decâmeros na presente condição de ensaio se encontraria em faixa sub-nanomolar.

O mesmo fato pode explicar a dificuldade na determinação das constantes de dissociação dos complexos ligantes-SELA. Uma hipótese seria a de que a molécula de tRNA se ligaria a uma molécula de SELA decamérica livre, mas como ainda podem existir outros sítios livres nessa molécula proteica, os mesmos estando vazios, poderiam interagir lateralmente com outras moléculas de SELA que não estão associadas a ligantes ou parcialmente associadas. Se essas últimas não estiverem associadas a ligantes, outras com as mesmas características poderiam se associar abaixo ou acima desta, formando empilhamento e estruturas supramoleculares e assim, os valores de anisotropia continuariam a aumentar sem o alcance de um plateau definido. Esse fato pode ser claramente observado nas curvas de titulação realizadas tanto com os experimentos envolvendo a titulação proteína-proteína quanto nos ensaios de titulação com ligantes específicos, inespecíficos e mutantes.

Consequentemente, os resultados das titulações acima são válidos devido ao fato da proteína SELA estar na mesma condição para todos os tRNAs testados, ou seja a proteína apresenta-se com a mesma característica em todas as titulações. Entretanto, neste caso, as curvas de titulação podem ser utilizadas somente para comparação qualitativa entre os ligantes e quanto a esse aspecto, os ensaios de anisotropia de fluorescência mostraram-se altamente eficientes e reprodutíveis.

Contudo, analisando o ambiente celular presume-se que indubitavelmente a proteína SELA mesmo estando em estados oligoméricos superiores ao decâmero, apresente uma maior afinidade pelo ligante específico. Portanto, a presença de quantidades do ligante tRNA^{sec} suficientes para saturação dos sítios da proteína promoveria a dissociação da proteína SELA da forma estrutural "empilhada" (desfazendo as pilhas) devido à preferência da mesma em interagir com o ligante específico.

Frente a isso, estudos de anisotropia de fluorescência foram realizados para determinação da estequiometria de ligação do complexo SELA-SELC. Devido à necessidade de elevadas concentrações de proteína SELA, os ensaios estequiométricos somente foram efetuados com a proteína SELA purificada com a utilização do reagente Nycodenz® em razão do maior rendimento obtido por essa metodologia.

Dessa forma, utilizou-se 40 μ M de tRNA^{sec} dos quais 10 nM estavam marcados com fluoresceína e titulou-se proteína SELA na concentração monomérica de 0,1 μ M a 120 μ M através de adições sucessivas em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7.5, mantendo-se as condições de 25°C e incubação por 3 minutos.



Figura 53 - Curvas de titulação estequiométrica do complexo SELA-tRNA^{sec}. As linhas em vermelho indicam a razão estequiométrica de 1:1 (mol:mol, moles de monômeros de SELA : moles de tRNA^{sec}). Em A, dados brutos de anisotropia de fluorescência. Em B, dados normalizados para fração de ligação. Os símbolos ○●▼ representam medidas individuais de experimentos independentes.

Como observado na Figura 53 acima, as linhas vermelhas dos gráficos indicam os pontos de saturação das curvas mostrando surpreendentemente uma proporção de ligação de **1** monômero de SELA para **1** molécula de tRNA^{sec} (SELC) (1 mol de monômeros de SELA / 1 mol de tRNA^{sec}), perfazendo uma estequiometria de 1:1 ou de 1 decâmero para 10 tRNAs. Esse dado contraria os resultados previamente sugeridos de: um complexo 2 monômeros SELA : 1 SELC (10 SELA : 5 SELC), a partir da técnica de permeação em gel realizada por Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁴ e microscopia eletrônica utilizada por Engelhardt e colaboradores, 1992⁶⁰ para o estudo do complexo.

Com o intuito de verificarmos novamente o resultado estequiométrico obtido, realizouse a titulação inversa do sistema, ou seja, titulou-se proteína SELA marcada com fluoresceína através de adições sucessivas de tRNA^{sec} (não marcado) em uma faixa de concentração de 500 nM a 15000 nM de tRNA. O experimento foi realizado em solução tampão de 20 mM de fosfato de potássio, pH7.5 contendo 10 μ M de monômeros da proteína dos quais 30 nM estavam marcados.



Figura 54 - Curvas de titulação estequiométrica inversa do complexo SELA- tRNA^{sec}. A linha em vermelho indica a razão estequiométrica de 1:1. Em A, dados brutos. Em B, dados normalizados para fração de ligação (moles de monômeros de SELA : moles de tRNA^{sec}).

Novamente, as linhas em vermelho dos gráficos da Figura 54 apontam o ponto de saturação das curvas, podendo verificar que a partir desses pontos os valores de anisotropia de fluorescência se mantém estáveis ou constantes. Esse fato indica que na concentração de 10 μ M de SELC as moléculas de SELA presentes encontram-se com todos os seus sítios ocupados; como foi utilizado 10 μ M de monômeros de SELA, mais uma vez, é verificada a relação 1 monômero de SELA para 1 molécula de tRNA^{sec}, indicando que realmente há a possibilidade de os resultados obtidos em 1991 e 1992 estarem equivocados em relação a estequiometria de ligação do sistema SELA-SELC de *E. coli*.

Como nesse ensaio os valores de anisotropia de fluorescência iniciam-se altos e em seguida decrescem e estabilizam-se, acredita-se que no início do processo a proteína SELA encontra-se decamérica e também em estruturas supramoleculares. A partir da adição do ligante, a molécula de SELA decamérica se desprende das pilhas e devido a maior afinidade se liga ao tRNA^{sec}. Dessa forma, os valores de anisotropia de fluorescência diminuem, pois a proteína está deixando um estado de oligomerização supramolecular (nanotubos ou pilhas) dirigindo-se à formação do complexo SELA-tRNA^{sec} o qual é relativamente menor e por sua vez, estabilizado quando os sítios da proteína foram completamente saturados.

Esse fato foi recentemente verificado através da técnica de microscopia eletrônica utilizando *negative staining* realizada pelo aluno de mestrado Vitor Hugo Balasco Serrão incubando-se a proteína SELA com concentrações saturantes do ligante tRNA^{sec}.



Figura 55 - Imagens de negative staining da proteína SELA na concentração de 10 μM de monômeros incubada com 12 μM de tRNA^{sec}. Imagens de transmissão obtidas por contraste negativo utilizando 2% de acetato de uranila.

Analisando a imagem acima, observa-se que respeitando a proximidade da concentração estequiométrica obtida pela técnica de anisotropia de fluorescência (1 monômero de SELA : 1 molécula de tRNA^{sec}) não foi mais verificada a presença de estruturas supramoleculares entre decâmeros da proteína SELA corroborando os dados das curvas estequiométricas realizadas por anisotropia de fluorescência.

5.1.9 Estudos de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O experimento de DLS foi utilizado para verificar as populações presentes em amostras de proteína SELA relacionando-as com alguns pontos da curva de anisotropia de fluorescência para confirmarmos a presença de formas estruturadas maiores que o decâmero. A menor concentração de proteína SELA detectada pelo equipamento com considerada precisão e confiabilidade foi de 1000 nM de monômero estando esse valor no início da curva de titulação proteína-proteína (Figura 44). A partir daí concentrações crescentes foram medidas e algumas são apresentadas a seguir.



Figura 56 - Análise utilizando a técnica de DLS de diferentes concentrações da proteína SELA. Em A, B e C, concentrações de monômeros de SELA equivalentes a 1 μM, 5 μM e 12 μM, respectivamente.

Como pode ser observado nos histogramas, logo de início, na concentração de 1 μ M de monômeros, pode-se verificar a presença de estruturas que apresentam raio máximo de aproximadamente 10 nanômetros o qual corresponde à estrutura decamérica livre da proteína SELA. Entretanto, também é verificada uma organização estrutural na região superior ao raio de 100 nanômetros, possivelmente correspondente a estruturas proteicas "empilhadas". As medidas utilizando concentrações crescentes da proteína SELA mostram um aumento na intensidade do pico relacionado às estruturas em empilhamento à medida que a quantidade da macromolécula presente aumenta.

Experimentos envolvendo a ligação da proteína ao ligante foram realizados por essa técnica a fim de observar o desaparecimento ou diminuição dos estados organizacionais supramoleculares (empilhamentos) à medida que era utilizada uma concentração saturante do ligante. Os gráficos a seguir mostram os resultados obtidos para as medidas realizadas separadamente com as amostras: 5 μ M de SELA e, 5 μ M de SELA incubada com 5 μ M de tRNA.



A) 5 µM de SELA:





Figura 57 - Análise utilizando a técnica de DLS de 5 μM de proteína SELA na ausência e na presença do ligante tRNA^{sec}. Em A, 5 μM de SELA. Em B, 5 μM de proteína SELA incubada com 5 μM de tRNA^{sec}.

O resultado obtido na análise de 5 μ M de proteína SELA mostra mais uma vez a presença majoritária de estruturas decaméricas livres dessa proteína e frações menores correspondentes a estados de organização estrutural supramolecular de raios maiores. Entretanto, quando a proteína foi incubada em concentrações saturantes do ligante (**B**), houve diminuição na fração dos picos relacionados às estruturas de raios maiores a 100 nm, não mais sendo detectáveis e sugerindo uma população homogênea em solução, o complexo SELA-tRNA^{sec}.

. Embora aparentemente os resultados obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico tendam a corroborar os dados de anisotropia de fluorescência e microscopia eletrônica (*negative staining*) indicando a constante associação da proteína SELA em estruturas superiores ao decâmero (Figura 56) bem como a dissociação dessas estruturas para ligação ao tRNA^{sec} (Figura 57), não podemos confirmar tal argumento. A dúvida imposta pela metodologia em questão está relacionada à distinção do conteúdo da amostra, ou seja, mesmo a amostra protéica sendo criteriosamente centrifugada antes das medidas experimentais, não é possível afirmar se o pico de raio em torno de 100 nm corresponde às estruturas supramoleculares da proteína SELA ou trata-se de algum agregado protéico que permaneceu em solução.

5.1.10 Outros estudos desenvolvidos

5.1.10.1 Estudos do gene sepsecs de Trypanosoma brucei

Paralelamente ao desenvolvimento do trabalho de pesquisa envolvendo a proteína SELA de *E. coli*, algumas tentativas de se estudar o gene e a proteína SEPSECS de *T. brucei* foram realizadas. Os resultados apresentados a seguir serão somente informativos e, portanto, não serão minimamente detalhados devido ao fato do estudo do gene e caracterização da proteína não serem o foco principal do trabalho.

A partir do cultivo das formas procíclicas e da extração do DNA genômico desse organismo, o gene codificante para a proteína SEPSECS foi amplificado (1638pb), inserido no vetor de clonagem pTZ57R/T (Fermentas) e as colônias transformantes de *E. coli* DH5α foram selecionadas.



Figura 58 - Amplificação do gene sepsecs de Trypanosoma brucei a partir de DNA genômico e confirmação dos clones obtidos. Em A, 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene sepsecs de T. brucei (1638pb); 3) controle negativo da reação. Em B, reação de PCR para amplificação do gene sepsecs a partir dos DNAs plasmidiais dos clones obtidos em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2), 3), 4) e 5) reação de PCR dos clones 1, 2, 3 e 4 a partir dos DNAs plasmidiais; 6) controle negativo da reação.

Entretanto, a análise do sequenciamento dos clones revelou várias mutações e espaços (*gaps*) nas sequências obtidas. Consequentemente, o Prof. Dr. Dieter Söll do Departamento de Química, Bioquímica e Biofísica da Universidade de Yale, possuindo esse gene com a sequência otimizada para expressão em *E. coli* e inserido em vetor de expressão pET28a(+), gentilmente cedeu essa construção para nosso laboratório, a qual foi inserida em células de *E. coli* BL21(DE3) para ensaios de expressão.

Vários ensaios de expressão em diferentes condições de temperatura e concentração de IPTG foram realizados, porém não foram observadas consideráveis diferenças entre os testes em relação à quantidade de proteína recombinante produzida. Algumas condições são apresentadas a seguir.



Figura 59 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando a expressão do gene sepsecs em E. coli BL21(DE3) utilizando 0,5 e 0,1 mM de IPTG em meio LB. Em A, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) recombinante sem indução, a 37°C; 3) recombinante induzido com 0,5 mM de IPTG, a 15°C após 20 horas de indução. Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) recombinante sem indução, a 37°C; 3) recombinante induzido com 0,1 mM de IPTG, a 15°C após 20 horas de indução. As setas em verde mostram a proteína de interesse.



Figura 60 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando a expressão do gene sepsecs em E. coli BL21(DE3) utilizando 0,5 e 0,1 mM de IPTG em meio LB contendo 1 M de sorbitol. Em A, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) recombinante sem indução, a 37°C; 3) recombinante induzido com 0,5 mM de IPTG, a 23°C após 20 horas de indução; Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) recombinante sem indução, a 37°C; 3) recombinante induzido com 0,1 mM de IPTG, a 23°C após 20 horas de indução. As setas em verde indicam a proteína de interesse.

A tentativa de expressar a proteína em meio de cultura contendo sorbitol baseia-se no fato de que proteínas recombinantes expressas abundantemente em bactérias podem apresentar tendência a um enovelamento incorreto e consequentemente a se acumularem em agregados ou corpos de inclusão; e uma estratégia para melhorar o nível de expressão dessas proteínas em forma solúvel e nativa é o aumento na concentração celular de osmólitos e

136

proteínas chaperonas. Isso pode ser realizado pelo crescimento das células bacterianas em presença de altas concentrações salinas e sorbitol, bem como a exposição dessas células a passos de choque térmico para indução das proteínas chaperonas que podem tanto dirigir o processo de enovelamento proteico quanto evitar a agregação em alguns casos¹⁰⁴.

Para todos os casos de indução testados inclusive os envolvendo passos de choque térmico, a proteína era expressa abundantemente, porém na forma insolúvel. Alguns tampões contendo piridoxal 5´-fosfato e diferentes processos de lise celular foram testados e, a seguir, é apresentada uma tabela com os tampões utilizados e a análise eletroforética obtida:

 Tabela 10 – Tampões testados durante a lise celular bacteriana na tentativa de solubilização da proteína SEPSECS de T. brucei.

Tampões testados			
Tampão 1	50 mM Hepes, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 2 mM		
	DTT, 10 µM piridoxal 5´-fosfato.		
Tampão 2	50 mM Hepes, pH 8.0, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 μ M		
	piridoxal 5´-fosfato.		
Tampão 3	50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT,10 µM		
	piridoxal 5'-fosfato.		
Tampão 4	20 mM fosfato de Na ⁺ , pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 10 μ M		
	piridoxal 5'-fosfato.		

