UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JAQUELINE PESCIUTTI EVANGELISTA

**“Estudos moleculares das enzimas Fosfoseril-tRNA Kinase de *Trypanosoma*
brucei e *Leishmania major* e Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei*”**

São Carlos
2009

JACQUELINE PESCIUTTI EVANGELISTA

“Estudos moleculares das enzimas Fosfoseril-tRNA Kinase de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* e Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada – opção Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

São Carlos
2009

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

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

Evangelista, Jaqueline Pesciutti

Estudos moleculares das enzimas Fosfoseril-tRNA Kinase de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* e Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei*. / Jaqueline Pesciutti Evangelista; orientador Otavio Henrique Thiemann.-- São Carlos, 2009.

111 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Física Aplicada: Opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Proteínas. 2. Selenocisteína. 3. Kinetoplastida. I. Título.

**UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jaqueline Pesciutti Evangelista

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovada em: 15/07/2009

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Marcia Aparecida Silva Graminha

Instituição: UNESP

Assinatura

Prof. Dr. Júlio Cesar Borges

Instituição: IQSC/USP

Assinatura

**Àqueles que mais amo: Samuel meu esposo,
Mariah minha filha a caminho e meus pais Luiz e Maria do Carmo.**

**“Não existe caminho para a felicidade.
A felicidade é o caminho.” (Mahatma Gandhi)**

AGRADECIMENTOS

Considero que a elaboração de uma dissertação de mestrado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e *stress* seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho tivesse esses resultados apresentados. A todas elas registro minha gratidão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Otavio H. Thiemann, que tive a oportunidade de conhecer durante a graduação e desde lá vem me apoiando e acreditando no meu potencial, mesmo nas muitas vezes que entrei em sua sala chorando, desesperada, ele sempre tinha um novo caminho pra me mostrar. Uma excelente pessoa e um exemplo de pesquisador e orientador a ser seguido. A você Otavio meus irrestritos agradecimentos.

Aos professores do Grupo de Cristalografia Prof. Dr. Adriano Andricopulo, Prof. Dr. Eduardo Catellano, Prof. Dr. Eduardo Horjales, Prof. Dr. Glaucius Oliva, Prof. Dr. Igor Polikarpov, Prof^a. Dr^a. Ilana Camargo, Prof. Dr. Javier Ellena, Prof. Dr. Richard Garrat e Prof^a. Dr^a. Yvone Mascarenhas e a todos os funcionários Augusto, Bianca, Fernando, Geraldo, Luciana, Mariana e Susana por todo o apoio, contribuição e ensinamentos que recebi durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Antônio José da Costa Filho, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ulian de Araújo e Prof^a. Dr^a. Heloísa Silestre de Araújo pelo auxílio e colaboração prestados. E a todos os professores e corpo técnico do Grupo de Biofísica por permitirem a realização de alguns experimentos deste trabalho em seu grupo.

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

Aos amigos do grupo de Cristalografia, do IFSC e das monitorias que sempre me ajudaram diretamente ou indiretamente. Em especial, a Monique, Sur, Lir, Mamé, Livia Manzine, Fer Costa, Amanda, Maria, Kelven, Caqui, Napoleão, Simone, Alexandre, Carol Guzzi, José Ribamar e Cecília que sempre disponíveis a me ajudar, tirando uma plaquinha de final de semana, corando um gel, ouvindo meus desabafos, tentando arrumar meu computador, me ensinando a usar algum equipamento ou programa e ultimamente agüentando minhas reclamações, enjões e “pitis”, vocês foram e são imprescindíveis na minha vida.

À Livia Manzine e Maria Amélia Oliva (Mamé) pelo trabalho de revisão do texto e a toda a equipe da biblioteca do IFSC, em especial à Neusa, pela formatação do texto

para que ele estivesse dentro das normas acadêmicas vigentes, também expressei meus agradecimentos.

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

Aos meus familiares Hernani, Janaina, Elisete, Emilia e Sabrina que tantas vezes compreenderam minha ausência.

Aos meus pais, meus maiores mestres.

Ao Samuel, meu marido, companheiro, amigo e grande amor por apoiar minhas decisões, mesmo sem compreendê-las, compartilhar comigo sua vida, por todo o apoio, compreensão, confiança, companheirismo e ajuda dedicada. Obrigado por fazer parte da minha vida, entender os momentos de ausência, me ajudar em alguns experimentos, principalmente envolvendo o computador e agora mais do que nunca formar comigo uma família.

À minha filha Mariah, que pequenina e inocente participou ativamente do término deste trabalho, ainda em meu ventre.

À Deus por sempre estar ao meu lado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro (Processo nº 06/54306-0).

Resumo

O estudo do processo de tradução no metabolismo celular atrai o interesse de vários grupos, em particular, o estudo do 21^o aminoácido, a selenocisteína. A incorporação da selenocisteína foi descrita em *Escherichia coli* e recentemente em eucariotos. O primeiro passo desta via é iniciado pela Seril-tRNA Sintetase que aminoacila o Ser-tRNA^{Sec} (SelC) com uma serina. Em *E. coli*, o segundo passo é realizado pela Sec-sintetase (Sela) que remove o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário aminoacrilil. Este serve como aceitor de seleno-fosfato gerando a selenocisteína. Em eucariotos, o processo análogo é realizado pela PSTK e pela SepSecS, que fosforila e seleniza a serina respectivamente. Interessados nesta parte da via, iniciamos estudos moleculares das enzimas Fosfoseril-tRNA Kinase de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* e Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei*.

Para o gene da enzima Fosfoseril-tRNA Kinase de *T. brucei* não foi possível obter um clone sem mutação. Já o gene da enzima Fosfoseril-tRNA Kinase de *L. major* foi clonado em vetor pET28 e a enzima foi expressa em células de *E. coli* porém com baixo rendimento impedindo a continuidade dos experimentos planejados. Portanto passou-se a investigar a enzima envolvida no primeiro passo da via, no caso, a Seril-tRNA Sintetase de *T. brucei*. Esta já se encontrava clonada e expressando em *E. coli* na fração solúvel. A proteína recombinante foi purificada com precipitação com 60% de sulfato de amônio e resinas de hidrofobicidade e de afinidade por níquel. Experimentos de gel nativo, DLS e fluorescência de anisotropia revelaram que, após a purificação, a enzima permanece estável e livre de agregações, possuindo um raio hidrodinâmico de 4,32nm e massa molecular de 110kDa. Acima de 150nM de proteína, ela encontra-se inteiramente na forma dimérica. Estabelecidos estes parâmetros, informações sobre a ligação com o Ser-tRNA^{Sec} poderão ser obtidos a partir da técnica de anisotropia de fluorescência visto que experimentos iniciais realizados com a SerRS adicionando-se o Ser-tRNA^{Sec} mostraram-se promissores.

Palavras-chave: Proteínas. Selenocisteína. Kinetoplastida.

Abstract

The translation process study is central role in the cellular metabolism and attracts the interest of several groups, in particular, the study of the 21^o amino acid, the selenocystein. The selenocystein incorporation pathway was described in *Escherichia coli* and recently in eukaryotes. The first step of this pathway is initiated by Seryl-tRNA Synthetase that aminoacylates the Ser-tRNA^{Sec} (SELC) with serine. In *E. coli*, the second step is performed by the Sec-synthase (SELA) that removes hydroxyl group of the serine side chain, forming an aminoacrylil intermediary. This serves as an acceptor of seleno phosphate generating the selenocystein. In eukaryotes, the similar process is performed by PSTK and SepSecS, which phosphorylate serine and adds the selenium, respectively. Interested in this pathway, we performed initial molecular studies of the Phosphoseryl-tRNA synthetase of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major* and Seryl-tRNA synthetase of *Trypanosoma brucei*.

The gene that encodes *T. brucei* Phosphoseryl-tRNA synthetase was obtained with several mutations. However, the gene encoding the *T. brucei* Phosphoseryl-tRNA synthetase was cloned into pET28 vector and the enzyme was expressed in *E. coli* cells, however at low amounts hampering the intended experiments. Therefore we initiated the investigation of the enzyme involved in the first step of this pathway, the Seryl-tRNA Synthetase from *T. brucei*. The enzyme was already cloned and expressing in the soluble fraction of *E. coli*. The recombinant protein was purified using 60% ammonium sulfate precipitation, hydrophobic and nickel affinity chromatography. Native gel experiments, DLS and anisotropy fluorescence was performed and allowed to conclude that, after purification, the enzyme remains stable and free of aggregation, with a hydrodynamic radius of 4.32 nm, molecular weight of 110kDa. Above 150nM protein it's entirely in the dimeric form. Information about Ser-tRNA^{Sec} binding can now be obtained from the technique of anisotropy seen that initial experiments with SerRS add Ser-tRNA^{Sec} be shown to be promising.

Keywords: Proteins. Selenocysteine. Kinetoplastid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama de um trypanosomatidae típico.	22
Figura 2 - Formas fundamentais dos Trypanosomatidae.	23
Figura 3 - Mecanismo de incorporação de selenocisteínas.	29
Figura 4 - Estrutura do elemento SECIS.	30
Figura 5 - Diagrama do tRNA ^{sec_{uca}} de <i>Escherichia coli</i>	31
Figura 6 - Aminoacilação do tRNA por aaRSs.	33
Figura 7 - Aminoacil-tRNA sintetases.	34
Figura 8 - Vários tRNAs específicos da Seril-tRNA Sintetase.	35
Figura 9 - Etapas envolvidas na síntese de selenocisteínas em <i>Escherichia coli</i>	37
Figura 10 - Possível mecanismo de síntese de selenocisteína em eucariotos.	38
Figura 11 – Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da PSTK de <i>T. brucei</i>	42
Figura 12 - Ciclo da reação de PCR utilizado para a amplificação do gene.	43
Figura 13 - Mapa do vetor pGEM-T.	45
Figura 14 - Mapa do vetor pTZ57R.	46
Figura 15 - Mapa do vetor pEXP5-NT/TOPO.	47
Figura 16 - Verificação da amplificação do gene pstk de <i>T. brucei</i>	50
Figura 17 - Resultado da reação de digestão dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1%.	50
Figura 18 - Resultado da reação de PCR.	51
Figura 19 - Comparação das seqüências do gene pstk de <i>T. brucei</i>	52
Figura 20 - Análise comparativa das seqüências.	52
Figura 21 - Representação da porção coberta por cada oligonucleotídeo no alinhamento.	53
Figura 22 - Ciclo da reação de PCR.	54
Figura 23 - Resultado da amplificação do gene pstk de <i>T. brucei</i>	56
Figura 24 - Resultado da reação de PCR para amplificação do gene pstk.	57
Figura 25 – Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da PSTK de <i>L. major</i>	59
Figura 26 - Ciclo da reação de PCR utilizado para a amplificação do gene.	60
Figura 27 - Mapa do vetor pET28a.	64
Figura 28 - Verificação da amplificação do gene pstk de <i>L. major</i>	69
Figura 29 - Análise da reação de digestão dos DNAs plasmidiais.	69
Figura 30 - Representação da porção coberta por cada oligonucleotídeo no alinhamento.	70
Figura 31 - Análise comparativa das seqüências de aminoácidos.	71

Figura 32 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1%.....	72
Figura 33 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1%.....	72
Figura 34 - Análise da expressão da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	73
Figura 35 - Análise da expressão e localização (sobrenadante ou fração insolúvel) da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	73
Figura 36 - Análise da expressão e localização (sobrenadante ou fração insolúvel) da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	74
Figura 37 - Análise da expressão da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	75
Figura 38 - Análise da expressão da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	75
Figura 39 - Análise da expressão da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	76
Figura 40 - Análise da expressão da PSTK de <i>L. major</i> em extratos de <i>E. coli</i>	76
Figura 41 - Análise da frequência de códons raros para expressão em <i>E. coli</i> do gene pstk de <i>L. major</i>	77
Figura 42 – Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da SerRS de <i>T. brucei</i>	79
Figura 43 - Esquema representativo de um experimento de DLS.	83
Figura 44 - Esquema representando a placa de cristalização.	85
Figura 45 - Esquema do Espectrofluorímetro montado em geometria L.....	86
Figura 46 - Espectro de absorção e emissão da sonda fluoresceína	87
Figura 47 - Análise da SerRS em diferentes concentrações de sulfato de amônio.	89
Figura 48 - Análise dos picos resultantes da purificação em resina de phenyl sepharose.	90
Figura 49 - Cromatograma referente a passagem da amostra pela coluna Phenyl Sepharose.....	90
Figura 50 - Resultado da purificação em resina de afinidade por níquel	91
Figura 51 - Resultado do ensaio de DLS utilizando proteína <i>TbSerRS</i>	92
Figura 52 - Gel nativo com gradiente 8 – 25% de poliacrilamida.....	93
Figura 53 - Cromatografia utilizando coluna de <i>desalting</i>	94
Figura 54 - Curva de associação <i>TbSerRS</i> - <i>TbSerRS</i>	95
Figura 55 - Cristais da proteína <i>TbSerRS</i>	96
Figura 56 - Esquema do programa de PCR utilizado para amplificação dos genes dos tRNAs.....	98
Figura 57 - Resultado da amplificação dos genes referentes aos tRNAs	100
Figura 58 - Gráfico de elipicidade em função do comprimento de onda	101
Figura 59 - Curva obtida pela interação <i>TbSerRS</i> -tRNA.....	102
Figura 60 - Transformação de Ser-tRNA ^{Sec} em Sec-tRNA ^{Sec}	104

TABELAS

Tabela 1 - Dados sobre a PSTK de <i>T. brucei</i> extraídos de programas de predição (Expasy)	41
Tabela 2 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene pstk de <i>T. brucei</i>	43
Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene pstk de <i>T. brucei</i>	44
Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene pskt de <i>T. brucei</i> ao vetor de clonagem pGEM-T.....	45
Tabela 5 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene pstk de <i>T. brucei</i> ao vetor de clonagem pTZ57R.	46
Tabela 6 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene pstk de <i>T. brucei</i> ao vetor de clonagem pEXP5NT-TOPO.....	47
Tabela 7 - Seqüência dos oligonucleotídeos internos específicos para o gene pstk de <i>T. brucei</i>	49
Tabela 8 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene pstk de <i>T. brucei</i> com a enzima TITANIUM <i>Taq</i> DNA polimerase.	54
Tabela 9 - Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene pstk de <i>T. brucei</i>	55
Tabela 10 - Dados sobre a PSTK de <i>L. major</i> extraídos de programas de predição (Expasy)	58
Tabela 11 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene pstk de <i>L. major</i>	60
Tabela 12 - Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene pstk de <i>L. major</i>	61
Tabela 13 - Seqüência dos oligonucleotídeos internos específicos para o gene pstk de <i>L. major</i>	63
Tabela 14 - Dados sobre a SerRS de <i>T. brucei</i> extraídos de programas de predição (Expasy)	78
Tabela 15 - Parâmetros utilizados no experimento de DLS.....	83
Tabela 16 - Massas moleculares das proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado no experimento de gel nativo	84
Tabela 17 - Reação para amplificação dos genes de inserção de selenocisteína....	97
Tabela 18 - Reação para transcrição <i>in vitro</i> dos tRNAs a partir dos genes de Inserção utilizando “Kit Megashortscript – Ambion”.....	98
Tabela 19 - Medidas realizadas nos ensaios preliminares de anisotropia de fluorescência da interação <i>TbSerRS</i> -tRNA.	102

LISTA DE ABREVIações

aaRS	– Aminoacil-tRNA Sintetase
AIDS	– Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	– Adenosina monofosfato
ATP	– Adenosina trifosfato
CD	– Dicroísmo circular
cDNA	– DNA complementar
Cys	– Cisteína
dATP	– Adenina desoxirribosídeo trifosfato
DLS	– Espalhamento dinâmico de luz
DNA	– Ácido Desoxirribonucléico
DNDi	– “Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i> ”
dNTP	– Desoxirribonucleosídeos trifosfatados
D.O.	– Densidade ótica
DTT	– Ditionitreitol
<i>E. coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
EDTA	– Ácido etileno diamino tetra acético
His	– Histidina
IPTG	– Isopropil β - D- tiogalactopiranosídeo
kDa	– QuiloDalton
LB	– Meio de cultura Luria Bertani
MW	– Massa molecular
NCBI	– “National Center for Biotechnology Information”
ORF	– Fase aberta de leitura
pb	– Pares de base
PBS	– Tampão fosfato de sódio
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
pI	– Ponto isoelétrico
PSTK	– Fosfoseril-tRNA Kinase
RNA	– Ácido Ribonucléico
RNase	– Ribonuclease
rpm	– Rotações por minuto
SDS	– Detergente dodecil sulfato de sódio

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

Sec – Aminoácido selenocisteína

SECIS – Seqüência de inserção a selenocisteína

SELC - RNA transportador específico para a incorporação de Sec

SELD – Selenofosfato Sintetase

SerRS – Seril-tRNA Sintetase

TAE – Tampão de eletroforese composto por Tris acetato e EDTA

Tris – Hidroximetil-aminometano

Vc – Volume de coluna

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

SUMÁRIO

Capítulo 1	21
1 Introdução.....	21
1.1 Ordem Kinetoplastida.....	21
1.1.1 Família Trypanosomatidae.....	21
1.1.1.1 Gênero <i>Leishmania</i>	24
1.1.1.2 Gênero <i>Trypanosoma</i>	25
1.1.1.2.1 <i>Trypanosoma brucei</i> e a doença do sono.....	25
1.2 Selenoproteínas.....	28
1.2.1 Biossíntese de Selenoproteínas.....	28
1.3 As Aminoacil-tRNA Sintetase (aaRSs) e a Seril-tRNA Sintetase (SerRS)	32
1.4 Fosfoseril-tRNA Kinase (PSTK)	36
 Capítulo 2	 39
2 Objetivos	39
2.1 Objetivos específicos para a enzima Fosfoseril-tRNA Kinase de <i>T. brucei</i> (TbPSTK) e <i>L. major</i> (LmjPSTK):	39
2.2 Objetivos específicos para a enzima Seril-tRNA Sintetase de <i>T. brucei</i> (TbSerRS):	39
 Capítulo 3	 41
Parte A	41
3.1 Metodologia	41
3.1.1 Amplificação e subclonagem do gene pstk de <i>T. brucei</i>	41
3.1.2 Clonagem do gene pstk de <i>T. brucei</i>	44
3.1.2.1 Transformação do produto de ligação ao vetor pGEM-T.....	47
3.1.2.2 Caracterização das colônias de <i>E.coli</i> DH5α recombinantes.....	48