Para todas as diferentes induções realizadas, o perfil obtido após a lise celular foi o mesmo para os quatro tampões testados e um desses ensaios é apresentado abaixo:



Figura 61 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando a lise bacteriana referente à indução da proteína SEPSECS em meio LB com 0,5 mM de IPTG, a 15°C. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2, 4, 6 e 8) fração insolúvel com lise em tampão 1, 2, 3 e 4, respectivamente; 3, 5, 7 e 9) fração solúvel com lise em tampão 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Como em todos os tampões a proteína SEPSECS mostrou-se insolúvel, optou-se pelo emprego de agente desnaturante (uréia) como tentativa de melhorar a solubilidade proteica. Várias concentrações de uréia foram testadas, entretanto, somente na concentração de 8 M do agente desnaturante a proteína ficou parcialmente solúvel.



Figura 62 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% ilustrando o tratamento da fração insolúvel com 8 M de uréia. 1) padrão de massa molecular (kDa); 2 e 3) fração solúvel e insolúvel após lise celular, respectivamente; 4 e 5) fração solúvel e insolúvel após a primeira lavagem com água milli-Q, respectivamente. 6) fração solúvel após a segunda lavagem com água milli-Q; 7) fração insolúvel após tratamento com 8 M de uréia; 8) fração solúvel após tratamento com 8 M de uréia.

O tratamento com 8 M de uréia conseguiu solubilizar uma parte considerável da proteína SEPSECS e em seguida, essa fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade e eluída com gradiente de imidazol.



Figura 63 - Eletroforese em gel SDS-PAGE 15% apresentando a purificação da proteína SEPSECS em resina de afinidade após tratamento com 8 M de uréia. Em A, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2 e 3) fração que não se ligou a resina; 4, 5, 6, 7, 8, 9 eluição com 10, 25, 50, 100, 150, 200 mM de imidazol; Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2, 3 e 4 eluição com 300, 400 e 500 mM de imidazol.

As frações correspondentes as canaletas de 6 a 9 (\mathbf{A}) e 2 a 4 (\mathbf{B}) foram reunidas e dialisadas em membrana de diálise de 10 kDa. O processo de diálise para reenovelamento da proteína foi realizado de forma gradativa, no qual o agente desnaturante era retirado aos poucos do conteúdo proteico. Entretanto, essa metodologia não foi bem sucedida devido à presença de pequenos grânulos logo nos primeiros passos de troca de tampão de diálise e a ausência de proteína solúvel no final do experimento.

Outras possibilidades foram testadas na tentativa de solubilizar e purificar a proteína SEPSECS para futuros ensaios cristalográficos, porém todas as abordagens realizadas não foram satisfatórias e optou-se então, pelo não prosseguimento no estudo dessa proteína.

5.2 Discussão dos Resultados

O gene *selC*, codificante para o tRNA^{sec}, foi identificado como um dos quatro genes cujos produtos são necessários para a formação de selenoproteínas em *E. coli*⁵¹. Na via de síntese e incorporação do aminoácido selenocisteína, a molécula de tRNA^{sec} é aminoacilada com L-serina pela enzima Seril-tRNA sintetase⁵² que então, serve de substrato para a Selenocisteína sintase (SELA), uma enzima que contém piridoxal 5´-fosfato ligado covalentemente a sua estrutura. Através da desidratação do resíduo de serina e subsequente adição de selênio reduzido, a enzima SELA cataliza a conversão do seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec 105}.

Tanto a sequência de tRNA^{sec} como seu padrão de bases são únicos^{29,52}. Essa molécula apresenta variações em algumas posições de sua sequência até então consideradas invariantes nas estruturas de tRNAs de elongação¹⁰⁶. Essas variações são: a presença de 8 pb na região do braço aceptor, um resíduo de purina na posição 8, um par purina-pirimidina nas posições 11/24, pirimidinas nas posições 14 e 15, e um anticódon (UCA) correspondente ao códon de terminação UGA¹⁰⁷. Estas características estruturais podem estar envolvidas em funções de tRNA^{sec} como por exemplo: interação com a enzima biosintética Selenocisteína sintase, interação com o fator de tradução SELB e exclusão ou impedimento da interação com EF-Tu¹⁰².

Em nosso estudo, diversas técnicas foram empregadas para uma análise mais detalhada da interação entre a proteína SELA com o ligante tRNA^{sec}, com o objetivo principal

de mapear as regiões do tRNA^{sec} importantes para a formação do complexo em questão, bem como, verificar a estequiometria de ligação por meio de uma técnica confiável e reprodutível.

A técnica de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) tem a capacidade de determinar parâmetros termodinâmicos de interações bioquímicas medindo diretamente a energia liberada ou absorvida em uma reação. A tentativa de aplicação dessa metodologia para o estudo das energias envolvidas na interação SELA-tRNA^{sec} foi realizada por um longo período de tempo tanto no Grupo de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) como no Laboratório do Prof. Dr. Marcelo Matos Santoro da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Entretanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios e inúmeras limitações foram encontradas em relação ao preparo das amostras a serem testadas.

O emprego da técnica de espectroscopia de fluorescênca intrínseca também não proporcionou resultados aplicáveis ou conclusivos para o sistema estudado devido à falta de sensibilidade do ensaio em baixas concentrações de amostra. Além disso, fatores relacionados ao filtro interno (absorção de luz pelo tRNA no comprimento de onda de excitação) poderiam ser empecilhos para uma análise mais apurada e precisa dos dados obtidos. Consequentemente buscou-se técnicas mais sensíveis e nas quais o fluoróforo não apresentasse comprimentos de onda de absorção ou emissão na faixa dos aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina).

Como ainda não tínhamos verificado precisamente a interação da proteína SELA com o tRNAsec, um ensaio prévio foi realizado empregando a metodologia de fluorescência extrínseca monitorando a emissão do reagente brometo de etídio. Esse ensaio possibilitou evidenciar a ocorrência de interação entre a proteína SELA e o ligante específico, uma vez que a variação no sinal de emissão do brometo de etídio foi detectada. Essa variação visualizada pela diminuição das intensidades absolutas de emissão do reagente brometo de etídio pode ser atribuída ao fato da ligação proteína-tRNA deslocar moléculas de brometo de etídio anteriormente ligadas ao tRNA na região de interação com a macromolécula. Dessa forma, o aumento do número de moléculas de brometo de etídio livres em solução levaria a diminuição dos valores de intensidade de emissão, visto que tais moléculas livres não estariam fluorescendo. O plateau final que a intensidade de emissão alcança seria explicado pelas moléculas de brometo de etídio ligadas em outros sítios do tRNA já complexado e que não participam da interação. Para a confirmação da interação do complexo em estudo, uma elevada quantidade de tRNA foi utilizada (0,2 µM). Entretanto, para alcançar os objetivos pretendidos (constante de dissociação, a princípio) concentrações menores de tRNA deveriam ser empregadas. Infelizmente, concentrações inferiores de tRNA não proporcionaram sensibilidade suficiente e sinal resposta adequado por parte do equipamento possivelmente devido ao fato da reduzida quantidade de moléculas de tRNA utilizada no ensaio e consequentemente, poucas moléculas de brometo de etídio com capacidade para fluorescência.

Os ensaios de *crosslinking* químico mostraram-se bastante interessantes, pois permitiram visualizar formas estruturais da proteína SELA inferiores a sua organização decamérica, sugerindo que em solução haveriam estados oligoméricos inferiores ao decâmero e que possivelmente esses estados poderiam estar em equilíbrio com uma pequena fração de moléculas SELA decaméricas.

O *crosslinking* químico entre a proteína SELA e o ligante tRNA^{sec} também apresentou-se satisfatório a medida que foi possível a verificação de uma banda de massa molecular bastante elevada no gel SDS-PAGE 10% estando essa ausente no gel onde somente *crosslinking* proteico foi efetuado. Outra característica é que essa banda ficou proporcionalmente evidente à medida que se elevam as concentrações de tRNA na reação.

Embora os ensaios de fluorescência extrínseca utilizando brometo de etídio e os ensaios de *crosslinking* químico confirmaram a interação proteína-ligante, essas metodologias não foram capazes de fornecer os parâmetros de ligação de interesse do sistema em estudo.

Consequentemente optou-se pelo emprego da técnica de anisotropia de fluorescência como mais uma tentativa para elucidar as questões de interesse. Para isso foi necessária a marcação da proteína SELA e dos ligantes a serem testados com fluoróforos comerciais consideravelmente mais sensíveis quando em baixas concentrações e, com comprimentos de onda de absorção e emissão relativamente distantes dos relacionados aos componentes do sistema. O reagente fluoresceína foi selecionado para marcação tanto da proteína SELA em regiões de aminas primárias como para marcação da posição 5⁻ dos tRNAs ligantes.

Entretanto, como a demanda de proteína SELA pura para a realização desses ensaios seria relativamente elevada e visto que o protocolo de purificação inicial era consideravelmente demorado e agressivo para a proteína em estudo, um novo protocolo de purificação foi estabelecido no qual o tempo de purificação foi reduzido pela metade e o rendimento do produto final foi consideravelmente aumentado (alcançando 6,5 mg por litro de cultura). Essa nova metodologia de purificação proporcionou uma proteína SELA pura, estável e com as características biofísicas e bioquímicas idênticas à purificada pela metodologia inicial.

Os ensaios de anisotropia de fluorescência realizados com o objetivo de verificar o processo de oligomerização da proteína SELA não apresentaram uma região de plateau final a

qual indicaria a completa formação da estrutura decamérica. Contrariamente ao esperado, os valores de anisotropia de fluorescência tendiam a aumentar indefinidamente. Frente a esse fato curioso, imagens de microscopia eletrônica da proteína SELA foram registradas empregando-se a metodologia de *negative staining*. As imagens obtidas revelaram que a proteína SELA decamerizada é capaz de se organizar em estruturas supramoleculares em forma de pilhas ou aglomerados laterais, explicando os acontecimentos constatados nos experimentos de anisotropia de fluorescência. Esse fato também foi observado nos ensaios de espalhamento de luz dinâmico (DLS), nos quais mesmo em concentrações relativamente baixas (1000 nM de monômeros), a proteína SELA já apresenta estruturas com elevado estado organizacional (raio máximo da ordem de 100 nm). Essas estruturas não se apresentam na forma de precipitados ou agregados visíveis e sim, solúveis, visto que as amostras de proteína foram criteriosamente centrifugadas antes da execução de cada experimento.

O fato da proteína SELA se organizar em estruturas superiores ao estado decamérico mesmo em concentrações baixas como verificado pela técnica de DLS, torna improvável a determinação das constantes de dissociação do decâmero SELA por intermédio da técnica de anisotropia de fluorescência. Consequentemente pode-se inferir que o valor da constante de dissociação para o decâmero SELA estaria na ordem de concentrações picomolares, as quais não são alcançáveis e detectáveis por essa metodologia nas condições empregadas.

Os ensaios de anisotropia de fluorescência para análise da interação da proteína SELA com diferentes tRNAs apresentou resultados interessantes e curiosos. Primeiramente, notou-se que a variação da concentração salina no tampão não afetou o modo de interação da proteína com os ligantes tRNA^{sec} e tRNA^{ser} de *E. coli*. Entretanto, ambos interagem com a proteína SELA por meio de mecanismos diferentes, sendo o tRNA^{ser} o que apresenta menor afinidade devido provavelmente as diferenças na composição de bases e na organização estrutural. Como já mencionado na seção de resultados, estudos de monitoramento *in vivo*, realizados por Baron e colaboradores, 1990¹⁰² demonstraram que a diminuição do braço aceptor de 8pb (tRNA^{sec}) para 7pb (tRNA^{ser}) é um fator fundamental para a atividade das células testadas e por sua vez, a redução do braço variável proporciona diminuição da atividade das selenoproteínas FDH_H e FDH_N. De acordo com nossos estudos, a manutenção do pareamento de bases do braço aceptor mostra-se essencial para a adequada interação do tRNA com a proteína SELA e a diminuição da extensão do braço variável (tRNA^{sec} de *T. brucei*) realmente promove uma diminuição na afinidade de ligação em relação ao tRNA^{sec}

A interpretação do perfil obtido na interação SELA-tRNA^{ser} de *E. coli* pode sugerir um mecanismo de interação para esse tRNA baseado na afinidade de ligação com a proteína

SELA. Como visualizado, a proteína SELA apresenta-se organizada em uma fração decamérica livre e em uma fração "empilhada". Consequentemente, podemos sugerir que o tRNA de serina (curva vermelha – Figura 48) interaja apenas com as moléculas de SELA decaméricas livres (que não estão organizadas em pilhas), não apresentado afinidade suficiente para fazer com que um decâmero SELA se desligue da pilha. Esse fato faz com que o valor de anisotropia de fluorescência tenda a se estabilizar mais precocemente.

Em relação aos tRNAs mutantes, as substituições nas regiões do braço variável e D do tRNA^{sec} por regiões correspondentes do tRNA^{ser} promoveram uma diminuição da afinidade da proteína SELA por esses tRNAs indicando a presença de estruturas ou pareamentos de bases importantes dessas regiões. De acordo com estudos de Baron e colaboradores, 1990¹⁰² a manutenção da base U14 no braço D do tRNA^{sec}, bem como o pareamento de 9pb do braço variável são considerados importantes para a eficiência da via e consequentemente nossos estudos corroboram essa afirmação, visto que essas duas alterações levaram a diminuição da afinidade de ligação.

Mutantes dos braços anticódon e T ψ C não apresentaram qualquer diferença no perfil de ligação em relação ao tRNA^{sec} específico, indicando que a composição e os pareamentos dessas regiões não são fundamentais para a ligação do tRNA à proteína SELA.

A diferença primordial foi observada em mutantes do braço aceptor e deleção do braço variável, visto que para esses tRNAs a interação tRNA-SELA apresentou perfil de ligação idêntico ao ligante inespecífico (DNA fita simples). Consequentemente, esse resultado indica que alterações nessas regiões são grandemenete prejudiciais à formação do complexo SELA-tRNA. No mutante do braço aceptor, a diminuição da afinidade pode ser atribuída à diminuição do pareamento de 8pb para 7pb nessa região e em relação ao mutante contendo deleção do braço variável essa drástica diminuição da atividade mostra que essa região pode ser importante tanto para a ligação a proteína como para a manutenção da estrutura tridimensional da molécula de tRNA.