3.1.3 Análise dos plasmídeos seqüenciados.....	49
3.2 Resultados.....	49
3.2.1 Amplificação e subclonagem do gene	49
3.2.2 Análise dos plasmídeos seqüenciados.....	51
Parte B.....	53
3.3 Metodologia.....	53
3.3.1 Amplificação e subclonagem do gene	53
3.3.2 Clonagem do gene pstk de <i>T. brucei</i>	55
3.3.2.1 Transformação e caracterização das colônias de <i>E.coli</i> DH5α recombinantes	55
3.3.3 Análise dos plasmídeos seqüenciados.....	56
3.4 Resultados.....	56
3.4.1 Amplificação e subclonagem do gene	56
3.4.2 Análise dos plasmídeos seqüenciados.....	57
Capítulo 4.....	58
4.1 Metodologia.....	58
4.1.1 Amplificação e subclonagem do gene	58
4.1.2 Clonagem do gene pstk de <i>L. major</i>	61
4.1.2.1 Transformação do produto de ligação ao vetor pTZ57R.....	61
4.1.2.2 Caracterização das colônias de <i>E.coli</i> DH5α recombinantes	62
4.1.3 Análise dos plasmídeos seqüenciados.....	63
4.1.4 Subclonagem do gene pstk de <i>L. major</i> em vetor pET28a.	63
4.1.5 Expressão da proteína codificada pelo gene pstk de <i>L. major</i>	65
4.1.5.a) Cepa de expressão <i>E. coli</i> Origami.	65
4.1.5.b) Cepa de expressão <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	67
4.1.5.c) Cepa de expressão <i>E. coli</i> Rosetta.....	67
4.2 Resultados.....	68

4.2.1 Amplificação e subclonagem do gene pstk de <i>L. major</i>	68
4.2.2 Análise dos plasmídeos seqüenciados	70
4.2.3 Subclonagem do gene pstk de <i>L. major</i> em vetor pET28a.....	71
4.2.5 Expressão da proteína codificada pelo gene pstk de <i>L. major</i>	73
4.2.5a) Cepa de expressão <i>E. coli</i> Origami.....	73
4.2.5.b) e c) Cepa de expressão <i>E.coli</i> BL21 (DE3) e Rosetta.....	76
Capítulo 5	78
Parte A	78
Gene da enzima Seril-tRNA Sintetase (SerRS) de <i>T. brucei</i>	78
5.1 Metodologia	78
5.1.1 Amplificação, clonagem, subclonagem, análise da seqüência e expressão.	78
5.1.2 Expressão da proteína codificada pelo gene serrs de <i>T. brucei</i>	80
5.1.3 Determinação Estrutural da Proteína TbSerRS	82
5.1.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz.....	82
5.1.3.2 Estudo do estado de oligomerização da TbSerRS através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes).....	83
5.1.4 Ensaios cristalográficos da proteína Seril-tRNA Sintetase	85
5.1.5 Anisotropia de Fluorescência.....	86
5.2 Resultados	88
5.2.1 Amplificação, clonagem, subclonagem e análise da seqüência	88
5.2.2 Expressão da proteína codificada pelo gene serrs de <i>T. brucei</i>	88
5.2.3 Purificação da proteína TbSerRS	89
5.2.4 Organização estrutural da proteína TbSerRS.....	91
5.2.4 a) Espalhamento Dinâmico de Luz.....	91
5.2.4 b) Estudo do estado de oligomerização da TbSerRS através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes).....	92
5.2.5 Anisotropia de Fluorescência.....	93
5.2.6 Ensaios cristalográficos da proteína Seril-tRNA Sintetase	95

Parte B.....	96
Isoformas do Ser-tRNA e o SELC.....	96
5.3 Metodologia.....	96
5.3.1 Amplificação e transcrição in vitro dos tRNAs (Ser-tRNA ^{Sec} e SELC).....	96
5.3.2 Dicroísmo Circular.....	99
5.3.3 Anisotropia de Fluorescência.....	100
5.4 Resultados.....	100
5.4.1 Amplificação e Transcrição in vitro dos tRNAs (Ser-tRNA ^{Sec} e SELC).	100
5.4.2 Dicroísmo Circular.....	101
5.4.3 Anisotropia de Fluorescência.....	102
Capítulo 6.....	104
6 Discussão.....	104
Capítulo 7.....	108
7 Conclusões.....	108
Capítulo 8.....	110
8 Perspectivas futuras.....	110
Referências.....	111

Capítulo 1

Neste capítulo é feita uma descrição geral sobre a ordem Kinetoplastida e as doenças por eles causadas. Posteriormente é realizada uma introdução sobre as Selenoproteínas, sua biossíntese, as Aminoacil-tRNA Sintetases, o Ácido Ribonucléico Transportador e as enzimas Seril-tRNA Sintetase e Fosfoseril-tRNA Kinase, sendo estas duas últimas estudadas neste trabalho.

1 Introdução

1.1 Ordem Kinetoplastida

A ordem Kinetoplastida compõe um grupo de protozoários flagelados que pode apresentar um flagelo (Família Trypanosomatidae) ou dois (Família Bodonidae). Os Bodonídeos, que se classificam nos principais gêneros *Bodo* e *Cryptobia*, são geralmente de vida livre, sendo comuns em ambientes aquáticos. Já os Tripanosomatídeos são parasitas, vivendo em vertebrados, plantas ou invertebrados. Esse grupo de protozoários se distingue por possuir uma organela rica em DNA conhecida como cinetoplasto que está presente em sua mitocôndria única (STUART et al., 2008).

1.1.1 Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae é considerada de grande importância médica e econômica, uma vez que espécies dessa família são capazes de provocar doenças mutilantes, incapacitantes ou mortais (REY, 2001). As doenças humanas mais comuns causadas por espécies da família Trypanosomatidae incluem a tripanossomíase Africana humana (também conhecida como doença do sono), causada por infecção por duas das três subespécies de *Trypanosoma brucei* (*T.b. rhodesiensis* e *T.b. gambiensis*); Doença de Chagas, causada por infecção com *Trypanosoma cruzi* e diferentes formas de Leishmanioses, causadas por infecção com diferentes espécies de *Leishmania*. Essas doenças estão intimamente

relacionadas ao nível de desenvolvimento do país ou de uma região. A tripanossomíase Africana humana causa 50.000 mortes por ano, leishmanioses causam 59.000 mortes por ano e a doença de Chagas, 13.000 mortes por ano. (BARRET, 2003).

Os parasitas desta família (figura 1) destacam-se por possuir, além das organelas características do domínio eucarioto, uma única mitocôndria, que se ramifica por toda a célula e uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar dependendo da forma que o protozoário assume. A mitocôndria apresenta um DNA que se organiza na forma de minicírculos (30% do DNA total da célula) e maxicírculos. Esse DNA se concentra em uma determinada região da mitocôndria, denominada de cinetoplasto. A localização do cinetoplasto é importante na especificação das formas em que os parasitas podem ser encontrados durante o ciclo biológico (REY, 2001).

Figura 1 – Diagrama de um trypanosomatidae típico, mostrando as principais estruturas deste tipo de protozoário. (Modificado de ROBERTS, JANOVY, 2005).

Segundo sua morfologia, podemos dividir os trypanosomatídeos em: amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota (figura 2).

Figura 2 - Formas fundamentais dos Trypanosomatídeos. A) amastigota; B) promastigota; C) epimastigota; D) tripomastigota; a) núcleo; b) cinetoplasto; c) flagelo. (Figura extraída de REY, 1991).

A forma amastigota possui pequenas dimensões podendo apresentar-se na forma esférica ou circular, pouco citoplasma, núcleo relativamente grande e redondo, cinetoplasto visível e flagelo não exteriorizado (figura 2A). A forma promastigota apresenta morfologia oval e alongada, com núcleo situado na porção média e cinetoplasto anterior ao núcleo por onde sai o flagelo livre (figura 2B). A forma epimastigota é mais alongada, com o cinetoplasto posicionado anteriormente em relação ao núcleo que está na porção média, o flagelo emerge longe da extremidade anterior, mas mantém-se colado à membrana do citossomo por uma prega da bainha flagelar denominada membrana ondulante. Só depois de ultrapassar o pólo anterior da célula é que o flagelo se torna livre (figura 2C). Já a forma tripomastigota assemelha-se à epimastigota por ser alongada, porém seu cinetoplasto encontra-se na extremidade posterior. O flagelo percorre externamente toda extensão do corpo celular aderido por sua longa membrana ondulante (figura 2D) (REY, 2001; NEVES, 1991).

A família Trypanosomatidae se divide nos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, os quais possuem os mamíferos como principais hospedeiros, incluindo a população humana causando sérias doenças crônicas. A abordagem moderna de desenvolvimento de novos fármacos baseia-se na identificação de vias metabólicas exclusivas e indispensáveis à sobrevivência do parasita. Para o sucesso dessa estratégia é indispensável a validação do alvo identificado, a determinação da

estrutura tridimensional da enzima alvo, a caracterização do seu mecanismo de catálise, a identificação do sítio catalítico e domínios reguladores. O conhecimento para o desenho racional de drogas bem como no estudo das relações de estrutura e função e dos mecanismos enzimáticos envolvidos é de fundamental relevância para um melhor entendimento da relação alvo-inibidor. Além da importância médica, estes organismos representam um amplo campo de estudos, pois apresentam diversos mecanismos associados a eles como a editoração do RNA, trans-splicing, estrutura do cinetoplasto, importação de tRNA mitocondrial, variação antigênica entre outros que são de interesse bioquímico e evolutivo (MCCULLOCH, 2004).

1.1.1.1 **Gênero *Leishmania***

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários digenéticos ou heteróxeos que podem se desenvolver na forma promastigota, encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados ou na forma amastigota, no citoplasma dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados reproduzem-se por divisão binária simples em ambos os hospedeiros (NEVES, 1991).

Existem mais de 21 espécies do gênero *Leishmania* que causam várias doenças como a Leishmaniose visceral ou Calazar (LV), Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose mucocutânea (LMC) (STUART et al., 2008).

O Calazar, se não tratado, é fatal e os sintomas incluem febre, perda de peso e crescimento anormal do baço e do fígado, sendo mais comum em países como Brasil, Índia, Nepal e em partes da África Central. Em pacientes com HIV/AIDS o Calazar é algumas vezes visto como uma infecção oportunista (TROUILLER, 2002).

A leishmaniose cutânea é a forma da doença que afeta a pele, causando úlceras no rosto, nos braços e pernas, o que resulta em sérias deficiências físicas e problemas sociais. A leishmaniose mucocutânea, derivada da forma cutânea, causa ulceração, seguida da destruição de membranas mucosas e do tecido do nariz, da boca e da garganta em indivíduos susceptíveis. Essa doença pode levar à morte por infecção secundária das vias respiratórias. A leishmaniose cutânea e a mucocutânea se espalharam na América Latina desde a época dos Incas: as máscaras fúnebres sem nariz são o testemunho da presença desta doença "que come a carne". O Peru

é um dos países mais afetados por leishmaniose cutânea e mucocutânea e juntamente com a Bolívia e o Brasil, contabilizam 90% de todos os casos mundiais. O número de pessoas infectadas aumentou consideravelmente desde o início dos anos 80, seguindo a migração sazonal de agricultores em grande escala (STUART, 2008).

Cerca de trinta espécies de insetos dos gêneros *phlebotomus* e *lutzomyia* podem transportar o parasita, transmitido a eles por animais domésticos ou silvestres infectados, como roedores e cachorros.

Os tratamentos para leishmanioses são inadequados, os medicamentos injetáveis requerem hospitalização e apresentam efeitos colaterais tóxicos, podendo ser fatais (STUART, 2008).

Uma das maneiras de controlar as *leishmanioses* é através da prevenção eficaz. Entretanto, os programas de controle de vetores têm sido quase sempre infrutíferos, insustentáveis ou simplesmente muito caros. Os programas atuais envolvem a pulverização de residências com inseticidas residuais e o sacrifício dos animais infectados, como os cachorros. Algumas novas idéias parecem ser promissoras, como a utilização de mosquiteiros, usado com sucesso em regiões endêmicas de malária, ou coleiras para cães impregnadas com inseticida (STUART, 2008).

1.1.1.2 Gênero *Trypanosoma*

No gênero *Trypanosoma* destacam-se as espécies *Trypanosoma cruzi*, causadora da doença de Chagas e *Trypanosoma brucei*, causadora da doença do sono e nagana em gado, a qual será dada ênfase neste trabalho.

1.1.1.2.1 *Trypanosoma brucei* e a doença do sono

A tripanossomose africana ou doença do sono é causada por tripanossomos morfológicamente indistinguíveis daquele que causa no gado a infecção denominada nagana. Os parasitas que causam doenças em humanos são as subespécies *T.*

brucei gambiense e *T. brucei rhodesiense*. Sua distribuição é exclusivamente africana, devido ao fato de a transmissão depender de insetos do gênero *Glossina* (*tsé-tsé*), que se encontra apenas na África (REY, 1991). O parasita se instala na saliva da *tsé-tsé* e é injetado quando estas fazem seu repasto sanguíneo em humanos. O tripomastigota *T. brucei* não invade as células (nem assume forma de amastigota), alimentando-se e multiplicando-se enquanto tripomastigota nos fluidos corporais (incluindo sangue e fluido extracelular nos tecidos). A mosca é infectada quando se alimenta do indivíduo contaminado. Por cerca de um mês, o parasita assume várias formas (epimastigota principalmente) enquanto se multiplica no corpo da mosca, invadindo finalmente as glândulas salivares do inseto (as moscas vivem cerca de 6 meses) (BARRET, 2003).

Após a picada, o parasita multiplica-se localmente durante cerca de 3 dias, desenvolvendo-se por vezes uma enduração ou inchaço edematoso, denominado de *cancro* tripanosomico, que desaparece após três semanas, em média. O inchaço não surge na grande maioria dos casos de infecção pelo *T. gambiense* e apenas em 50% dos casos de infecção com *T. rhodesiense*. Os parasitas multiplicam-se no sangue, evadindo o sistema imune do hospedeiro pelo processo de variação antigênica. Os sintomas iniciais cessam, mas os parasitas adaptados não são afetados pelos anticorpos produzidos e multiplicam-se, gerando nova onda de parasitas e de sintomas. O resultado do processo de multiplicação, variação antigênica e seleção são ondas de multiplicação e sintomas agudos que vão aumentando até evoluírem para os sintomas crônicos. A grande quantidade de anticorpos produzidos leva à formação de complexos dessas proteínas, que ativam o sistema complemento e causam danos nos endotélios dos vasos e nos rins. Os danos nos vasos geram os edemas e microenfartes no cérebro, enquanto a anemia é consequência da destruição acidental dos eritrócitos causada pelo sistema complemento (BARRET, 2003).

Os primeiros sintomas da doença são febre, dor de cabeça e dor nas articulações. Neste estágio, o tratamento é relativamente fácil, mas de difícil diagnóstico. Mais tarde, quando o parasita invade o cérebro, o estado mental do paciente é alterado, desenvolvendo distúrbios do sono - daí o nome da doença - além de dor intensa, confusão mental e convulsões. Nesta fase, a doença se

caracteriza por sintomas neurológicos que, sem tratamento, resultam em debilitação física, sonolência, coma e morte. Infelizmente, é somente neste estágio que a maior parte dos pacientes infectados procura tratamento. A doença do sono é difícil de ser tratada e há poucas opções de medicamentos disponíveis. Pentamidina e Suramina são as disponíveis para o 1º estágio da doença e Melarsoprol e Eflornitina para o 2º estágio. Porém além se apresentarem pouca eficiência, são tóxicas, e há o surgimento de parasitas resistentes a quimioterapia disponível. A doença do sono pode ser prevenida através de um controle eficaz da mosca. A fêmea desta mosca produz apenas cerca de 10 larvas durante o seu curto período de vida. Portanto, em teoria, prevenir a disseminação da doença do sono através do controle de moscas deveria ser uma alternativa eficaz. Os métodos tradicionais incluem a eliminação de arbustos para destruir o habitat da tsé-tsé, e a pulverização com inseticida pelo ar ou sobre o solo. Métodos menos agressivos ao meio-ambiente incluem o uso de armadilhas com iscas vivas, ou seja, o inseticida é colocado sobre animais domésticos e, conseqüentemente ingerido pelo tsé-tsé. A escolha do método de controle depende muito da espécie da mosca bem como do compromisso e financiamento do governo e/ou da comunidade afetada (BARRET, 2003).

Leishmanoses e Tripanosomíase africana humana, juntamente com malária, tuberculose, cólera, esquistossomose, doença de Chagas, entre outras parasitoses além de viroses como a dengue são classificadas pela OMS como doenças negligenciadas, que exigem um alto investimento do mercado farmacêutico, porém dão um baixo retorno, ou seja, baixo lucro. De 1975 a 2004 foram introduzidos 1556 novos medicamentos no mercado, desde apenas 21 foram para tais doenças, resultando apenas 1,3% do total (CHIRAC; TORREELE, 2006).

Diante desse panorama, a comunidade científica tem se dedicado à investigação dos mecanismos biológicos destes parasitas, realizando estudos na identificação das vias metabólicas indispensáveis à sua sobrevivência. Dentre essas vias encontra-se a via de selenoproteínas que será abordada neste trabalho, pode ser futuramente uma via para a produção de um novo fármaco.

1.2 Selenoproteínas

O elemento Selênio (Se) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Berzelius. Hoje, quase 200 anos depois, sabe-se que o selênio é um mineral essencial de importância fundamental para saúde humana, presente em pelo menos 25 proteínas. É conhecido principalmente pela sua atividade antioxidante, em aspectos terapêuticos, propriedades antiinflamatórias e antivirais. Diferente de outros metais que interagem com proteínas na forma de cofatores, o selênio se incorpora co-traducionalmente ao polipeptídeo nascente como parte do aminoácido selenocisteína que é decodificado pelo códon TGA (PAPP et al., 2007). O aminoácido selenocisteína (Sec) difere do aminoácido cisteína por um átomo de selênio (Se) ao invés do enxofre (S) que apresentam propriedades químicas similares, possuindo um baixo valor de pKa (5.3) e caracterizando-se por ser um nucleófilo muito mais forte e reativo (LU et al., 2008). Estas diferenças são a fundamental razão da participação da Sec em selenoproteínas, particularmente em proteínas com atividade de oxiredução, pois o aminoácido selenocisteína pode melhorar as taxas das reações em quase 1000 vezes (CATON-WILLIAMS; HUANG, 2008). A Sec, juntamente com a pirrolisina resultam na expansão do código genético dos tradicionais 20 aminoácidos para atualmente um total de 22 aminoácidos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

O grupo de proteínas que contém Sec como parte integrante de sua cadeia polipeptídica é definida como selenoproteínas. Selenoproteínas estão presentes em organismos pertencentes aos domínios das eubactérias, arqueobactérias e eucariotos, não sendo, porém ubíqua de todos os organismos (PAPP et al., 2007).