Entretanto, devido a proteína SELA apresentar-se em estruturas supramoleculares, os resultados de interação da proteína com os tRNAs testados não permitem a extrapolação de valores de constantes de dissociação para a ligação proteína-proteína ou proteína-ligante, logo, tais curvas podem ser utilizadas somente para uma análise qualitativa das interações testadas. Essa análise qualitativa é passível de ser realizada devido a proteína SELA apresentar-se nas mesmas condições estruturais (livre e empilhada) em todos os ensaios com tRNAs.
Através dessas análises, foi possível estabelecer um prévio mapeamento na molécula de tRNA de regiões importantes para a interação e formação do complexo SELA-SELC, permitindo que haja um maior direcionamento das mutações em regiões específicas da molécula de tRNA^{sec}.

Os resultados dos ensaios de titulação estequiométrica empregando a técnica de anisotropia de fluorescência revelaram-se surpreendentes, pois contradizem os dados publicados na literatura no início da década de 90. Segundo Forchhammer e colaboradores, 1991⁵⁴ e Engelhardt e colaboradores, 1992⁶⁰ a estequiometria de ligação do complexo SELA-tRNA^{sec} é dada por uma molécula de tRNA ligada a cada duas subunidades de 50 kDa cada da enzima, ou seja, **1** molécula de tRNA por **dímero** de SELA (1 decâmero para 5 tRNAs). Nossos dados utilizando a técnica de anisotropia de fluorescência tanto de titulação direta como inversa, apontam para a ligação de **1** molécula de tRNA por cada **monômero** de SELA perfazendo uma estequiometria de 1 decâmero para 10 tRNAs. Este fato é suplementado pelas imagens obtidas pela microscopia eletrônica utilizando a técnica de 1 monômero SELA para 1 molécula de tRNA não foi detectada a presença de estruturas empilhadas de proteína SELA, indicando que os resultados anisotrópicos revelam o comportamento real desse sistema.

Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas do Trabalho

Esse trabalho possibilitou a elucidação de novos conhecimentos sobre a via de inserção do aminoácido selenocisteína em *E. coli*, em especial da proteína Selenocisteína sintase (SELA) e de seu ligante específico tRNA^{sec}. Os resultados apresentados referentes à caracterização da proteína SELA relataram a utilização de diversas técnicas biofísicas e bioquímicas as quais proporcionaram informações mais aprofundadas do comportamento dessa macromolécula em solução. Tais técnicas empregadas permitiram confirmar a presença do homodecâmero SELA (600 kDa) em solução, determinar o ponto isoelétrico experimental (6.03), estimar o conteúdo de estruturas secundárias da proteína (α -hélices: cerca de 74%) e definir através do processo de desnaturação térmica a temperatura na qual as estruturas secundárias da macromolécula ainda são preservadas. Além disso, ensaios de *crosslinking* químico da proteína SELA inferiores ao decâmero, sugerindo que em solução há a ocorrência de um estado de equilíbrio com outros estados oligoméricos.

Consequentemente, devido à demanda elevada de proteína para os ensaios, um novo protocolo de purificação da proteína SELA foi desenvolvido sendo este mais eficiente e rápido em relação ao utilizado anteriormente. Para análise da formação do complexo SELA-SELC em solução, algumas abordagens foram realizadas com a finalidade inicial de confirmar essa interação e determinar parâmetros da ligação da proteína SELA com o tRNA^{sec}. A técnica de espectroscopia de fluorescência extrínseca utilizando o reagente brometo de etídio como fluoróforo permitiu a confirmação da interação entre esses dois componentes da via de incorporação de selenocisteína *in vitro* e através do *crosslinking* químico entre a proteína SELA e o ligante tRNA^{sec} foi possível verificar novamente a interação de ambos.

A utilização da metodologia de anisotropia de fluorescência, juntamente com a técnica de microscopia eletrônica e DLS permitiram a obtenção de informações extremamente importantes e inéditas em relação ao comportamento da proteína SELA em solução na ausência e na presença do ligante SELC. Essas análises mostraram que a proteína SELA se associa em estruturas supramoleculares (nanotubos ou pilhas) e que tais estruturas são desfeitas na presença de concentrações equimolares de tRNA^{sec}.

A técnica de anisotropia de fluorescência permitiu também a realização de um mapeamento das regiões do tRNA^{sec} importantes para a interação e reconhecimento dessa molécula pela proteína SELA assim como, a determinação da estequiometria de ligação SELA-tRNA^{sec} em solução como sendo **1 : 10** (1 molécula de SELA decamérica : 10 moléculas de tRNA^{sec}) e não 1 : 5 (1 decâmero para 5 tRNAs) como relatado na literatura.

Devido ao forte impacto do resultado estequiométrico SELA-tRNA^{sec}, análises utilizando a técnica de crio-microscopia eletrônica serão realizadas para corroborarem os dados de anisotropia de fluorescência obtidos.

Em paralelo, estudos mais direcionados envolvendo mutações pontuais ou de porções menores na molécula do tRNA^{sec} poderiam agora ser efetuados nas regiões que se apresentaram mais importantes para a interação com a macromolécula, como apresentado nesse trabalho. Dessa forma, poderia-se obter um mapeamento mais específico e detalhado das bases importantes para a ligação em questão.

Além disso, estudos de ligação do complexo SELA-tRNA^{sec} com outras proteínas da via de inserção de selenocisteína poderiam ampliar o conhecimento sobre os mecanismos de ligação e fornecer maiores informações sobre essas interações permitindo avançarmos cada vez mais no conhecimento sobre a forma como essas estruturas se complexam e exercem suas funções.

146

REFERÊNCIAS

1 WESSJOHANN, L. A.; SCHNEIDER, A.; ABBAS, M.; BRANDT, W. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 997-1006, 2007.

2 MOXON, A. L;. RHIAN, M. Selenium poisoning. Physiological Reviews, v. 23, n. 4, p. 305-337, 1943.

3 STADTMAN, T. C. Selenoproteins-tracing the role of a trace element in protein function. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. e421, 2005.

4 STADTMAN, T. C. Selenium biochemistry. Science, v. 183, n. 128, p. 915-922, 1974.

5 SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. **Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 255, 1999.

6 RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. Lancet, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

7 LEVANDER, O. A.; BECK, M. A. Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. **Biological Trace Element Research**, v. 56, n. 1, p. 5-21, 1997.

8 LI, G. S.; WANG, F.; KANG, D.; LI, C. Keshan disease: an endemic cardiomyopathy in China. **Human Pathology**, v. 16, n. 6, p. 602-609, 1985.

9 VITAMINS diary.com. **Keshan disease**: causes, symptom and treatment. Disponível em: <<u>http://http://www.vitaminsdiary.com/disorders/keshan.htm</u>>. Acesso em: 10/08/2011.

10 REEVES, W. C.; MARCUARD, S. P.; WILLIS, S. E.; MOVAHED, A. Reversible cardiomyopathy due to selenium deficiency. **JPEN. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 13, n. 6, p. 663-665, 1989.

11 XIA, Y.; HILL, K. E.; BYRNE, D. W.; XU, J.; BURK, R. F. Effectiveness of selenium supplements in a low-selenium area of China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 4, p. 829-834, 2005.

148

12 JOHANSSON, L.; GAFVELIN, G.; ARNER, E. S. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 1-13, 2005.

13 DUFFIELD, A. J.; THOMSON, C. D.; HILL, K. E.; WILLIAMS, S. An estimation of selenium requirements for New Zealanders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 896-903, 1999.

14 MUSHAK, P. Potential impact of acid precipitation on arsenic and selenium. **Environmental Health Perspectives**, v. 63, p. 105-113, 1985.

15 WHANGER, P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. Journal of the American College of Nutrition, v. 21, n. 3, p. 223-232, 2002.

16 CHAMBERS, I.; FRAMPTON, J.; GOLDFARB, P.; AFFARA, N.; MCBAIN, W.; HARRISON, P. R. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 6, p. 1221-1227, 1986.

17 BOCK, A.; STADTMAN, T. C. Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism. **Biofactors**, v. 1, n. 3, p. 245-250, 1988.

18 STADTMAN, T. C. Selenocysteine. Annual Review of Biochemistry, v. 65, p. 83-100, 1996.

19 IP, C.; GANTHER, H. E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 7, p. 1167-1170, 1992.

20 WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **The British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 11-28, 2004.

21 ALLMANG, C.; KROL, A. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1561-1571, 2006.

22 BÖCK, A. Selenium metabolism in bacteria. In: HATFIELD, D. L. (Ed). Selenium: its molecular biology and role in human health. Norwood, MA: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 7-22.

23 HAWKES, W. C.; LYONS, D. E.; TAPPEL, A. L. Identification of a selenocysteine-specific aminoacyl transfer RNA from rat liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 699, n. 3, p. 183-191, 1982.

24 SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. G. Incorporation of selenium from selenite and selenocystine into glutathione peroxidase in the isolated perfused rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 93, n. 4, p. 1181-1188, 1980.

25 BURK, R. F. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 9, p. 2274-2279, 1991.

26 ZINONI, F.; BIRKMANN, A.; STADTMAN, T. C.; BOCK, A. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formate-hydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 13, p. 4650-4654, 1986.

27 SZYMANSKI, M.; BARCISZEWSKI, J. The genetic code--40 years on. Acta Biochimica Polonica, v. 54, n. 1, p. 51-54, 2007.

28 PAPP, L. V.; LU, J.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxidants & Redox Signaling, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

29 SCHON, A.; BOCK, A.; OTT, G.; SPRINZL, M.; SOLL, D. The selenocysteine-inserting opal suppressor serine tRNA from *E. coli* is highly unusual in structure and modification. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 18, p. 7159-7165, 1989.

30 DIRHEIMER, G., KEITH, G., DUMAS, P., WESTHOF, E. Primary, secondary and tertiary structures of tRNAs. In: SÖLL, D., RAJBHANDARY, U.L. (Ed). **tRNA: structure, biosynthesis and function.** Washington, DC: ASM Press, 1995. p. 93-126.

31 COMMANS, S.; BOCK, A. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 335-351, 1999.

32 BARON, C.; WESTHOF, E.; BOCK, A.; GIEGE, R. Solution structure of selenocysteineinserting tRNA(Sec) from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA(Ser). **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 2, p. 274-292, 1993.

33 STURCHLER, C.; WESTHOF, E.; CARBON, P.; KROL, A. Unique secondary and tertiary structural features of the eucaryotic selenocysteine tRNA(Sec). Nucleic Acids Research, v. 21, n. 5, p. 1073-1079, 1993.

150

34 TORMAY, P.; WILTING, R.; HEIDER, J.; BOCK, A. Genes coding for the selenocysteine-inserting tRNA species from *Desulfomicrobium baculatum* and *Clostridium thermoaceticum*: structural and evolutionary implications. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1268-1274, 1994.

35 GABRYSZUK, J.; PRZYKORSKA, A.; MONKO, M.; KULIGOWSKA, E.; STURCHLER, C.; KROL, A.; DIRHEIMER, G.; SZARKOWSKI, J. W.; KEITH, G. Native bovine selenocysteine tRNA(Sec) secondary structure as probed by two plant single-strand-specific nucleases. **Gene**, v. 161, n. 2, p. 259-263, 1995.

36 CHITTUM, H. S.; BAEK, H. J.; DIAMOND, A. M.; FERNANDEZ-SALGUERO, P.; GONZALEZ, F.; OHAMA, T.; HATFIELD, D. L.; KUEHN, M.; LEE, B. J. Selenocysteine tRNA[Ser]Sec levels and selenium-dependent glutathione peroxidase activity in mouse embryonic stem cells heterozygous for a targeted mutation in the tRNA[Ser]Sec gene. **Biochemistry**, v. 36, n. 28, p. 8634-8639, 1997.

37 DIAMOND, A. M.; et al. Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine tRNA([Ser]Sec). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 19, p. 14215-14223, 1993.

38 BOCK, A. Invading the genetic code. Science, v. 292, n. 5516, p. 453-454, 2001._DOI: 10.1126/science.1060637

39 CARLSON, B. A.; HATFIELD, D. L. Transfer RNAs that insert selenocysteine. **Methods** in Enzymology, v. 347, p. 24-39, 2002.

40 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. 3565-3576, 2002.

41 LOW, S. C.; BERRY, M. J. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 6, p. 203-208, 1996.

42 BERRY, M. J.; BANU, L.; CHEN, Y. Y.; MANDEL, S. J.; KIEFFER, J. D.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. **Nature**, v. 353, n. 6341, p. 273-276, 1991.

43 BERRY, M. J.; BANU, L.; HARNEY, J. W.; LARSEN, P. R. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 8, p. 3315-3322, 1993.

44 WILTING, R.; SCHORLING, S.; PERSSON, B. C.; BOCK, A. Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. **Journal of Molecular Biology**, v. 266, n. 4, p. 637-641, 1997.

45 ROTHER, M.; RESCH, A.; GARDNER, W. L.; WHITMAN, W. B.; BOCK, A. Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 900-908, 2001.

46 LI, C.; RECHES, M.; ENGELBERG-KULKA, H. The bulged nucleotide in the *Escherichia coli* minimal selenocysteine insertion sequence participates in interaction with SelB: a genetic approach. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6302-6307, 2000.

47 KROL, A. Evolutionarily different RNA motifs and RNA-protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. **Biochimie**, v. 84, n. 8, p. 765-774, 2002.

48 IIDA, K., TANIGUCHI, S. Studies on nitrate reductase system of *Escherichia coli*. I. particulate electron transport system. **Journal of Biochemistry**, v. 46, p. 15, 1959.

49 SHOWE, M. K.; DEMOSS, J. A. Localization and regulation of synthesis of nitrate reductase in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, v. 95, n. 4, p. 1305-1313, 1968.

50 WIMPENNY, J. W.; COLE, J. A. The regulation of metabolism in facultative bacteria. 3. the effect of nitrate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 148, n. 1, p. 233-242, 1967.

51 LEINFELDER, W.; FORCHHAMMER, K.; ZINONI, F.; SAWERS, G.; MANDRAND-BERTHELOT, M. A.; BOCK, A. *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 540-546, 1988.

52 LEINFELDER, W.; ZEHELEIN, E.; MANDRAND-BERTHELOT, M. A.; BOCK, A. Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. **Nature**, v. 331, n. 6158, p. 723-725, 1988.

53 NELSON, D. L. COX, M. M. Lehninger: principles of biochemistry, 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2004.

54 FORCHHAMMER, K.; BOCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. analysis of the reaction sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6324-6328, 1991.