1.2.1 Biossíntese de Selenoproteínas

A biossíntese da Sec a partir de serina no Ser-tRNA^{Sec} foi elucidada em *E. coli*, e recentemente os passos específicos deste processo em eucariotos foram esclarecidos. O mecanismo de incorporação da Sec em proteínas de eucariotos é mais complexo e envolve um maior número de fatores protéicos. A incorporação do selênio como Sec em uma selenoproteína requer um mecanismo específico para

decodificar o códon de terminação UGA no mRNA como códon para Sec (LU et al., 2008). Esta dualidade na decodificação do códon UGA (término de leitura ou Sec) ocorre pela presença de elementos no mRNA em *cis* conservados durante a evolução e a fatores protéicos dedicados a decodificação do UGA como Sec (PAPP et al., 2007). Assim uma questão importante desde da descoberta de selenoproteínas é como a célula pode distinguir entre essas duas funções do códon UGA. A explicação está baseada nos seguintes aspectos envolvidos na tradução do mRNA de selenoproteínas: Sec é um aminoácido que é aminoacilado a um tRNA^{Sec} específico e a decodificação do UGA como Sec é dependente de seqüências localizadas no mRNA das selenoproteínas denominadas de elementos Sequência de inserção a selenocisteína (SECIS -“**S**eleno **C**ystein **I**nsertion **S**equence”). Para a incorporação deste aminoácido nas selenoproteínas são necessários vários componentes que estão detalhados na figura 3. Observa-se que são necessários elementos no próprio RNA mensageiro, que já é um mRNA diferenciado, conhecido como SECIS, um tRNA específico (SELC), além de proteínas auxiliares (SELB, SBP1 e SBP2) (SCHUMACHER et al., 1996; DRISCOLL; COPELAND, 2003).

Figura 3- Mecanismo de incorporação de selenocisteínas em um códon UGA em fase, localizado no interior do gene. A linha indica o RNA mensageiro contendo um códon UGA em fase. O elemento SECIS corresponde à estrutura secundária adquirida pelo RNA mensageiro e ao qual a maquinaria de incorporação de Sec se liga. Figura extraída de HATFIELD et al., 2002.

O mRNA de selenoproteínas de eucariotos possui características únicas, a primeira delas é a presença do códon UGA interno à região codificante e em fase de

leitura, entretanto existe uma estrutura em alça na região 3' deste mRNA que ajuda no reconhecimento deste códon como um sinal de inserção de Sec, esta estrutura é conhecida como SECIS (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura do elemento SECIS. Figura extraída de HATFIELD et al., 2002.

O RNA transportador específico para a incorporação de Sec é denominado Sec-tRNA^{Sec} (SELC) (figura 5), este tRNA possui um anticódon UCA que reconhece o códon UGA. SELC possui características estruturais distintas dos demais tRNAs, e portanto não é reconhecido pela maquinaria normal que adiciona tRNAs aminoacilados ao peptídeo nascente pela via ribossomal.

Estas características únicas de SELC exigem um fator de elongação especial para que seja possível a incorporação da selenocisteína na posição correspondente ao códon UGA codificante. Como exemplo destas peculiaridades, podemos citar o Ser-tRNA^{Sec} de eucariotos, ele é o maior tRNA já descrito para estes organismos com 90 nucleotídeos de comprimento, possui um braço variável atípico, além de 13 nucleotídeos nos braços acceptor e TΨC, ao invés dos 12 normalmente encontrados nos outros tRNAs. Outra característica peculiar é o baixo número de nucleotídeos modificados presentes, quando comparado às outras moléculas desta classe. Finalmente pode-se ressaltar outra característica única desta molécula que é o fato do transcrito iniciar no primeiro nucleotídeo da região codificante, enquanto que os demais tRNAs apresentam uma seqüência 5' removida por processamento pós-transcricional (SCHUMACHER et al., 1996).

Figura 5 - Diagrama do tRNA^{sec}_{uca} de *Escherichia coli* indicando os diferentes loops, além da sequência anticódon UCA complementar ao códon de terminação UGA (Extraído de Tormay et al., 1994). Modelo do enovelamento do tRNA^{sec}_{uca} de *Escherichia coli*.

A síntese de Sec se inicia a partir de uma serina ligada ao Ser-tRNA^{Sec} que é modificada para selenocisteína. Este processo de alteração dos aminoácidos ligados ao tRNA já é descrito na biossíntese de asparagina e glutamina, mas o mecanismo envolvido para a síntese de selenocisteína apresenta diferenças em relação aos outros processos conhecidos (SCHUMACHER et al., 1996).

O primeiro passo da biossíntese de Sec é a aminoacilação de Ser-tRNA^{Sec} (SELC) com uma serina pela enzima Seril-tRNA Sintetase. A conversão de serina em selenocisteína é descrita em *Escherichia coli* e recentemente em eucariotos (YUAN, 2006). Em *E. coli* uma Sec-sintase dependente de piridoxal fosfato (SELA) remove o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário aminoacrilil. Este intermediário serve como aceptor de seleno-fosfato gerando a selenocisteína. O seleno-fosfato é obtido através da fosforilação de selenito, a partir de ATP, pela enzima seleno-fosfato sintetase SELD (CASSAGO, 2006).

Outra enzima, denominada SELB, liga-se ao elemento SECIS do mRNA e atua como um fator de alongação. SELB permite desta forma que Sec-tRNA^{Sec} seja posicionado no sítio A do ribossomo pareando com o códon UGA, permitindo que a selenocisteína seja incorporada ao polipeptídeo nascente (KROL, 2002).

Em mamíferos foram descobertas duas seleno-fosfato sintetases (SPS1 e SPS2) homólogas a SELD, sendo que SPS2 é uma seleno-proteína e pode estar

envolvida na regulação de sua própria síntese. A função de SELB em mamíferos é realizada por duas proteínas, uma que se liga ao elemento SECIS e outra que atua como um fator de elongação Sec específico. A peça-chave para elucidar a via de biossíntese de Sec em eucariotos é a Sec sintase (homóloga a SELA). Foi determinado que em eucariotos esta etapa é constituída de dois passos enzimáticos que substituem a atividade realizada por SELA, uma fosforilação da serina realizada pela Fosfoseril-tRNA Kinase (PSTK), seguida pela selenilação da mesma através da SecSepS (YUAN et al., 2006).

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

As aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs) são uma família de enzimas que asseguram a correta ligação entre um aminoácido e seu tRNA correspondente gerando um conjunto de tRNAs aminoacilados essenciais para o processo de síntese protéica (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

As aaRSs realizam a reação de aminoacilação em duas etapas: primeiro ATP reage com o aminoácido formando aminoacil-adenilato e difosfato. Em uma segunda reação o aminoácido ativado é transferido para o tRNA para formar o aminoacil-tRNA e AMP (Figura 6).

Figura 6 - Aminoacilação do tRNA por aaRSs. As aaRS de classe I o aminoácido é transferido inicialmente para a hidroxila 2' da ribose do nucleótido terminal do tRNA e posteriormente, por uma reação de transesterificação passa a hidroxila 3'. Nas aaRSs de classe II a aminoacilação ocorre diretamente na hidroxila 3' (Modificado de LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Nestas reações o aminoácido é ligado ao tRNA por uma ligação de alta energia e a essa energia irá impulsionar a formação da ligação peptídica. As aaRSs

são classificadas em dois grupos (Classe I e II) segundo a reação de aminoacilação (Figura 6) e a sua característica estrutural (Figura 7) (KAMTEKAR et al., 2007).

Figura 7 - Aminoacil-tRNA sintetases. Ambas as enzimas de classe I (A) e II (B) estão mostradas ligadas ao seu tRNA (em verde). O ATP ligado está indicado em vermelho. A: Gln-tRNA sintetase de *E. coli*, uma típica aaRS monomérica de classe I. B: Asp-tRNA sintetase de levedura, uma típica aaRS dimérica de classe II (Extraído de LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

As aaRS de classe I reconhecem a sequência anticódon para inserir o respectivo aminoácido, geralmente hidrofóbico, enquanto que as aaRS de classe II não interagem com a região anticódon. A configuração estrutural do tRNA é mais importante do que a própria sequência, sendo que os principais pontos de interação ocorrem com a região anticódon e região aceptora. É devido a este fato que uma aaRS pode reconhecer mais de um tRNA para um dado aminoácido (ALBERTS et al., 2002). As aaRS de classe I e II se ligam a superfícies opostas do tRNA (Figura 7), uma característica que pode explicar em parte a diferença do grupo hidroxila, aceitor do aminoácido no tRNA.

A formação de aminoacil-tRNA, catalisada pelas aminoacil-tRNA sintetases é um passo crucial para manter a fidelidade na biossíntese de proteínas. Inserida neste grupo de sintetase encontra-se a Seril-tRNA Sintetase (SerRS), pertencente à classe II das aminoacil-tRNA sintetases. SerRS aminoacila o tRNA^{Sec} com serina, sendo este o primeiro passo para a incorporação de selenocisteína em proteínas (GESLAIN et al., 2006).