55 TORMAY, P.; WILTING, R.; LOTTSPEICH, F.; MEHTA, P. K.; CHRISTEN, P.; BOCK, A. Bacterial selenocysteine synthase--structural and functional properties. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 254, n. 3, p. 655-661, 1998.

56 FORCHHAMMER, K.; LEINFELDER, W.; BOESMILLER, K.; VEPREK, B.; BOCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (selA) and purification of the protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6318-6323, 1991.

57 GLASS, R. S.; SINGH, W. P.; JUNG, W.; VERES, Z.; SCHOLZ, T. D.; STADTMAN, T. C. Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12555-12559, 1993.

58 MIHARA, H.; KURIHARA, T.; WATANABE, T.; YOSHIMURA, T.; ESAKI, N. cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. **The Journal of Biological chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6195-6200, 2000.

59 ALLMANG, C.; WURTH, L.; KROL, A. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1415-1423, 2009.

60 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.

61 FISCHER, N.; PALESKAVA, A.; GROMADSKI, K. B.; KONEVEGA, A. L.; WAHL, M. C.; STARK, H.; RODNINA, M. V. Towards understanding selenocysteine incorporation into bacterial proteins. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 1061-1067, 2007.

62 FORSTER, C.; OTT, G.; FORCHHAMMER, K.; SPRINZL, M. Interaction of a selenocysteine-incorporating tRNA with elongation factor Tu from *E. coli*. Nucleic Acids Research, v. 18, n. 3, p. 487-491, 1990.

63 THANBICHLER, M.; BOCK, A.; GOODY, R. S. Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20458-20466, 2000.

152

64 SELMER, M.; SU, X. D. Crystal structure of an mRNA-binding fragment of *Moorella thermoacetica* elongation factor SelB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 15, p. 4145-4153, 2002. 65 THANBICHLER, M.; BOCK, A. Functional analysis of prokaryotic SELB proteins. **Biofactors**, v. 14, n. 1-4, p. 53-59, 2001.

66 FORCHHAMMER, K.; LEINFELDER, W.; BOCK, A. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. **Nature**, v. 342, n. 6248, p. 453-456, 1989.

67 DRISCOLL, D. M.; COPELAND, P. R. Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 17-40, 2003.

68 KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; ZEHTAB, O.; GUIGO, R.; GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003.

69 XU, X. M.; CARLSON, B. A.; IRONS, R.; MIX, H.; ZHONG, N.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 115-120, 2007.

70 XU, X. M.; CARLSON, B. A.; MIX, H.; ZHANG, Y.; SAIRA, K.; GLASS, R. S.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. **PLoS Biology**, v. 5, n. 1, p. e4, 2007.

71 KIM, I. Y.; STADTMAN, T. C. Selenophosphate synthetase: detection in extracts of rat tissues by immunoblot assay and partial purification of the enzyme from the archaean *Methanococcus vannielii*. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7710-7713, 1995.

72 LOW, S. C.; HARNEY, J. W.; BERRY, M. J. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21659-21664, 1995.

73 GUIMARAES, M. J.; PETERSON, D.; VICARI, A.; COCKS, B. G.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; FERRICK, D. A.; KASTELEIN, R. A.; BAZAN, J. F.; ZLOTNIK, A. Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15086-15091, 1996.

154

74 TAMURA, T.; YAMAMOTO, S.; TAKAHATA, M.; SAKAGUCHI, H.; TANAKA, H.; STADTMAN, T. C.; INAGAKI, K. Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16162-16167, 2004.

75 CARLSON, B. A.; XU, X. M.; KRYUKOV, G. V.; RAO, M.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 101, n. 35, p. 12848-12853, 2004.

76 YUAN, J.; PALIOURA, S.; SALAZAR, J. C.; SU, D.; O'DONOGHUE, P.; HOHN, M. J.; CARDOSO, A. M.; WHITMAN, W. B.; SOLL, D. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 103, n. 50, p. 18923-18927, 2006.

77 KERNEBECK, T.; LOHSE, A. W.; GROTZINGER, J. A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 230-233, 2001.

78 COPELAND, P. R.; DRISCOLL, D. M. Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25447-25454, 1999.

79 COPELAND, P. R.; FLETCHER, J. E.; CARLSON, B. A.; HATFIELD, D. L.; DRISCOLL, D. M. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 2, p. 306-314, 2000.

80 FAGEGALTIER, D.; HUBERT, N.; YAMADA, K.; MIZUTANI, T.; CARBON, P.; KROL, A. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 17, p. 4796-4805, 2000.

81 TUJEBAJEVA, R. M.; COPELAND, P. R.; XU, X. M.; CARLSON, B. A.; HARNEY, J. W.; DRISCOLL, D. M.; HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. **EMBO Reports**, v. 1, n. 2, p. 158-163, 2000.

82 CHAVATTE, L.; BROWN, B. A.; DRISCOLL, D. M. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 5, p. 408-416, 2005.

83 XU, X. M.; MIX, H.; CARLSON, B. A.; GRABOWSKI, P. J.; GLADYSHEV, V. N.; BERRY, M. J.; HATFIELD, D. L. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41568-41575, 2005.

84 COPELAND, P. R.; STEPANIK, V. A.; DRISCOLL, D. M. Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 5, p. 1491-1498, 2001.

85 FLETCHER, J. E.; COPELAND, P. R.; DRISCOLL, D. M. Polysome distribution of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA: evidence for a block in elongation at the UGA/selenocysteine codon. **RNA**, v. 6, n. 11, p. 1573-1584, 2000.

86 SMALL-HOWARD, A.; MOROZOVA, N.; STOYTCHEVA, Z.; FORRY, E. P.; MANSELL, J. B.; HARNEY, J. W.; CARLSON, B. A.; XU, X. M.; HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J. Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation *in vivo*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 6, p. 2337-2346, 2006.

87 BARON, C.; HEIDER, J.; BOCK, A. Interaction of translation factor SELB with the formate dehydrogenase H selenopolypeptide mRNA. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 9, p. 4181-4185, 1993.

88 ZAVACKI, A. M.; MANSELL, J. B.; CHUNG, M.; KLIMOVITSKY, B.; HARNEY, J. W.; BERRY, M. J. Coupled tRNA(Sec)-dependent assembly of the selenocysteine decoding apparatus. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 773-781, 2003.

89 DING, F.; GRABOWSKI, P. J. Identification of a protein component of a mammalian tRNA(Sec) complex implicated in the decoding of UGA as selenocysteine. **RNA**, v. 5, n. 12, p. 1561-1569, 1999.

90 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning a laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor. 2000. v. 3.

91 GASTEIGER, E. H. C. G., A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker, John M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. York: Humana Press, 2005.

92 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

156

93 HARTMANN, R. K.; BINDEREIF, A.; SCHÖN, A.; WESTHOF, E. Handbook of RNA biochemistry. Weinheim: Wiley-VCH; 2005. v. 1.

94 CREIGHTON, T. E. The physical and chemical basis of molecular biology. [U.K.?]: Helvetian Press, 2010.

95 FASMAN, G. D. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York: Plenum, 1996.

96 MOULTON, V.; GARDNER, P. P.; POINTON, R. F.; CREAMER, L. K.; JAMESON, G. B.; PENNY, D. RNA folding argues against a hot-start origin of life. **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, n. 4, p. 416-421, 2000.

97 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** 3rd ed. New York: Springer Science, 2006.

98 CASSAGO, A. **Estudos moleculares da Selenocisteína sintase (SELA) de** *Escherichia coli.* 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

99 NIRENBERG, M. Protein synthesis and the RNA code. Harvey Lectures, v. 59, p. 155-185, 1965.

100 LAFONT, V.; ARMSTRONG, A. A.; OHTAKA, H.; KISO, Y.; MARIO AMZEL, L.; FREIRE, E. Compensating enthalpic and entropic changes hinder binding affinity optimization. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 69, n. 6, p. 413-422, 2007.

101 VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; OHTAKA, H.; NEZAMI, A.; MUZAMMIL, S.; FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry. In: BONIFACINO, J. S. et al (Ed). Current protocols in cell biology. New York: John Wiley, 2004. cap. 17, Unit 17 18. ISBN: 0471241083.

102 BARON, C.; HEIDER, J.; BOCK, A. Mutagenesis of selC, the gene for the selenocysteine-inserting tRNA-species in *E. coli*: effects on in vivo function. Nucleic Acids Research, v. 18, n. 23, p. 6761-6766, 1990.

103 AEBY, E.; ULLU, E.; YEPISKOPOSYAN, H.; SCHIMANSKI, B.; RODITI, I.; MUHLEMANN, O.; SCHNEIDER, A. tRNASec is transcribed by RNA polymerase II in *Trypanosoma brucei* but not in humans. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 17, p. 5833-5843, 2010.

104 OGANESYAN, N.; ANKOUDINOVA, I.; KIM, S. H.; KIM, R. Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 2, p. 280-285, 2007.

105 LEINFELDER, W.; FORCHHAMMER, K.; VEPREK, B.; ZEHELEIN, E.; BOCK, A. *In vitro* synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRNA(UCA): involvement and characterization of the selD gene product. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 2, p. 543-547, 1990.

106 SPRINZL, M.; HARTMANN, T.; WEBER, J.; BLANK, J.; ZEIDLER, R. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. r1-r172, 1989. Supplement.

107 HEIDER, J.; LEINFELDER, W.; BOCK, A. Occurrence and functional compatibility within enterobacteriaceae of a tRNA species which inserts selenocysteine into protein. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 7, p. 2529-2540, 1989.

Anexo 1 – Participação em artigos publicados e submetidos durante o período em questão

Purification and Biophysical Characterization of Selenocysteine Synthase (SELA) from *Escherichia coli*.

Livia Regina Manzine^a, Alexandre Cassago^a, Marco Túlio Alves da Silva^a & Otavio Henrique Thiemann^{a*}

^aInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador Saocarlense 400, São Carlos, 13560-970, SP, Brazil;

***Corresponding author:** O. H. Thiemann, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Avenida Trabalhador Sãocarlense 400, São Carlos, 13566-590, SP, Brazil, tel.:+55 16 33738089, fax: +55 16 33739881, e-mail: thiemann@ifsc.usp.br

ABSTRACT

Selenocysteine synthase (SELA, E.C. 2.9.1.1) from *Escherichia coli* is a homodecamer pyridoxal-5'-phosphate enzyme responsible for the conversion of seryl-tRNA^{sec} into selenocysteyl-tRNA^{sec} in the biosynthesis of the 21th amino acid, selenocysteine (Sec or U). Here, we describe the cloning of the *E. coli selA* gene into a modified pET29a(+) vector, its expression in *E. coli* strain WL81460, a crucial modification allowing SELA expression without bound endogenous RNA. This expression strategy allowed the purification and additional biochemical and biophysical characterization. The homogeneous SELA protein was achieved using two chromatographic steps. Size Exclusion Chromatography and Native Gel Electrophoresis showed that SELA maintains a decameric state with approximate molecular mass of 500 kDa with an isoelectric point of 6. A predominance of α -helix structures was detected by Circular Dicroism with thermal stability up to 45 °C.

Keywords: selenocysteine synthase; pyridoxal-5´-phosphate; circular dichroism; fluorescence.

INTRODUCTION

The amino acid Selenocysteine (Sec) was discovered in mid-1960 [1] and is considered the 21th amino acid [2] present in organisms of all three domains of life: eubacteria, archea and eukaryotes, although not ubiquitous to all member of these domains. Being an additional amino acid residue to the canonical 20, it has a defined codon for incorporation. This is fixed in all selenocysteine-containing organisms as a UGA-Sec codon that is differentiated from the normal UGA-Stop codon by the cis-signaling of the SECIS sequence (SElenoCysteine Incorporating Sequence). [7]. The initial steps of this pathway involve the charging of tRNA^{sec} with serine by

Seryl-tRNA synthetase (SerRS), followed by the conversion of seryl-tRNA^{sec} into selenocysteyl-tRNA^{sec} by Selenocysteine synthase (SELA, E.C. 2.9.1.1) [4, 5]. SELA is only found in the domain eubacteria and in *E. coli*, converts seryl-tRNA^{sec} (Ser-tRNA^{sec}) into selenocysteyl-tRNA^{sec} (Sec-tRNA^{sec}) in a pyridoxal-5'-phosphate (PLP) dependent mechanism [5, 6], and was first characterized as a homodecamer of approximate 500 kDa [3, 6].

SELA catalyzes the conversion of serine into selenocysteine in a two-step reaction. In the first step, SELA binds to Ser-tRNA^{sec} resulting in the formation of a Schiff base between the α -amino group of lysine 295 residue with the carbonyl of the pyridoxal-5´-phophate, eliminating water and generating the enzyme-bound dehydro-alanyl-tRNA^{sec} intermediate [7]. In the second step of the reaction occurs the transfer of selenophosphate, to the intermediate molecule [8, 9], completing the synthesis of selenocysteine. In eukarya and archaea the conversion from Ser-tRNA^{sec} to Sec-tRNA^{sec} occurs by a different pathway involving sequential the phosphorilation of Serine and conversion to Sec-tRNA^{sec}. by two enzymes, a phosphoseryl-tRNA^{sec} kinase (PSTK) and Sep-tRNA:Sec-tRNA synthase (SepSecS). [10].

Aiming to better understand the selenocysteine incorporation pathway, we cloned SELA gene into a modified expression vector and expressed the protein in a specific *E. coli* strain, whose tRNA^{sec} was deleted, allowing for the preparation of RNA-free SELA in large ammountsThe native conformation and isoelectric point of purified protein was analyzed by biochemical methods and additional analyses were performed using fluorescence spectrocopy and circular dichroism, revealing that this expression method results in a protein consistent with the biologically active SELA for biochemical investigation.

MATERIALS and METHODS

Cloning, bacterial strains, lysogeny and growth conditions.

The *selA* gene was amplified from *E. coli* K12 genomic DNA (DNAeasy Tissue Kit - Qiagen) by polymerase chain reaction (PCR). Two oligodeoxynucleotide primers for PCR amplification SELA-1 (5'-ACTGTAT<u>CATATG</u>ACAACCGAAACGCGTTTCCTCTATAG-3') and SELA-2 (5'-TAGCT<u>AAGCTT</u>TCATTTCAACAACATCTCCAAAAAC CG-3'), with *Nde* I and *Hind* III restriction sites respectively, were synthesized, based on the available sequence (Genebank accession number P0A821). The PCR reaction, containing 100 pmol of each primer and approximately 300 ng of *E. coli* genomic DNA, was carried out in a PCR-100 thermocycle (MJ Research Inc.) with 2.5 U of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) according to the manufacture's instructions. The sample was subjected to 3 min denaturation at 96

 $^{\circ}$ C followed by 30 cycles of denaturation at 96 $^{\circ}$ C for 0.5 min, annealing at 55 $^{\circ}$ C for 0.5 min and extension at 68 $^{\circ}$ C for 1.5 min.