Há peculiaridades interessantes no sistema de serilação:

- 1) Existência de seis códons para serina em dois grupos distintos, o que tornam as SerRSs uma das poucas sintetases não-específicas no reconhecimento do anti-códon;
- 2) Com exceção dos tRNAs mitocondriais de mamíferos, todos os tRNA^{Sec} são da classe II dos tRNAs, isto é, eles possuem um longo braço variável (figura 8). Este é o principal elemento de identificação dos tRNA^{Sec} pelas SerRSs;
- 3) Todos os organismos requerem uma incorporação co-traducional de selenocisteína (Sec) em selenoproteínas. Isto é iniciado pela SerRS que ativa o tRNA, e subsequentemente ocorre a conversão de Ser-tRNA^{Sec} para Sec-tRNA^{Sec}

Figura 8 - Vários tRNAs específicos da Seril-tRNA Sintetase. A) tRNA^{Ser} (GGA) de *E. coli*. B) tRNA^{Sec} (UCA) de *E. coli*. C) tRNA^{Ser} (UGA) do citoplasma humano. D) tRNA^{Ser} (UGA) mitocondrial de levedura. E) tRNA^{Ser} (UGA) mitocondrial de bovinos com a ausência do loop D e braço variável. F) tRNA^{Ser} (UGA) mitocondrial de bovinos com o loop D truncado. (Figura extraída IBBA, FRANCKLYN and CUSACK, 2005).

1.4 Fosfoseril-tRNA Kinase (PSTK)

A síntese de Sec se inicia a partir de uma Serina ligada ao Ser-tRNA^{Sec} que é modificada para selenocisteína. Este processo de alteração dos aminoácidos ligados ao tRNA já é descrito na biossíntese de asparagina e glutamina, mas o mecanismo envolvido para a síntese de selenocisteína apresenta diversas diferenças em relação aos outros processos conhecidos (CARLSON et al., 2004).

O primeiro passo da biossíntese de Sec é a aminoacilação de Ser-tRNA^{Sec} (SELC) com uma serina por uma seril-tRNA sintetase. Em *E. coli* uma Sec-sintase dependente de piridoxal fosfato (SELA) remove o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário aminoacrilil, este intermediário serve como acceptor de seleno-fosfato gerando a selenocisteína. O seleno-fosfato é obtido através da fosforilação de selenito, a partir de ATP, pela enzima seleno-fosfato sintetase SELD (Figura 9).

Figura 9 - Etapas envolvidas na síntese de selenocisteínas em *Escherichia coli*.

Outra enzima, denominada SELB, liga-se ao elemento SECIS do mRNA e atua como um fator de alongação. SELB permite desta forma que Sec-tRNA^{[Ser]_{Sec}} seja posicionado no sítio A do ribossomo pareando com o códon AUG, permitindo que a selenocisteína seja incorporada ao polipeptídeo nascente.

Vários componentes que fazem parte desta via em eucariotos foram identificados (CARLSON et al., 2004). Há indicações da existência de dois passos enzimáticos que substituem a atividade realizada por SELA de *E. coli*, uma fosforilação da serina, seguida pela selenilação da mesma (figura 10). O tRNA^{Sec} é dependente de fosfo-serina (Sep), então a enzima PSTK faz a conversão de Ser-tRNA^{Sec} para Sep-tRNA^{Sec}, ou seja, fosforila a serina.

Figura 10 - Possível mecanismo de síntese de selenocisteína em eucariotos. Neste mecanismo o tRNA^{Sec} é carregado com serina pela SerRS. A serina deste tRNA é então fosforilada pela PSTK. Um complexo protéico se associa a este tRNA contendo SECp43, SLA/LP, EFSec e possivelmente a SPS1 para transformar a serina em selenocisteína e apresentar o tRNA^{[Ser]^{Sec}} ao ribossomo.

Capítulo 2

2 Objetivos

Este trabalho faz parte de um esforço do grupo em elucidar a via de síntese de selenocisteínas em Kinetoplastida e sua relevância fisiológica para esses organismos. O principal objetivo deste trabalho foi à clonagem e caracterização bioquímica de duas enzimas da via de selenoproteínas. Inicialmente foi abordado o estudo da Fosfoseril-tRNA Kinase de *T. brucei* (*TbPSTK*) e *L. major* (*LmjPSTK*). Devido as dificuldades de clonagem e expressão destas proteínas passou-se a estudar a Seril-tRNA Sintetase de *T. brucei* (*TbSerRS*).

2.1 Objetivos específicos para a enzima Fosfoseril-tRNA Kinase de *T. brucei* (*TbPSTK*) e *L. major* (*LmjPSTK*):

- Clonar os genes codificantes das proteínas *TbPSTK* e *LmjPSTK* em vetores de expressão apropriados para a produção de proteína em larga escala;
- Desenvolver protocolos de expressão e purificação das proteínas recombinantes obtidas;
- Caracterização bioquímica das enzimas;

2.2 Objetivos específicos para a enzima Seril-tRNA Sintetase de *T. brucei* (*TbSerRS*):

- Ensaios de expressão e desenvolvimento de protocolos de purificação da enzima recombinante;
- Caracterização bioquímica da enzima;

- Estudos do comportamento protéico no contexto da estabilidade e dimerização;
- Desenvolvimento de ensaios de cristalização e co-cristalização da enzima recombinante;
- Transcrição *in vitro* dos tRNAs (Ser-tRNA^{Sec} e SELC);
- Caracterização das constantes de afinidade *Tb*SerRS e Ser-tRNA^{Sec} e SELC.

Capítulo 3

Nesse capítulo é feita uma descrição geral sobre os procedimentos realizados e os resultados obtidos com o gene *pstk* de *Trypanosoma brucei*. Resumidamente foram realizados vários experimentos para a obtenção do gene *pstk* de *T. brucei* sem mutações, para que fosse permitida uma possível realização de experimentos para a caracterização molecular da enzima PSTK de *T. brucei*. Estes experimentos estão divididos em parte A e B por utilizar diferentes oligonucleotídeos nas amplificações.

Parte A

3.1 Metodologia

3.1.1 Amplificação e subclonagem do gene *pstk* de *Trypanosoma brucei*

Tabela 1: Dados sobre a PSTK de *T. brucei* extraídos de programas de predição (Expasy)

PSTK de <i>Trypanosoma brucei</i>				
Nucleotídeos	Aminoácidos	Massa Molecular	Oligomerização	pI
1083	360	40.1kDa	Dímero	6.6

```

atgacagtttgtcttgttctactaactgggctgccaggagcggggaagacgacactaggc
M T V C L V L L T G L P G A G K T T L G
aaggctcttaaacagttgggggatcacataacccatgaactctccctcatagtcacggca
K A L K Q L G D H I T H E L S L I V T A
gtggtggaattagatgactttatgtgtaacgtcgggtgcgagtaatgggtcccgtgtagag
V V E L D D F M C N V G A S N G S R V E
agtaccgtttttcgatccaagtcgggtggcgagaggcggttcgaagcggctcgtcaggcaact
S T V F D P S R W R E A F E A A R Q A T
cgccaggagttggagcgggtgcctaataatgatggagaggaataaagcggtaatgcacttgggt
R Q E L E R C L M M E R N K A V M H L V
tttctggtggatccgctgccatataggagtatgagagcatcgtactggaaaatgtgcaag
F L V D P L P Y R S M R A S Y W K M C K
gaattaagtgccaaagtgtgctgagactcactttcatgattcatgggaagtgcagagcatt
E L S A K C A E T H F H D S W E V Q S I
gttgtcttgttggaggtgcggatgaacaccccgaggagggttgtctccaacgcaatgag
V V L L E V R M N T P E E V C L Q R N E
ctccgcgcgggaaccccgagctatattcccccgatgttattaaggggataagtgactcg
L R A G T P Q Y I P P Y V I K G I S D S
tttgaccgtggtgacctcactgctgtgctgccgggtacagacggaaatatgtgggccgta
F D R G D L T A V L P G T D G N M W A V
cttcccgggcagaggtcggcaccgtggcccggttcttttactgggtgatgaagtgagatgt
L P G Q R S A P W P V L L L V D E V R C
tgcgcgctcaccaccaatttgttggccacgcagttgctggagcgtatccgagggggaagac
C A S P P N L L A T Q L L E R I R G E D
ataatgcgtgagatgacggaacaacaagtaagtgtttttaattattacaagtgccaaagtg
I M R E M T E Q Q V S V F N Y Y K C Q V
gaagggggggaagtcgaagtgccttggcgagtgaggagaagcacatgacaacgttaacaactgt
E G G K S K C L A S G E A H D N V N N C
cttcatcaagtggacctccacatgcgggcagttgtgggacattacatggtccagcggcgag
L H Q V D L H M R A V V G H Y M V Q R Q
agtattggttcactgaagccaggcactgggcaacgcgtaagcaaagtgcgttcgacccac
S I G S L K P G T G Q R V S K C R S T H
tacgcgggaattcgggcagcaatcacgaagggaacgagaaacacaggaggatctttttcc
Y A G I R A A I T K G T R N T G G S F S
gaagtgcaggactactgcagcagttacttttgggaattcgagcatgccttagtagatctt
E V Q G L L Q Q L L L E F E H A L V D L
tga
-

```

Figura 11 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da PSTK de *T. brucei* traduzida utilizando o programa Expsy.

Com base na sequência genômica depositada no NCBI por (BERRIMAN et al., 2005) para o gene *pstk* de *T. brucei*, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos com os sítios de clivagem para as enzimas *Nde* I e *Xho* I, visando à amplificação do fragmento de interesse. A sequência dos oligonucleotídeos está a seguir:

Tb pstk sense:

5' ACG TAA GCT TCA TAT GAC AGT TTG TCT TGT TCT ACT AAC TGG GCT G 3'
Hind III Nde I

Tb pstk antisense:

5' CCC TCG AGT TAT CAA AGA TCT ACT AAG GCA TG A 3'
Xho I

O gene foi amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR), a partir do DNA genômico, gentilmente cedido pela aluna de doutorado Fernanda C. Costa. A reação foi feita segundo condições descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene pstk de *T. brucei*.