The 1392pb product of *selA* gene was purified in a 1% agarose gel and cloned into *NdeI-Hind*III digested pET29a(+) vector and transformed in *E. coli* DH5 α competent cells. - The recombinant plasmid was extracted and sequenced to confirm the nucleotide sequence Sambrook and Russel [11]. *Escherichia coli* WL81460 strain, a derivate of strain FM433 carrying an inframe deletion in the *sel*C gene and kanamycin resistant was a kind gift by Professor August Böck (Biocience Mollecular Institute from University of Frankfurt, Germany).. This strain was modified for expression of T7 RNA polymerase enzyme by genome integration of the λ DE3 prophage using Lambda DE3 Lysogenization kit (Stratagene) following manufacture's instructions. Plasmid pET29a(+) kanamycin resistance gene was changed to ampicilin resistance with the pET-Duet-1 vector sequence using *Dra* III and *Sap* I restriction enzymes (Fermentas). The ampicillin pET29a(+) was transformed into *E. coli* WL81460(λ DE3) competent cells and selected by ampicillin, 50µg/ml and kanamycin, 30µg/ml in LB agar medium.

To overexpress the encoded SELA protein, 3 liters of *E. coli* WL81460(λ DE3) cells were grown aerobically in LB selective medium to O.D.₆₀₀ of 1.0 at 37° C, the culture was induced by the addition of 0.1 mM IPTG for 2 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at 4.000 x g and stored frozen at - 20° C.

Purification and characterization of SELA protein

The recombinant SELA protein purification steps were based on the protocol established by Forchhammer and co-workers [3] with modifications. In short, the frozen cells were solubilized in buffer A (20 mM potassium phosphate, pH 7.5, 10 μ M PLP and 10 μ g/mL lysozyme) and ultrasound disruption (550 Sonic Dismembrator Fisher Scientific) by four cycles of 20 sec pulses, with 45 sec of rest. The cell extract was clarified by centrifugation at 30.000 x g for 30 min (Sorvall RC Plus), the supernatant was precipitated by the addition of ammonium sulfate to 25% saturation in ice and centrifuged at 20.000 x g for 20 min. The sediment was suspended in buffer A and desalted on a 5 mL Hi Trap Desalting column (GE) previously equilibrated with buffer A at a flow rate of 2.0 mL/min. The desalted fraction was applied in a 2.0 x 12.0 cm Hydroxyapatite ion exchange column (Bio-Rad) and SELA eluted as the flowthrough. The purified SELA was applied to a Hi Trap Q HP ion exchange column (GE) and eluted with 300 mM KCl in buffer A of a linear KCl gradient (0 mM to 1000 mM). Recombinant SELA protein was desalted again as described previously and the fractions collected were adjusted to 10% of glycerol, concentrated up to 8.0 mg/mL by ultrafiltration (10 kDa cutoff membrane; Amicon). Purified SELA was analyzed by size exclusion chromatography in a Superdex 200 HL column (1.6 x 60 cm size) (GE) equilibrated with buffer A without PLP and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to Laemmli (1970) [12] Oligomerization states were verified by 4-15% native gradient gel electrophoresis in a *Phast System* (GE) using molecular weights standards containing thyroglobulina (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa) and aldolase (140 kDa). The concentration of pure SELA protein solutions was determined spectrophotometrically at 280 nm by considering the predicted aromatic amino acids content and the predicted extinction molar coefficient ($\varepsilon = 35410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtained from ProtParam tools [13]. Isolelectric focusing was done with the *Phast System* (GE) using precast PhastGel IEF gels (pI range 3-9) and pI markers according to the manufacturer's instructions.

Circular dichroism spectroscopy (CD) and Intrinsic fluorescence spectroscopy

Far UV CD spectra of 0.2 mg/ml of SELA protein in 20mM potassium phosphate (pH 7.5) were recorded over a wavelength range of 190 - 250 nm by signal averaging of 16 accumulations using a scanning speed of 100 nm min⁻¹, a spectral bandwidth of 1 nm, and a response of 0.5 sec, in a Jasco J-715 spectropolarimeter (Jasco). Data analysis was performed using CDSSTR program and SP29 and SP37A were used as protein databases [14]. Thermal denaturation of SELA at 0.2 mg/ml concentration was performed in 20mM potassium phosphate (pH 7.5) and 10mM Dithiothreitol. The thermal denaturation process was followed by measuring the decrease in CD signal at 222 nm as a function of temperature. SELA protein was allowed to equilibrate at 10° C and then heated at 1° C min⁻¹ up to 90° C.

Intrinsic fluorescence measurements were performed in a quartz 10 x 2 mm cuvette using an ISS-PC1 spectrofluorimeter (ISS, Champaing, IL) at 25 °C using 0.1 mg/ml of SELA protein in 20mM potassium phosphate, pH 7.5. Emission spectra were recorded in a range of 300 to 450 nm using an excitation wavelength of 295 nm and a cutoff 305 nm filter in the emission. The results are an average of three independent experiments and each measurement was corrected for buffer contribution.

RESULTS and DISCUSSION

Purification and oligomerization analysis of SELA protein

Escherichia coli WL81460(λ DE3) strain was chosen for expression of SELA protein due to its deficiency in the production of SELA specific tRNA (seryl-tRNA^{sec}). This characteristic

allowed us to oobtain a more homogeneous sample as well as more accurate biochemical and biophysical characterizations and are relevant for the investigation of all tRNA-binding proteins.

Purified SELA protein from WL81460(λ DE3) strains achieved a high homogeneity after size exclusion chromatography using a Superdex 200 HL (16 x 60 cm) column which has a separation range to globular proteins from 10,000 kDa to 600,000 kDa. The results showed an isolated peak that was eluted in the exclusion volume of 12 mL which correspond the decameric structure of SELA protein (Figure 1A). SDS-PAGE analysis confirmed the purity of the sample and the approximate monomer molecular mass of 50 kDa, (Figure 1B)The purified SELA protein oligomerization state was verified by native gradient gel electrophoresis (4% to 15%) (Figure 2) The results from both methods i.e. Size Exclusion Chrpomatography and Native Gradient Gel Electrophoresis are consistent and showed that the recombinant SELA protein is purified in the decameric form with a calculated molecular mass of 600,000 kDa. The experimental isoelectric point determined of 6.03 (Figure 3), is consistent with the predicted value of 6.21. These results are in agreement with data published by Forchhammer and co-workers [3] confirming that the recombinant SELA obtained is in its biologically active form.

Circular dichroism (CD) and thermal denaturation

To further characterize the recombinant SELA obtained, Circular Dichroism (CD) and Thermal Stability tests were performed. The far UV CD spectra at 25 °C displayed two negative bands at 222 and 208 nm and a positive band near 200 nm (Figure 4).

The estimated α -helix and β -strands content ranged from 74% to 76% and from 10% to 13%, respectively with a content of turns approximately of 2% to 4% and unrelated structures from 9% to 12%. These results indicate that the purified *E. coli* SELA protein is mainly formed by α -helices and with a significant β -strands content, consistent with the Methanoccocus janasci structure, were the putative SELA of archaea is mostly formed by α -helices and has a β -strand core (REF).

Temperature effect on SELA secondary structure showed that the protein stability is maintained up to 45° C. SELA has a thermal transition from 60 to 70° C with a Tm of 60° C and an evident plateau above 70 °C in which all secondary structures were lost and the protein is completely denatured (Figure 4B).

Intrinsic fluorescence spectroscopy

The secondary structure of SELA protein from *E. coli* also was studied by tryptophan intrinsic fluorescence.

The SELA emission spectrum showed a maximum fluorescence wavelength at 336 nm approximately upon excitation at 295 nm (Figure 5). The high signal of fluorescence intensity obtained is an average of the contributions of the four tryptophan residues presented in each monomer of SELA protein and indicated that these residues are relatively buried in the structure of the protein.

CONCLUSIONS

Selenocysteine synthase (SELA) from E. coli is a pyridoxal-5'-phosphate containing e formation of selenocysteyl-tRNA^{sec} from seryl-tRNA^{sec} and enzyme responsible for the selenophosphate [15]. The expression of SELA in E. coli strain WL81460(\lambda DE3) and the establishment of a purification protocol is of relevance since we have shown that the protein expressed in SelC containing E. coli cells binds endogenous RNA, probably tRNA, and this is copurified. This SELA protein may be heregoeneous in the number of tRNA molecules bound per SELA, compromising subsequent biochemical investigations. The analysis of the recombinant SELA, free of bound RNA is consistent with the expected results for the native protein by SDS-PAGE analysis, that revealed a 50 kDa monomer and the native gradient gel electrophoresis demonstrated that a decamer is formed as a stableoligomeric state. All biophysical analysis of the SELA protein are consistent with the expected characteristics of E. coli SELA. Its isoelectric point is of 6.03, whereas circular dichroism studies revealed that the enzyme has secondary structure content compatible with the putative SELA from M. janasci, approximately 74% α-helixes and 10% β-strands. Thermal denaturation assays showed that the secondary structure of SELA is stable up to 45°C indicating a compact decameric structure with stable SELA-SELA binding and the intrinsic fluorescence indicate that the tryptophan residues are buried in a hydrophobic environmental of the protein. This study complements data previously published and contribute establishing a robust expression model for the enzyme free of bound RNA. These results should be taken into consideration in all cases of heterologous/homologous expression of recombinant RNAbinding proteins, to avoid the inadverted carryover of endogenous RNAs that may interfere with further biochemical characterizations.

Acknowledgments

The authors thank the Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 06/53904-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. Professor August Böck from Bioscience Mollecular Institute from University of Frankfurt, German

REFERENCES

[1] Nirenberg, M. Protein synthesis and the RNA code. The Harvey Lectures, v. 59, p. 155-185, 1965.

[2] 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. 3565-3576, 2002.

[3] Forchhammer, K.; Leinfelder, W.; Boesmiller, K.; Veprek, B.; Böck, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (selA) and purification of the protein. Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 10, p. 6318-6323, 1991.

[4] Commans, S.; Böck, A. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. FEMS Microbiology Reviews, v. 23, p. 335-351, 1999.

[5] Stadman, T.C. Selenocysteine. Annu. Rev. Biochemistry, v. 65, p. 83-100, 1996.

[6] Leinfelder, W.; Forchhammer, K.; Zinoni, F.; Sawers, G.; Mandrand-Berthelot, M.-A.; Bock, A. *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. Journal of Bacteriology, v. 170, n. 2, p. 540-546, 1988.

[7] Forchhammer, K.; Böck, A. Selenocysteine Synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. Ther Journal of Biological Chemistry, v. 266, n. 10, p. 6324-6328, 1991.

[8] Allmang, C.; Wurth, L.; Krol, A. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1790, n. 11, p. 1415-1423, 2009.

[9] Glass, R.S.; Singh, W.P.; Jung, W.; Veres, Z.; Scholz, T.D.; Stadtman, T.C. Monoselenophosphate: synthesis, characterization and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. Biochemistry, v. 32, n. 47, p. 12555-12559, 1993.

[10] Yuan, J.; Palioura, S.; Salazar, J.C.; Su, D.; O'Donoghue, P.; Hohn, M.J.; Cardoso, A.M.; Whitman, W.B.; Söll, D. RNA-dependent conversion o phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. PNAS, v. 12, p. 18923-18927, 2006.

[11] Sambrook, J.; Russel, D.W. Molecular Cloning: A laboratory manual 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Press 2001.

[12] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, v. 227, p. 680–685, 1970.

[13] Gasteiger, E.H.C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: J.M. Walker (Eds.), The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. Copyright Humana Press, p. 571-607, 2005.

[14] Sreerama, N.; Woody, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set, Anal. Biochem. v. 287, p. 252-260, 2000.

[15] Tormay, P.; Wilting, R.; Lottspeich, F., Mehta, P.; Christen, P.; Böck, A. Bacterial selenocysteine synthase: structural and functional properties. Eur. J. Biochem. v. 254, p. 655-661, 1998.

Legends:

Figure 1: Final steps of purification of SELA protein using Superdex 200 HL (16 x 60 cm) column (GE). (A) Profile chromatography of SELA protein monitored at wavelength of 280 nm. (B) Samples were analyzed by SDS-PAGE (15%). Lane 1, molecular-weight bovine albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), α -lactalbumin (14 kDa) (Sigma). Lane 2, pre-column. Lane 3, elution of SELA protein (major peak of Figure 1A).

Figure 2: Analyze of oligomeric state of SELA protein using native gel electrophoresis. (A) Lane 1, molecular-weight thyroglobulina (669 kDa), ferritin (440 kDa), catalase (232 kDa) and aldolase (140 kDa). Lane 2, SELA protein concentrated at 4 μ M after size exclusion column. (B) Linear regression graph for evaluation of molecular mass of SELA protein.

Figure 3: Analysis of experimental isoelectric point of SELA protein. (A) Lane 1, Reference proteins. Lane 2, Purified SELA protein at 2.0 mg/ml. (B) Linear fitting of pH gradient profile to determine experimental SELA isoelectric point.

Figure 4: Circular dichroism analysis of recombinant SELA protein. **Panel A:** CD spectra of native SELA at concentration of 0.2 mg/ml in 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). The spectra were recorded at 25 °C from 250 to 190 nm. **Panel B:** Transition curve of thermal denaturation of SELA protein. Experiments were performed monitoring the changes at 222 nm as function of temperature (10-90°C) with 0.2 mg/ml protein in buffer with 10 mM of DTT to avoid the interference of sulfite bonds during denaturation process. The results are an average of three independent experiments.

Figure 5: Intrinsic fluorescence emission spectra of SELA protein at 25 °C using 0.1 mg/ml of SELA protein in 20mM potassium phosphate, pH 7.5. Emission spectra in a range of 300 to 450 nm were recorded using an excitation wavelength of 295 nm and a cutoff 305 nm filter in the emission.



Figure 1







Figure 3



Figure 4



Figure 5





Purification, and Biochemical and Biophysical Characterization of Cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum* IOC 3844

Colussi, Francieli¹, Viviane Serpa¹, Priscila da Silva Delabona^{1,2}, Lívia Regina Manzine¹, Maria Luiza Voltatódio¹, Renata Alves¹, Bruno Luan Mello¹, Nei Pereira Jr.³, Cristiane Sanches Farinas², Alexander M. Golubev⁴, Maria Auxiliadora Morim Santos^{1*}, and Igor Polikarpov^{1*}

¹Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sãocarlense 400, São Carlos, 13560-970, SP, Brazil ²EMBRAPA Instrumentação Agropecuária, Rua XV de Novembro 1452, São Carlos, 13560-970, SP, Brazil

³Centro de Tecnologia, Éscola de Química, Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LaDeBio), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, RJ, Brazil

⁴Department of Molecular and Radiation Biophysics, St. Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, 188300, Russia

Received: October 18, 210 / Revised: April 17, 2011 / Accepted: May 27, 2011

Because of its elevated cellulolytic activity, the filamentous fungus Trichoderma harzianum has a considerable potential in biomass hydrolysis applications. Trichoderma harzianum cellobiohydrolase I (ThCBHI), an exoglucanase, is an important enzyme in the process of cellulose degradation. Here, we report an easy single-step ion-exchange chromatographic method for purification of ThCBHI and its initial biophysical and biochemical characterization. The ThCBHI produced by induction with microcrystalline cellulose under submerged fermentation was purified on DEAE-Sephadex A-50 media and its identity was confirmed by mass spectrometry. The ThCBHI biochemical characterization showed that the protein has a molecular mass of 66 kDa and pI of 5.23. As confirmed by smallangle X-ray scattering (SAXS), both full-length ThCBHI and its catalytic core domain (CCD) obtained by digestion with papain are monomeric in solution. Secondary structure analysis of ThCBHI by circular dichroism revealed α helices and β -strands contents in the 28% and 38% range, respectively. The intrinsic fluorescence emission maximum of 337 nm was accounted for as different degrees of exposure of ThCBHI tryptophan residues to water. Moreover, ThCBHI displayed maximum activity at pH 5.0 and temperature of 50°C with specific activities against Avicel and *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside of 1.25 U/mg and 1.53 U/mg, respectively.

Phone: +55 16 33738088; Fax: +55 16 33739881; E-mail: ipolikarpov@ifsc.usp.br M. A. M. Santos

E-mail: santosma@if.sc.usp.br

Keywords: Cellobiohydrolase I, catalytic core domain, *Trichoderma harzianum* 3844, purification, identification.

Cellulose, a major component of plant cell wall, is a linear polymer consisting of D-anhydroglucopyranose units joined together by β -1,4-glycosidic bonds with degree of polymerization ranging from 100 to 20,000 [11, 14, 52, 56, 57]. The crystalline cellulose is highly stable, which implicates that most of cellulose degradation in Nature has to be accomplished by enzymes [27, 53, 56]. The complete enzymatic cellulose hydrolysis involves synergistic actions of endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exoglucanases/cellobiohydrolases (E.C. 3.2.1.91), and β-glucosidases (E.C. 3.2.1.21) [25, 48, 56, 57]. All these enzymes are industrially important, and are being used in the pulp and paper, textile, and detergent industries. More recently, the use of cellulases for the industrial conversion of cellulose-containing biomass to fermentable sugars as an alternative to fossil fuels has attracted considerable attention [27, 36, 38, 40].

Amongst fungal cellulases, the enzymes from *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens* have been most intensively studied by structural and biochemical tools [15, 17, 18, 44, 51]. The major components of the cellulolytic enzyme complex of *T. reesei*, with almost no exceptions, all have the same canonical bimodular organization composed of a large catalytic core domain (CCD) connected to a small cellulose-binding module (CBM) via a long and heavily *O*-glycosylated linker peptide. It has been proposed that the two domains, CCD and CBM, of cellobiohydrolases interact simultaneously with the cellulose surface, each with different binding specificities, thereby enabling the

^{*}Corresponding author

I. Polikarpov

Phone: +55 16 33738088; Fax: +55 16 33739881;

809 Colussi et al.

enzyme to move along the cellulose surface by twodimensional lateral diffusion [44, 45, 48].

The CAZy [11] classification of the cellulases into glycoside hydrolase (GH) families is based on the three-dimensional structure of the enzyme [24, 26]. The cellobiohydrolase I from T. reesei (TrCBHI) is an exoglucanase that belongs to the GH-7 family and hydrolyzes the β -1,4-linkages of a cellulose chain from its reducing end [13, 49]. TrCBHI is the major component of the T. reesei cellulase system. The catalytic core domain (CCD) structures of TrCBHI revealed a central structural motif constituted mainly by an antiparallel β-sandwich motif that bears four surface loops, which decorate the concave face of the sandwich forming the cellulase-binding tunnel [18, 44]. In the process of enzymatic catalysis, the cellulose polysaccharide chain slides through the substrate-binding tunnel, and every second glycosidic bond is correctly presented to the catalytic apparatus located at the far end of the tunnel. This explains why the enzymes progressively liberate disaccharide units (cellobiose) from the cellulose chain [17].

Although the structure-function studies of cellulases are a rapidly developing area, more biochemical information about a wider range of enzymes is needed in order to comprehend in depth the fine details of the molecular mechanism of enzymes action. So far, little is known about the cellulolytic machinery of the filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. In this study, we purified and conducted initial biochemical and biophysical characterizations of both native *Th*CBHI and its core catalytic domain from the promising cellulolytically competent *Trichoderma harzianum* IOC-3844 strain.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

CM-cellulose, Avicel, and papain were from Sigma-Aldrich. Other reagents were of analytic grade.

Strain and Spore Counting

Trichoderma harzianum IOC-3844 was obtained from the culture collection of Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Its spores, kept at -80° C in 20% (v/v) glycerol, were used to inoculate potato dextrose agar (PDA) Petri plates (Difco Laboratories, USA). Seven days after inoculation at 30°C (or after strong sporulation occurred), the spores were harvested by washing the Petri plate with 10 ml of sterile saline and the spore concentration was determined in a Neubauer chamber after appropriate dilution.

Pre-Culture and Production Media

Pre-cultures were carried out in medium adapted from Mandels and Weber [34], which contained 0.3 g/l urea; 2.0 g/l KH_2PO_4 ; 1.4 g/l $(NH_4)_2SO_4$; 0.4 g/l $CaCl_2\cdot 2H_2O$; 0.3 g/l $MgSO_4\cdot 7H_2O$; 0.6 g/l yeast extract; 5.0 mg/l $FeSO_4\cdot 7H_2O$; 1.6 mg/l $MnSO_4\cdot 4H_2O$; 1.4 mg/l $ZnSO_4\cdot 7H_2O$; 2.0 mg/l $CoCl_2\cdot 6H_2O$; and 10 g/l glucose (carbon source). The

composition of media for production of cellulases was the same as that of the corresponding pre-culture media, except for glucose, which was replaced by 10 g/l Avicel.

Enzyme Production in Flasks and in Stirred Fermenter

Erlenmeyer flasks of 500 ml total volume, each containing 100 ml of pre-culture media, were inoculated in a final concentration of 106 spores/ml and cultivated for 48 h at 25°C in a rotary shaker at 250 rpm. A 7.5 1 vessel BioFlo 115 Fermenter (New Brunswick Scientific Co., USA) equipped with automatic control of temperature, pH, agitation, aeration, and foam, was inoculated with 10% (v/v) of pre-culture. The working volume for enzyme production was 4 l; the temperature was kept at 25°C, and agitation at 200 rpm during the day and 150 rpm at night. The aeration rate was adjusted so that the dissolved O₂ level never dropped below 60% of air saturation in culture media. The pH was set at 5 ± 0.2 and was controlled automatically by the addition of 20% HCl or 20% NaOH. The foam formation was suppressed by manual addition of antifoam (Sigma). After 144 h, the cultivation was terminated and the mycelium and remaining Avicel were removed by centrifugation. The supernatant was concentrated to 100 ml by a hollow fiber ultrafiltration, using UFP-5-E-35 cartridge [46], and dialyzed against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The cellulase preparation was then stored at 4°C until purification.

Purification, Proteolytic Digestion, and Partial Protein Sequencing

DEAE-Sephadex (A-50, Sigma) was allowed to swell in a large excess of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 (buffer A), and the supernatant was replaced by fresh buffer solution three times over a period of 24 h. The crude extract of T. harzianum was centrifuged, filtered, and partially concentrated in the tangential filtration system Hollow Fiber (Amersham Bioscience), and the pH was adjusted to 7.0. This preparation was loaded onto the DEAE-Sephadex A-50 glass column $(5.0 \times 40 \text{ cm})$ pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 (buffer A). Elution was carried out at 3 ml/min with a linear NaCl gradient from 0 to 1 M in buffer A. All fractions were analyzed for protein content and their exoglucanase activity. The proteolytic digestion of ThCBHI was accomplished by addition of papain (40 mM phosphate buffer, pH 6.0; 5 mM L-cysteine; 2 mM EDTA) to cellobiohydrolase I (50 mM Tris-HCl buffer; 300 mM NaCl) in a ratio of 1:50. The incubation was continued for 2 h at 25°C and the results of hydrolysis were visualized by SDS-PAGE. The isolation of CCD from CBM was achieved by loading the digested material onto a Superdex 75 column 10/30 [46] and eluting it with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, and 300 mM NaCl.

The presumed *Th*CBHI band was excised from polyacrylamide gels and cleaved with trypsin (Sigma) by in-gel digestion [47]. The derived peptides were analyzed on a Tandem Electrospray MS (Q-Tof) equipped with nanospray interphase (Micromass), at the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS, Campinas, Brazil). Protein sequence alignments were performed in Mass Spectrometry driven Best Local Alignment Search Tool (MS BLAST) using the SWISS-PROT.

Determination of Optimal pH and Temperature for ThCBHI Activity

A Central Composite Rotatable Design (CCRD) containing five levels for each independent variable (coded as -1.414, -1, 0, +1, +1.414)

Table 1. Independent variables	es.
---------------------------------------	-----

		Level				
Variance	Symbol	-1.4142^{a}	-1^{a}	0^{a}	$+1^{a}$	$+1.4142^{a}$
Temperature (°C)	А	21.80 ^b	30 ^b	50 ^b	70 ^b	78.20 ^b
рН	В	2.18 ^b	3 ^b	5 ^b	7 ^b	7.82 ^b

^aCoded values.

^bActual values.

was employed to evaluate the effects of two main parameters of the *Th*CBHI activity: temperature and pH. These variables (k=2) and their levels were predetermined based on the CBHI literature, with the temperature and pH, in the ranges between 21.80°C and 78.20°C and pH values from 2.18 to 7.82 in 50 mM HCl/KCl and Na₂PO₄/NaH₂PO₄ adjusted to the different pH values respectively. The coded and actual values of the independent variables are given in Table 1.

A total of 11 experiments were performed, being 2^2 experiments for a full factorial design plus 2×2 star experiments and three replications carried out at the center points to evaluate the experimental error. The response obtained (*Th*CBHI *p*NPC activity) was fitted to a second-order polynomial model, Eq. (1). After that, the experimental data were analyzed using the STATISTICA 7.0 software (StatSoft, Inc.) to obtain the statistical significance of the regression coefficients for the dependent variables, variance of fit of the model (ANOVA), and the three-dimensional response surface plot (RSM).

$$\mathbf{Y} = \boldsymbol{\beta}_{0} + \boldsymbol{\Sigma}_{j} \,\,\boldsymbol{\beta}_{j} \mathbf{x}_{j} + \boldsymbol{\Sigma}_{i < j} \,\,\boldsymbol{\beta}_{ij} \mathbf{x}_{i} \mathbf{x}_{j} + \boldsymbol{\Sigma}_{j} \,\,\boldsymbol{\beta}_{jj} \mathbf{x}_{j}^{2} + \mathbf{e} \tag{1}$$

where Y is the *p*NPC activity; β_o the constant coefficient; β_j , $\beta_{jj} \in \beta_{ij}$ are the coefficients for the linear, quadratic, and interaction effects, respectively; x_j , x_i are the independent variables; and e is the error.

Then, the model relating the pNPC activity with the independent process variables, temperature and pH, was fitted to a second-order polynomial, Eq. (2).

$$Y = 410.425 + 9.741A + 108.53B - 0.104A2 - 11.55B2 + 0.0987AB + e$$
(2)

Avicelase Assay

The exoglucanase activity against insoluble substrate was determined using as substrate 1% Avicel dissolved in 50 mM citrate buffer, pH 5.0. Samples and controls were incubated at 50°C for 120 min and agitated every 20 min. The amount of reducing sugars was determined using DNS reagent as described by Wood and Bhat [54].

Enzymatic Activity Against Soluble Substrate

Activity against *p*-NP- β -D-cellobioside (Sigma, USA) was determined at pH 5.0. An aliquot (0.1 ml) of 25 mM of substrate stock solution prepared in 0.05 M citrate buffer, pH 5.0, was mixed with 0.1 ml of enzyme diluted in the same buffer. The reaction mixture was heated at 50°C for 30 min, after which 1.5 ml of 1 M sodium carbonate solution was added to it [16]. The absorbance at 410 nm was measured on a spectrophotometer against a substrate blank that was prepared and incubated in the same way as the sample with enzyme, except the citrate buffer (0.1 ml) was added to the blank solution instead of enzyme [9, 10, 44]. A *p*-nitrophenol standard curve was constructed to determine the concentration (μ M) of the substrate released at 410 nm. All activities were expressed in enzyme units (U); that is, one unit of activity corresponded to the quantity of enzyme hydrolyzing 1 µmol of substrate or releasing 1 µmol of reducing sugars (in glucose equivalents) per minute under the assay conditions [6, 7].

Protein Concentration Measurements, SDS–PAGE, and PhastGel Gradient Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Protein concentrations of total and purified enzymes were measured using the Bio-Rad protein assay according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories). The assay was based on the method of Bradford [9] and used bovine serum albumin (Sigma) as the reference standard.

Protein samples were separated and analyzed by SDS–PAGE performed as described by Laemmli [32] and the oligomeric state of purified CBHI was inspected using 8–25% gradient native PhastGel [46]. The SDS–PAGE gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories) and distained with 10% acetic acid, whereas PhastGel electrophoresis media were stained with 0.1% PhastGel Blue R-350 solution [46] and distained with 30% methanol and 10% acetic solution in distilled water (3:1:6).

Isoeletric Focusing (IEF)

Isoelectric focusing was performed on a PhastSystem [46] using PhastGel IEF media covering the pH intervals of 3-9. The PhastGel IEF media contains Pharmalyte carrier ampholytes, which generate a stable, linear pH gradient across the entire pH range. Separations took about 30 min, after which the gel was stained with 0.02% PhastGel Blue R-350 [46] solution containing 30% methanol and 10% acetic acid in distilled water and 0.1% (w/v) CuSO₄; fixed with 20% trichloroacetic acid; and distained in a solution containing 30% methanol and 10% acetic acid in distilled water until the background was clear.