Mistura de reação de amplificação	Volume (µL)
Tampão sem Mg ⁺² [10X]	5
dNTP 10mM (N = A, G, C, T)	1
MgCl ₂ 50mM	1,5
Oligonucleotídeo 100pmol/µL (sense)	1
Oligonucleotídeo 100pmol/µL (antisense)	1
DNA molde (genômico) 50µg/µL	1
Taq DNA Polimerase (5U/µL)	0,2
H ₂ O q.s.p.	50

Em seguida a reação foi submetida a um programa de PCR (figura 12), executado no termocilcador PTC – 100TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Figura 12 - Ciclo da reação de PCR utilizado para a amplificação do gene.

Os fragmentos de DNA obtidos nesta reação de PCR foram analisados através de corrida eletroforética em gel de agarose preparativo (BioRad) 1% com brometo de etídio (0,5µg/mL) em tampão TAE 1X (8mM Tris-acetato, 0,2mM EDTA pH=8,0) e purificados, a partir do gel de agarose, utilizando o “Kit Perfectprep Gel

Cleanup” (Eppendorf) de acordo com as condições do fabricante. O produto foi quantificado em espectrofotômetro em 260nm e adenilado de acordo com as condições descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene *pstk* de *T. brucei*.

Mistura de reação de adenilação	Volume (µL)
Tampão sem Mg^{+2} [10X]	3
dATP 10mM	3
MgCl ₂ 50mM	1,5
DNA amplificado (25ng/mL)	9,0
Taq DNA Polimerase (5U/µL)	2
H ₂ O q.s.p.	30

A reação permaneceu a 72°C por 15 minutos. Em seguida, foi feita uma extração com fenol/clorofórmio para retirar a enzima que restou da adenilação. Usou-se 2 volumes de etanol absoluto a -20°C e 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 4,7 para a precipitação do fragmento de interesse. E, após centrifugação, o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado, deixado secar e solubilizado em 12µL de água. Esse DNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260nm e empregado na reação de ligação com o vetor de clonagem.

3.1.2 Clonagem do gene *pstk* de *T. brucei*

- **Vetor pGEM-T**

O vetor pGEM-T (Promega) (figura 13) é um conveniente sistema para clonagem de produtos de PCR, pois possui em suas extremidades uma timidina 3' terminal que permite a ligação do produto de PCR diretamente no plasmídeo sem o emprego de enzimas de restrição.

Figura 13 - Mapa do vetor pGEM-T (disponível em: <<http://www.promega.com>>)

Assim, para a clonagem do gene *pstk* de *T. brucei* o fragmento adenilado foi ligado ao vetor pGEM-T de acordo com a reação descrita na tabela 4.

Tabela 4 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene *pstk* de *T. brucei* ao vetor de clonagem pGEM-T.

Mistura da reação de ligação	Volume (μL)
Tampão ligase [2X]	5
DNA adenilado 50ng/μL	3
Vetor pGEM-T 50ng/μL	1
T4-DNA Ligase	1
H ₂ O q.s.p.	10

A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e em seguida foi realizada a transformação do vetor contendo o inserto de interesse em células de *Escherichia coli* DH5α que se tornaram competentes pelo método de cloreto de cálcio (AUSUBEL, 1995).

- **Vetores pTZ57R e pEXP5-NT/TOPO**

O gene *pstk* foi clonado em outros vetores de expressão seguindo o protocolo descrito acima. Esses vetores foram pTZ57R (Fermentas) (figura 14) e pEXP5-

NT/TOPO (Invitrogen) (figura 15) de acordo com as reações descritas nas tabelas 5 e 6.

Figura 14 - Mapa do vetor pTZ57R (disponível em: <<http://www.fermentas.com>>)

Tabela 5 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene *psk* de *T. brucei* ao vetor de clonagem pTZ57R.

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

A reação foi incubada a 22°C por 16 horas, como recomendado pelo fabricante e em seguida foi realizada a transformação do vetor contendo o inserto de interesse em células competentes de *E. coli* DH5α.

Figura 15 - Mapa do vetor pEXP5-NT/TOPO (disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>)

Tabela 6 - Reagentes utilizados na reação de ligação do gene pstk de *T. brucei* ao vetor de clonagem pEXP5NT-TOPO.

Mistura da reação de ligação	Volume (μL)
Salt solution	1
DNA adenilado 20ng/μL	1,5
Vetor pEXP5-NT/TOPO	1
H ₂ O q.s.p.	6

A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e em seguida foi realizada a transformação do vetor contendo o inserto de interesse em células competentes de *E. coli* TOP 10.

3.1.2.1 Transformação do produto de ligação ao vetor pGEM-T

Alíquotas de 50μL de células competentes, estocadas a -80°C foram descongeladas em gelo por 30 minutos e todo o volume da reação de ligação foi adicionado e homogeneizado cuidadosamente no tubo de células. Em seguida, foi dado o choque térmico onde a mistura permaneceu por 90 segundos a 42°C e transferida ao gelo por 3 minutos. Foi adicionado 250μL de meio LB (Luria Bertane) às células que permaneceram em agitação leve por 1 hora a 37°C. Decorrido este

tempo, 100µL da mistura foram semeados em meio sólido LB ágar contendo 100µg/mL de ampicilina, 0,5mM de IPTG e 80µg/mL de X-Gal. Os 200µL de material transformado restantes foram semeados em outra placa nas mesmas condições. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C. Este procedimento foi repetido para os outros vetores, com a diferença apenas que para o vetor pEXP5-NT/TOPO foi adicionado apenas 100µg/mL de ampicilina ao meio.

3.1.2.2 Caracterização das colônias de *E.coli* DH5α recombinantes

Após a reação de transformação descrita acima, as colônias resultantes foram submetidas a uma primeira seleção através da coloração que tais colônias transformadas apresentaram. Colônias azuis caracterizavam-se como possivelmente não recombinantes, enquanto que as brancas, como possivelmente recombinantes. Essa análise mostra-se efetiva devido ao inserto (DNA colocado na reação de ligação) ligado ao vetor pGEM-T interromper a fase de leitura do gene para a β-Galactosidase impedindo sua tradução e evitando a degradação do substrato X-Gal. Assim, as colônias recombinantes ficam brancas na análise visual.

Após essa prévia análise, algumas colônias brancas foram selecionadas, transferidas para meio LB líquido contendo o respectivo antibiótico de seleção para o vetor correspondente para posterior extração de seus DNAs plasmidiais e confirmação quanto à presença do plasmídeo recombinante. A extração dos DNAs plasmidiais foi feita utilizando-se o kit Minipreps Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) e a confirmação dos plasmídeos recombinantes foi realizada utilizando-se a técnica de PCR para amplificar o gene de interesse a partir do plasmídeo recombinante e seus respectivos oligonucleotídeos ou análise de restrição utilizando enzimas que flanqueiam o gene.

Na reação de PCR, apenas 1µL do DNA plasmidial (0,1µg/µL) foi utilizado e seguiu-se o protocolo já descrito na seção 3.1.1 para a amplificação desse gene.

Para reação de digestão, utilizou-se 0,5µg de DNA plasmidial, 1,5µL da enzima *Nde* I (10U/µL – BioLabs), 1,5µL da enzima *Xho* I (10U/µL - BioLabs), 5µL de tampão apropriado, 2µL de BSA (50mM – BioLabs) e completou-se a reação para

50µL com água milli-Q autoclavada incubando a mistura a 37°C por 4 horas. Ambos os testes foram analisados em gel de agarose 1% e os DNAs recombinantes seqüenciados, utilizando oligonucleotídeos 5' e 3' do vetor clonado e oligonucleotídeos internos (tabela 7) para o gene pstk de *T. brucei* para posterior análise da seqüência.

Tabela 7 - Seqüência dos oligonucleotídeos internos específicos para o gene pstk de *T. brucei*.

Oligonucleotídeo	Seqüência dos oligos 5'- 3'
TbPSTK3S	ATG GGA AGT GCA GAG CAT TGT TGT C
TbPSTK4S	GCG CAA CAT CTC ACT TCA TCA ACC

3.1.3 Análise dos plasmídeos seqüenciados

O sequenciamento do gene pstk de *T. brucei* foi realizado pelo método de Sanger através do equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela técnica de laboratório Dr^a Susana A. Sculaccio. As seqüências obtidas foram comparadas com a seqüência genômica depositada para o gene pstk de *T. brucei*, utilizando o programa SeqMan (DNASTAR).

3.2 Resultados

3.2.1 Amplificação e subclonagem do gene

Para amplificar o gene foi empregada a técnica de PCR, com oligonucleotídeos específicos e utilizando a enzima *Taq* DNA Polimerase. Segue o resultado da amplificação na figura abaixo.

Figura 16 - Verificação da amplificação do gene pstk de *Trypanosoma brucei* em gel de agarose 1% em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene pstk de *T. brucei* (1083pb).