Small-Angle X-Ray Scattering (SAXS)

Small-angle X-ray scattering data were acquired with ThCBHI at 45 mM concentration at the D02A-SAXS2 beamline of the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil). Measurements were performed using a monochromatic X-ray beam with a wavelength of λ =1.488 Å and the X-ray patterns were recorded using a twodimensional CCD detector (MarResearch, USA). The sample-detector distance was set at 1.200 mm, resulting in a scattering vector range of 0.013-0.027 Å⁻¹, where q is the magnitude of the q-vector defined by $q = 4\pi/\lambda \sin\theta$ (20 is the scattering angle). The samples, in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, were centrifuged for 30 min at 23,500 $\times g$, at 4°C to remove any aggregates and then placed on ice. For SAXS measurements, samples were placed in a 1 mm pathlength cell with mica windows at 10°C. Two successive frames of 300 s each were recorded for each sample to monitor radiation damage and beam stability. Buffer scattering was recorded prior to sample data collection. The SAXS patterns were individually corrected for the detector response and scaled by the incident beam intensity and the samples absorption. After buffer scattering subtraction, protein SAXS patterns were integrated using Fit2D software [23] and scaled by protein concentration.

The molecular weights of *Th*CBHI and its CCD were calculated using a novel procedure [20], implemented as a Web tool SAXS MoW (http://www.ifsc.usp.br/~saxs/). This procedure to calculate the molecular weight and consequently the protein oligomerization state in solution does not require the measurement of SAXS intensity on an absolute scale and does not involve a comparison with the other SAXS curves determined from known standard proteins.

811 Colussi et al.

Purification steps	Protein (mg)	Specific avicelase activity (U/mg)	Specific <i>p</i> NPC activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme DEAE-Sephadex A50	205 67	$\begin{array}{c} 0.098 \pm 0.007 \\ 1.25 \pm 0.09 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0.122 \pm 0.02 \\ 1.53 \pm 0.20 \end{array}$	1.00 12.54	100 32.68

Table 2. Purification steps of *Th*CBHI, and its activities against Avicel and *p*NPC.

Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy

Purified *Th*CBHI was resuspended in 20 mM phosphate buffer, pH 5.0. Far-UV CD spectra were measured using a quartz 0.1-cm-pathlength cell at 25°C and protein concentration of 1.5 μ M, in a Jasco J-720 spectropolarimeter (Jasco Co.). The protein far-UV spectra were recorded over a wavelength range of 190–260 nm by signal averaging of 8 spectra. The instrument was set at scanning speed of 100 nm/min and step resolution of 1 nm. The protein signal was obtained by subtracting buffer spectrum from the sample spectrum.

The intrinsic fluorescence measurements of *Th*CBHI were performed in a quartz 10×2 mm cell at 25°C, using a K2 Multifrequency Phase Fluorometer (ISS Inc.) equipped with a temperature control water bath RTE-111 (Thermo-Neslab). Emission spectra in the range of 300–450 nm were recorded using an excitation wavelength of 295 nm. The fluorescence emission spectra of *Th*CBHI at a concentration of 1.5 µM were monitored at a scanning interval of 1 nm and integration time of 1 s. After each measurement, the spectrum was corrected for buffer (20 mM phosphate buffer, pH 5.0) contribution.

Homology Model

The *Th*CBHI homology model was built based on the primary structure of the enzyme by I-Tasser [55]. The secondary structure content of the model was analyzed by Porter [39]. Accessible solvent area for each tryptophan residue was computed using the Areaimol program (CCP4-Packages\ccp4-6.1.3\html\areaimol.html) [4].





SDS–PAGE gel. Lane MW, molecular weights of bovine albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), and carbonic anhydrase (29 kDa) (Sigma). Lane 1, crude extract obtained after 144 h of growth in a stirred fermenter in the presence of Avicel. Lane 2, *Th*CBHI eluted with 25 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Lane 3, *Th*CBHI eluted with 100 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Lane 4, catalytic core domain of *Th*CBHI after digestion of the enzyme with papain (Sigma).

RESULTS

Purification and Identification of ThCBHI

Following *T. harzianum* IOC-3844 cultivation in a stirred fermenter for 144 h, the protein concentration and cellulase activities toward Avicel were measured in the crude extract. One-step chromatography using a DEAE-Sephadex A-50 column was efficient for eluting an exoglucanase in the presence of buffer A and 0.10 M NaCl and releasing a fraction with the highest activity against Avicel (Table 2). SDS–PAGE gel analysis showed that the purified fraction contained one major protein band of molecular mass of approximately 66 kDa (Fig. 1).

The purified enzyme *Th*CBHI was subjected to further mass spectrometry analysis to determine the peptide mass fingerprint. Mass spectrometry analysis of the 66 kDa protein digested with trypsin generated MS/MS data, which were transferred to Mascot for MS/MS ion search (available from: http://www.matrixscience.com/). The results of the search showed that the peptide profiles were consistent with the deduced amino acid sequence of *Th*CBHI, thus confirming the identity of the purified protein (Fig. 2).

Determination of Optimal pH and Temperature for ThCBHI Activity

The results obtained based upon the experimental CCRD (Table 3) were analyzed by a multiple regression procedure.

1	MYRKLAVISA	FLAAARAQQV	CTQQAETHPP	LTWQKCTASG	CTPQQGSVVL
51	DANWRWTHDT	KSTTNCYDGN	TWSSTLCPDD	ATCAKNCCLD	GANYSGTYGV
101	TTSGDALTLQ	FVTASNVGSR	LYLMANDSTY	QEFTLSGNEF	SFDVDVSQLP
151	CGLNGALYFV	SMDADGGQSK	YPGNAAGAKY	GTGYCDSQCP	R DLKFINGQA
201	NVEGWEPSSN	NANTGVGGHG	SCCSEMDIWE	ANSISEALTP	HPCETVGQTM
251	CSGDSCGGTY	SNDR YGGTCD	PDGCDWNPYR	LGNTSFYGPG	SSFALDTTKK
301	LTVVTQFATD	gsisr yyvon	GVK FQQPNAQ	VGSYSGNTIN	TDYCAAEQTA
351	FGGTSFTDKG	GLAQINKAFQ	GGMVLVMSLW	DDYAVNMLWL	DSTYPTNATA
401	STPGAKR GSC	STSSGVPAQV	EAQSPNSKVI	YSNIR FGPIG	STGGNTGSNP
451	PGTSTTRAPP	SSTGSSPTAT	QTHYGQCGGT	GWTGPTRCAS	GYTCQVLNPF
501	YSOCL				

Fig. 2. The sequence of *Th*CBHI deposited at the NCBI database (gi|50400675) and peptides derived from trypsin digestion of the 66 kDa SDS–PAGE band analyzed by mass spectrometry (in bold and underlined).

	Factors		Response		
Run	Temperature (°C)	pН	<i>p</i> NPC activity (U/ml)		
1	30	3	25		
2	30	7	3.8		
3	70	3	6.9		
4	70	7	1.5		
5	21.8	5	12.70		
6	78.2	5	8.40		
7	50	2.18	3.50		
8	50	7.82	0		
9	50	5	95.20		
10	50	5	95		
11	50	5	95.40		

The statistical analysis of the regression model, at the confidence level of 95%, showed that the model was reliable in predicting the *p*NPC activity with Probe>F less than 0.05. The coefficient of determination ($R^2 = 0.994$) indicates that the sample variation of 99.4% for *p*NPC activity is attributed to the independent variables (T and pH) and only 0.6% of the total variations are not explained by the model. The corresponding analysis of variance (ANOVA) is summarized in Table 4.

The response surface methodology (RSM) showed that the optimal CBHI activity against *p*NPC (95.20 U/ml) was reached at 50°C and pH of 5.0, with fixed reaction time of 30 min. Moreover, it also demonstrated that variations of temperature between 45°C and 55°C and of pH between 4.5 and 5.5 do not lead to significant changes of the *Th*CBHI enzymatic activity (Fig. 3A and Fig. 3B). On the other hand, it became clear that at pH 5.0, significant changes of temperature to 78.2°C or 21.8°C led to strong decrease in the enzyme activity to less than 9% of its optimal value. Similar behavior of the enzyme was observed at 50°C promoted by pH changes to 2.18 or 7.82 (Table 3). At the same time, *Th*CBHI specific activity against Avicel and *p*NPC under optimal conditions (50°C and pH 5.0) was measured as 1.25 U/mg and 1.53 U/mg, respectively.

Isoelectric Focusing of ThCBHI

To further characterize the enzyme, we measured its isoelectric point as described in the Materials and Methods



Fig. 3. Results derived from response surface model. **A.** Response surface as a function of temperature and pH for *p*NPC activity. **B.** Contour curve as a function of temperature and pH for *p*NPC activity. In both cases, over 80% of the optimal enzymatic activity value is observed in the temperature range between 45° C and 55° C and pH interval between 4.5 and 5.5. The optimal enzymatic activity corresponds to the temperature of 50°C and pH of 5.0 (the centers of the response surface and contour curve graphs).

section. The observed *Th*CBHI pI was calculated using a nonlinear regression equation (pI = -0.1508x + 9.4565) obtained after separation of the sample on the PhastGel IEF (Fig. 4A). The experimentally determined *Th*CBHI isoelectric point is approximately 5.23 (Fig. 4B).

Separation of ThCBHI Domains by Limited Proteolysis

The proteolitically cleaved *Th*CBHI (CCD) has considerably higher mobility than the purified full-length native *Th*CBHI

Table 4.	Result	of ANO	VA.
----------	--------	--------	-----

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F-Value	Prob>F
Model	17,042.70	5	3,408.54	161.08	0.000016
Error	108.38	5	21.16		
Total	17,151.08	10			

 R^2 = coefficient of determination = 0.994.

Prob>F-value less than 0.05 is significant.

df = degrees of freedom.

Α




A. Standard pI curve constructed using Pharmacia broad pI standards: lentil lectin, basic, pI 8.65; lentil lectin, middle, pI 8.45; lentil lectin, acidic, pI 8.15; myoglobin, basic band, pI 7.35; myoglobin, acidic band, pI 6.85; human carbonic anhydrase B, pI 6.55; bovine carbonic anhydrase B, pI 5.85; β -lactoglobulin A, pI 5.20; trypsin inhibitor, pI 4.55; amylglucosidase, pI 3.50. **B**. PhastGel IEF 3-9. Lane 1, purified *Th*CBHI. Lane 2, Pharmacia broad pI standards.

in the 8–25% gradient native PhastGel, thus revealing that the purified protein was successfully digested (Fig. 5, Lines 1 and 2, respectively). The molecular masses of the full-length *Th*CBHI and its CCD in solution were determined, respectively, as 46.7 kDa and 43 kDa using SAXS MoW [14], which is close to the theoretical values of 53 kDa and 47.3 kDa predicted based on the known amino acid sequence of the enzyme.

We also determined the enzymatic activity of CCD against insoluble (Avicel) and soluble (*p*NPC) substrates, and the results of our experiments show clear differences in activities of the full-length *Th*CBHI and its CCD against Avicel. *Th*CBHI specific activity at 50°C and pH 5.0 against the



Fig. 5. Proteolytic digestion of *Th*CBHI: 8–25% gradient native PhastGel electrophoresis of purified *Th*CBHI before and after papain digestion.

Lane M: molecular weight standards; Lane 1, purified *Th*CBHI digested with 0.2 mg/ml of papain (Sigma); Lane 2, full-length native *Th*CBHI.

latter substrate were, correspondingly, 1.42 U/mg (the fulllength enzyme) and 0.77 U/mg (*Th*CBHI CCD), and to *p*NPC the specific activities were 1.53 U/mg and 1.48 U/mgfor the full-length enzyme and *Th*CBHI CCD, respectively.

Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy

We applied circular dichroism spectroscopy to study the *Th*CBHI secondary structure. The far UV CD spectrum of *Th*CBHI at 25°C did not display a negative band around 222 nm, indicating a relatively low content of α -helical





A. CD spectra of *Th*CBHI at concentration of 1.5 μ M in 20 mM phosphate buffer (pH 5.0). The spectra were recorded at 25°C from 190 to 260 nm in a quartz 1 mm pathlength cuvette using a Jasco J-720 spectropolarimeter as an average of 8 scans. **B**. Models generated using the I-Tasser program for the catalytic core domain (CCD) and cellulose binding module (CBM) of *Th*CBHI, showing tryptophan side chains.



Fig. 7. *Th*CBHI intrinsic fluorescence spectrum using the excitation wavelength of 295 nm and protein concentration of $1.5 \,\mu$ M, in 20 mM phosphate buffer, pH 5.0.

The emission spectra of *Th*CBHI were recorded with a 1 nm scan interval and 1 s of integration time. Experiments were carried out in a 10×2 mm fluorescence cuvette, at 25°C, and corrected for buffer contribution.

elements in its secondary structure (Fig. 6). Analysis of the CD spectrum by the CONTINLL program software package [43] revealed that the amounts of α -helices and β -strands are 28% and 38%, respectively. These results are also in reasonable agreement with the homology model of *Th*CBHI, which has 16% α -helixes and 31% β -strands as analyzed by Porter, a protein secondary structure prediction server [39] (Fig. 6B).

The tertiary structure of ThCBHI was further studied by tryptophan intrinsic fluorescence. The ThCBHI emission spectrum showed a maximum fluorescence at 337 nm (pH 5.0) upon excitation at 295 nm (Fig. 7A). In an attempt to better comprehend the experimental data, we computed the area accessible to solvent of each tryptophan residue present in the molecule. ThCBHI (Fig 7B) has nine tryptophan residues located at the CCD (W33, W54, W56, W72, W205, W229, W276, W380, W389) and one tryptophan residue (W482) positioned within the CBM of ThCBHI (Fig. 7B). The calculations of the tryptophan solvent accessed areas demonstrate that five ThCBHI tryptophan residues [W54 (50.20 A²), W56 (119.00 A²), W380 (50.10 A²), W389 (44.60 A²), and W482 (82.10 A²)] are exposed to the solvent, whereas five others [W33 (5.90 A^2), W72 (14.40 A²), W205 (29.90 A²), W229 (1.80 A²), and W276 (0.00 A^2)] are totally or partially buried inside the protein core and are inaccessible to solvent. Such overall tryptophan accessibility is consistent with the intermediate emission maximum of 337 nm measured for the native ThCBHI intrinsic fluorescence.

DISCUSSION

The production of second-generation ethanol from lignocellulosic biomass imposes significant challenges on

cellulase preparations. Although the purification and characterization of a number of exoglucanases have been reported [21, 22, 29, 30, 42, 50], there is still a considerable need for novel suitable enzymes. In line with this challenge, we aimed here to purify a new fungal GH-7 family cellulase from cellulolytically competent *Trichoderma harzianum* IOC-3844 strain and to characterize its biochemical and biophysical properties.

Purification of the *Th*CBHI enzyme to apparent homogeneity was accomplished by a simple one-step procedure. The yield of purification (32.7%) was in the range of the yields obtained by others (23% to 44%) in purifications of similar enzymes, including *Tr*CBHI [1, 5, 58].

*Th*CBHI runs as a 66 kDa band, as revealed by SDS– PAGE analysis (Fig. 1), which is somewhat higher than its theoretically predicted molecular mass (53 kDa). This is not unusual for *Trichoderma* cellobiohydrolases. For comparison, the theoretical molecular mass of *Tr*CBHI computed from its amino acid sequence is 52 kDa, whereas the value observed in the SDS–PAGE analysis is close to 66 kDa [8]. The difference between these two values presumably is due to the glycosylation of the enzyme [46].

The *Th*CBHI is monomeric in solution, since its molecular weight obtained from SAXS data is close to theoretically predicted MW for monomers of the enzyme.

Strong enzymatic activity against Avicel and *p*NPC (Table 2) and mass spectrometry analysis of the fragments of its amino acid sequence (Fig. 2) confirmed that the purified enzyme is indeed *T. harzianum* CBHI. Furthermore, the optimal temperature and pH for the purified enzyme activity was found to be 50°C and 5.0, respectively (Table 3), conditions close to those previously observed for other cellobiohydrolases [22, 33, 42, 58]. This information might be useful for possible biotechnological applications of the enzyme, since optimization of variables such as temperature and pH is crucial for process efficiency and costs reduction [2].

The experimental isoelectric point of the intact *Th*CBHI (pI=5.23) is slightly higher than the value predicted theoretically for *Th*CBHI (gi|50400675) by the ProtParam tool (pI = 4.8) [11]. The difference might be attributed to surface charge distribution influenced by the glycosylation of the protein [30]. The pI <5.5 is common for the *Trichoderma reesei* cellulases, imprinting the acid character to these glycoproteins [4, 13].

We also performed papain proteolytic cleavage to separate the cellulose-binding module from the catalytic core domain of the enzyme and measured the specific activity of CCD against Avicel and pNPC substrates. Enzymatic activity of *Th*CBHI CCD against Avicel is lower than that of the full-length enzyme, whereas its activity against pNPC is almost fully preserved. Several researchers have shown that removal of the CBM of cellulases reduces the hydrolytic activity of the catalyst

815 Colussi et al.

module on insoluble crystalline substrate such as Avicel, filter paper, and cotton, whereas its activity on soluble or amorphous cellulose is practically not affected [3, 28, 35, 41, 52]. This illustrates the importance of CBM for hydrolysis of insoluble crystalline substrates and its functional neutrality for the enzyme cleavage of soluble substrates. The experimental molecular weight of this domain in solution, computed using SAXS MoW [20], is close to the theoretical molecular weight of CCD, thus indicating that, similarly to the full-length enzyme, it forms monomers in solution.

Our biophysical investigations show that the general shape of the CD spectrum for *Th*CBHI (Fig. 6) is characteristic of β -rich proteins, which is compatible to the secondary structure already described for others cellobiohydrolases [31, 37]. The secondary structure composition of *Th*CBHI, based on CD data, is broadly similar to that of CBHI from *T. reesei* [51] as well as to the secondary structure content of our homology model of the enzyme (Fig. 7B). This indicates that the overall fold of the protein is presumably grossly similar to that of *T. reesei* CBHI.

The emission spectrum of the tryptophan side chain is very sensitive to its environment and can provide useful information about the protein native state. It is known that the emission maximum of tryptophan residues exposed to water has a red-shift to approximately 350 nm, whereas the tryptophan residues concealed in hydrophobic core regions of proteins have the emission maximum shifted to a blue region of the spectrum with the wavelength as low as 308 nm [19]. Intrinsic fluorescence of *Th*CBHI revealed an intermediate emission maximum of 337 nm for tryptophan residues, which is presumably caused by the fact that, according to our *Th*CBHI homology model, roughly half of the tryptophans present in the structure are exposed to solvent, whereas the other half is hidden in the hydrophobic protein matrix.

In conclusion, *Trichoderma harzianum* cellobiohydrolase I and its catalytic core domain were purified and characterized by mass spectrometry, SAXS, CD, and fluorescence techniques. Their enzymatic, activities against soluble (*pNPC*) and insoluble (Avicel[®]) substrates were determined, revealing the enzyme's potential for biotechnological applications. This work sets the stage for more detailed structural and functional investigations of this enzyme.

Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian Agencies: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support *via* grant #2008/56255-9; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for support *via* grants 490022/20090, 471834/2009-2, and 550985/2010-7; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Aboul- Enein, F. A., E. Serour, and T. Hussein. 2010. Purification and characterization of a novel thermoactive cellulase from thermophilic actinomycetes isolated from soil sample of Egypt. *Int. J. Acad. Res.* 2: 81–86.
- Aden, A., M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechura, K. Neeves, J. Sheehan, et al. 2002. Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover. National Renewable Energy Laboratory Golden, Colorado.
- 3. Arantes, V. and J. N. Saddler. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis. *Biotech. Biofuels* **3**: 1–11.
- Bailey, S. 1994. The CCP4 suite : Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr: D Biol. Crystallogr.* 50: 760– 763.
- Bakare, M. K., I. O. Adewale, A. Ajayi, A. I. Okoh, and O. O. Shonukan. 2005. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens. African J. Biotechnol.* 4: 898–904.
- 6. Biochemistry IUo. 1961. *Report of the Commission on Enzymes*. Pergamon Press Oxford.
- 7. Biochemistry IUo. 1965. *Enzyme Nomenclature: Recommendations* 1964 of the International Union of Biochemistry. Elsevier. Amesterdam.
- Boer, H., T. T. Teeri, and A. Koivula. 2000. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase CeI7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. *Biotech. Bioeng.* 69: 486–494.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* 37: D233–D238.
- Carpita, N. C. and D. M. Gibeaut. 1993. Structural models of primary-cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the wall during growth. *Plant J.* 3: 1–30.
- Castro, A., M. C. Ferreira, J. Cd. Cruz, K. C. R. Pedro, D. F. Carvalho, S. G. F. Leite, and N. Pereira Jr. 2010. High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. *Enzyme Res.* doi:10.4061/2010/854526.
- Claeyssens, S., A. Lavoinne, M. Freselragot, B. Bois-Joyeux, M. Chanez, and J. Peret. 1990. Metabolic changes in rats fed a low protein-diet during post-weaning growth. *Metabol. Clin. Exp.* **39:** 676–681.
- Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Rev* Molec. Cell Biol. 6: 850–861.
- Davies, G. and B. Henrissat. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3: 853–859.

- Deshpande, M. V., K. E. Eriksson, and L. G. Pettersson. 1984. An assay for selective determination of exo-1,4,-beta-glucanase in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 138: 481– 487.
- Divne, C., J. Stahlberg, T. Reinikainen, L. Ruohonen, G. Petterson, J. K. C. Knowles, *et al.* 1994. The 3-dimensional crystal-structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265: 524–528.
- Divne, C., J. Stahlberg, T. T. Teeri, and J. T. Alwyn. 1998. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 angstrom long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. J. Molec. Biol. 275: 309–325.
- Eftink, M. R. 2000. Use of fluorescence spectroscopy as thermodynamics tool. *Energ. Biol. Macromolec.* 323: 459–473.
- Fischer, H., M. Oliveira Neto, H. B. Napolitano, I. Polikarpov, and A. Craievich. 2010. The molecular weight of protein in solution can be determined for a single SAXS measurement on a relative scale. *J. Appl. Crystallogr.* 43: 101–109.
- Gama, F. M., J. A. Teixeira, and M. Mota. 1994. Cellulose morphology and enzymatic reactivity: A modified solute exclusion technique. *Biotechnol. Bioeng.* 43: 381–387.
- Gusakov, A. V., A. P. Sinitsyn, T. N. Salanovich, F. E. Bukhtojarov, A. V. Markov, B. B. Ustinov, *et al.* 2005. Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense*. *Enzyme Microbial Technol.* 36: 57–69.
- 23. Hammersley, A. P. 1997. *FIT2D: An Introduction and Overview*. ESRF Internal Report.
- Henrissat, B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. *Biochem. J.* 280: 309–316.
- Henrissat, B. 1994. Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose* 1: 169–196.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. *Biochem. J.* 293: 781–788.
- Himmel, M. E., S. Y. Ding, D. K. Johnson, W. S. Adney, M. R. Nimlos, J. W. Brady, and T. D. Foust. 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 316: 804–807.
- Irwin, D. C., M. Spezio, L. P. Walker, D. B. Wilson. 1993. Activity studies of 8 purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 1002–1013.
- 29. Jager, G., Z. J. Wu, K. Garschhammer, P. Engel, T. Klement, R. Rinaldi, *et al.* 2010. Practical screening of purified cellobiohydrolases and endoglucanases with alpha-cellulose and specification of hydrodynamics. *Biotechnol. Biofuels* **3**: 18.
- Jeoh, T., W. Michener, M. E. Himmel, S. R. Decker, and W. S. Adney. 2008. Implications of cellobiohydrolase glycosylation for use in biomass conversion. *Biotechnol. Biofuels* 1: 10.
- 31. Kraulis, P. J., G. M. Clore, M. Nilges, T. A. Jones, G. Pettersson, J. Knowles, and A. M. Gronenborn. 1989. Determination of the 3-dimensional solutions structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*: A study using nuclear magnetic ressonance and hybrid distance geometry dynamical simulated annealing. *Biochemistry* 28: 7241–7257.
- 32. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structrural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–691.

- Lahjouji, K., R. Storms, Z. Xiao, K. B. Joung, Y. Zheng, J. Powlowski, *et al.* 2007. Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 337–346.
- Mandels, M. and J. Weber. 1969. Production of cellulases. Adv. Chem. Series 95: 391–398.
- Mansfield, S. D., C. Mooney, and J. N. Saddler. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Progress* 15: 804–816.
- Margeot, A., B. Hahn-Hagerdal, M. Edlund, R. Slade, F. Monot, et al. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 372–380.
- 37. Munoz, I. G., W. Ubhayasekera, H. Henriksson, I. Szabo, G. Pettersson, G. Johansson, *et al.* 2001. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: Crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 angstrom resolution and homology models of the isozymes. *J. Molecul. Biol.* 314: 1097–1111.
- Nieves, R. A., C. I. Ehrman, W. S. Adney, R. T. Elander, and M. E. Himmel. 1998. Survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 301–304.
- Pollastri, G. and A. McLysaght. 2005. Porter: A new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics* 21: 1719–1720.
- Prasad, S., A. Singh, and H. C. Joshi. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recycl.* 50: 1–39.
- Raghothama, S., P. J. Simpson, L. Szabo, T. Nagy, H. Gilbert, and M. P. Williamson. 2000. Solution structure of the CBM10 cellulose binding module from *Pseudomonas* xylanase A. *Biochemistry* 39: 978–984.
- Shin, K., Y. H. Kim, M. Jeya, J. K. Lee, and Y. S. Kim. 2010. Purification and characterization of a thermostable cellobiohydrolase from *Fomitopsis pinicola*. J. Microbiol. Biotechnol. 20: 1681–1688.
- Sreerama, N. and R. W. Woody. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287: 252–260.
- Stahlberg, J., C. Divne, A. Koivula, K. Piens, M. Claeyssens, T. T. Teeri, *et al.* 1996. Activity studies and crystal structures of catalytically deficient mutants of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei. J. Molec. Biol.* 264: 337–349.
- Stahlberg, J., G. Johansson, and G. Pettersson. 1991. A new model for enzymatic hydrolysis of cellulose based on the 2domains structure of cellobiohydrolase-I. *Biotechnology* 9: 286–290.
- 46. Stals, I., K. Sandra, S. Geysens, R. Contreras, J. Van Beeumen, M. Claeyssens, *et al.* 2004. Factors influencing glycosylation of *Trichoderma reesei* cellulases. I: Postsecretorial changes of the *O*- and *N*-glycosylation pattern of Cel7A. *Glycobiology* 14: 713–724.
- Tarentino, A. L. and T. H. Plummer Jr. 1994. Deglycosylation of asparagine-linked glycans: Purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enz.* 230: 44–57.
- Teeri, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* 15: 160–167.

817 Colussi et al.

- Teeri, T. T., A. Koivula, T. Reinikainen, L. Ruohonen, M. Srisodsuk, C. Divne, *et al.* 1994. Hydrolysis of crystaline cellulose by native and engineered *Trichoderma reesei* cellulases. *Abstr. Papers Am. Chem. Soc.* 207: 21-AGFD.
- Valaskova, V. and P. Baldrian. 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*: Production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152: 3613–3622.
- von Ossowski, I., J. Stahlberg, A. Koivula, K. Piens, D. Becker, H. Boer, *et al.* 2003. Engineering the exo-loop of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase, Ce17A. A comparison with *Phanerochaete chrysosporium* Cel7D. J. Molec. Biol. 333: 817–829.
- Wang, L. S., J. Liu, Y. Z. Zhang, Y. Zhao, and P. J. Gao. 2003. Comparison of domains function between cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 by limited proteolysis. *J. Molec. Catal. B Enzymatic* 24: 27–38.
- Wolfenden, R. and M. J. Snider. 2001. The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts. *Accounts Chem. Res.* 34: 938–945.

- Wood, T. M. and K. M. Bhat. 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Methods Enz.* 160: 87–112.
- Wu, S. T., J. Skolnick, and Y. Zhang. 2007. *Ab initio* modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. *BMC Biol.* 5: 17.
- Zhang, Y. H. P., M. E. Himmel, and J. R. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24: 452–481.
- Zhang, Y. H. P. and L. R. Lynd. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol. Bioeng.* 88: 797–824.
- Zhou, J., Y. H. Wang, J. Chu, Y. P. Zhuang, S. L. Zhang, and P. Yin. 2008. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresour. Technol.* **99:** 6826–6833.