Após a amplificação foi obtido um fragmento de 1083 pares de bases (pb) referente ao gene pstk de *T. brucei* e este, depois de purificado do gel e adenilado, foi utilizado para a clonagem nos vetores pGEM-T, pTZ57R e pEXP5-NT. A seleção de colônias recombinantes foi determinada pela clivagem das construções pGEM-T/pstk (figura 17), pTZ57R/pstk e pEXP5-NT/TOPO/pstk (figura 18) realizada com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I ou pela técnica de PCR.

Figura 17 - Resultado da reação de digestão dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene pstk de *T. brucei* (1083pb); 3) reação de digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I de um dos clones obtidos pela construção pGEM-T/pstk.

Figura 18 - Resultado da reação de PCR para amplificação do gene *pstk* a partir dos DNAs plasmidiais dos clones obtidos na construção pTZ57R/*pstk* e na construção pEXP5-NT/TOPO/*pstk* visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2), 3), reação de PCR dos clones 1e 2 de pTZ57R/*pstk* e 4) e 5) dos clones 1 e 2 de pEXP-NT/TOPO/*pstk* ambos a partir dos DNAs plasmidiais.

3.2.2 Análise dos plasmídeos seqüenciados

Tendo como base a seqüência genômica depositada para o gene *pstk* de *T. brucei*, comparou-se todas as seqüências obtidas, sendo 4 para a construção pGEM-T/*pstk*, 6 para pTZ57R/*pstk* e 3 para pEXP5-NT/TOPO/*pstk*. Utilizando o programa SeqMan (DNASTAR), analisou-se também o eletroferograma (figura 19). Foram identificadas diversas mutações entre os clones analisados. Em seguida a seqüência gênica foi traduzida para a seqüência de aminoácidos para verificar se as mutações eram silenciosas (figura 20). Notamos que todos os clones obtidos eram mutantes e essas mutações ocorriam em diferentes posições, como está exemplificado na figura 23, onde se mostra a comparação das seqüências de aminoácidos de alguns dos clones obtidos. As figuras 19 e 20 são apenas para exemplificar as mutações, não se tratando do total de seqüências analisadas.

Figura 19 - Comparação das seqüências do gene ptk de *T. brucei* depositado com a seqüência de um clone obtido e logo abaixo o eletroferograma do sequenciamento, nota-se que o pico referente ao nucleotídeo lido está bem definido.

ptZ57R/ptk	MTVCLVLLTGLPGAGKTTTLGKALKQLGDHITHEL SLIVTAVVELDDFMCNVGASNGSRVE	60
pEXP5-NT/TOP0/ptk	MTVCLVLLTGLPGAGKTTTLGKALKQLGDHITHEPSLIVTAVVELDDFMCNVGASNGSRVE	60
pGEM-T/ptk	MTVCLVLLTGLPGAGKTTTLGKALKQLGDHITHEL SLIVTAVVELDDFMCNVGASNGSRVE	60
tbptk	MTVCLVLLTGLPGAGKTTTLGKALKQLGDHITHEL SLIVTAVVELDDFMCNVGASNGSRVE	60

ptZ57R/ptk	STVFDPSRWREAFEAARQATRQELERCLMMERNKAVMHLVFLVDPLPYRSMRASUYKMKCK	120
pEXP5-NT/TOP0/ptk	STVFDPSRWREAFEAARQATRQELERCLMMERNKAVMHLVFLVDPLPYRSMRASUYKMKCK	120
pGEM-T/ptk	STVFDPSRWREAFEAARQATRQELERCLMMERNKAVMHLVFLVDPLLYRSMRASUYKMKCK	120
tbptk	STVFDPSRWREAFEAARQATRQELERCLMMERNKAVMHLVFLVDPLPYRSMRASUYKMKCK	120

ptZ57R/ptk	ELSAKCAETHFHDSEWVQSIVVLEVRMNTPEEVCLQRNELRAGTPQYIPYVIKGISDS	180
pEXP5-NT/TOP0/ptk	ELSAKCAETHFHDSEWVQSIVVLEVRMNTPEEVCLQRNELRAGTPQYIPYVIKGISDS	180
pGEM-T/ptk	ELSAKCAETHFHDSEWVQSIVVLEVRMNTPEEVCLQRNELRAGTPQYIPYVIKGISDS	180
tbptk	ELSAKCAETHFHDSEWVQSIVVLEVRMNTPEEVCLQRNELRAGTPQYIPYVIKGISDS	180

ptZ57R/ptk	FDRGDLTAVLLGTDGNMMAVLPQKSAPWPVLLLVDEVRCASPPNLLATQLLERIGED	240
pEXP5-NT/TOP0/ptk	FDRGDLTAVLLGTDGNMMAVLPQKSAPWPVLLLVDEVRCASPPNLLATQLLERIGED	240
pGEM-T/ptk	FDRGDLTAVLPGTGDNMMAVLPQKSAPWPVLLLVDEVRCASPPNLLATQLLERIGED	240
tbptk	FDRGDLTAVLPGTGDNMMAVLPQKSAPWPVLLLVDEVRCASPPNLLATQLLERIGED	240

ptZ57R/ptk	IMREMTQQVSVFNYYKQVEGGKSKCLASGEAHDNVNCLHQVDLHMRVAVGHYMERQ	300
pEXP5-NT/TOP0/ptk	IMREMTQQVSVFNYYKQVEGGKSKCLASGEAHDNVNCLHQVDLHMRVAVGHYMERQ	300
pGEM-T/ptk	IMREMTQQVSVFNYYKQVEGGKSKCLASGEAHDNVNCLHQVDLHMRVAVGHYMERQ	300
tbptk	IMREMTQQVSVFNYYKQVEGGKSKCLASGEAHDNVNCLHQVDLHMRVAVGHYMERQ	300

ptZ57R/ptk	SSGSLKPGTGQRVSKCRSTHYAGIRAAITKGRNTGGSFSEVQGLLQQLLLEFEHALVDL	360
pEXP5-NT/TOP0/ptk	SSGSLKPGTGQRVSKCRPTHYAGIRAAITKGRNTGGSFSEVQGLLQQLLLEFEHALVDL	360
pGEM-T/ptk	SSGSLKPGTGQRVSKCRATHYAGIRAAITKGRNTGGSFSEVQGLLQQLLLEFEHALVDL	360
tbptk	SIGSLKPGTGQRVSKCRSTHYAGIRAAITKGRNTGGSFSEVQGLLQQLLLEFEHALVDL	360
	* *****	

Figura 20 - Análise comparativa das seqüências de aminoácidos de alguns clones obtidos com a seqüência original da proteína TbPSTK. Análise realizada em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>.

Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento cobriam de maneira satisfatória todo o gene estudado, como pode ser visto na figura 21. Isso foi preservado para todos os clones seqüenciados.

Figura 21 - Representação da porção coberta por cada oligonucleotídeo no alinhamento produzido pelo programa SeqMan para o gene *TbPSTK*. As setas indicam a alinhamento da extremidade 5' (esquerda pra direita) e da extremidade 3' (direita pra esquerda).

Parte B

Diferenciando-se da parte A, esta parte foi realizada com outros oligonucleotídeos exemplificados abaixo.

3.3 Metodologia

3.3.1 Amplificação e subclonagem do gene

Novamente foram sintetizados oligonucleotídeos específicos para o gene *psk* de *T. brucei*, porém a nova construção possuía apenas sítios de clivagem para as enzimas *Nde* I e *Xho* I, possibilitando a amplificação do fragmento de interesse baseados na seqüência genômica (Berriman, et al, 2005). As seqüências dos oligonucleotídeos seguem abaixo.

Tb pstk sense:

5' CCC ATA TGA CAG TTT GTC TTG TTC TAC TAA 3'
Nde I

Tb pstk antisense:

5' CCC TCG AGT TAT CAA AGA TCT ACT AAG GCA TG A 3'
Xho I

Os passos seguintes foram realizados de maneira semelhante ao que foi citado no item 3.1.1 da parte A.

O gene foi amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR), a partir do DNA genômico, porém desta vez foi utilizada uma enzima com maior fidelidade, ou seja, com uma melhor ação corretora. A reação foi feita segundo condições descritas na tabela 8.

Tabela 8 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene pstk de *T. brucei* com a enzima TITANIUM Taq DNA polimerase.

Mistura de reação de amplificação	Volume (µL)
Tampão da enzima [10X]	5
dNTP 10mM (N = A, G, C, T)	1
Oligonucleotídeo 10µM (sense)	1
Oligonucleotídeo 10µM (reverse)	1
DNA molde (genômico) 50ng/µL	2
TITANIUM Taq DNA polimerase [50X]	1
H ₂ O q.s.p.	50

Em seguida a reação foi submetida a um programa de PCR igualmente ao citado no item 3.1.1 (figura 22), executado no termocilcador PTC – 100TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Figura 22 - Ciclo da reação de PCR utilizado para a amplificação do gene com a enzima TITANIUM Taq DNA polimerase.

Os fragmentos de DNA obtidos nesta reação de PCR foram analisados em gel de agarose preparativo (BioRad) 1% marcado com brometo de etídio (0,5µg/mL) em tampão TAE 1X (8mM Tris-acetato, 0,2mM EDTA pH=8,0) e purificados a partir do gel de agarose utilizando-se o “kit Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf) de acordo com as condições do fabricante. O produto foi quantificado e adenilado de acordo com as condições descritas na tabela 9.

Tabela 9 - Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene pstk de *T. brucei*.

Mistura de reação de adenilação	Volume (µL)
Tampão sem Mg [10X]	3
dATP 10mM	3
MgCl ₂ 50mM	1,5
DNA amplificado (76ng/µL)	15
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µL)	3
H ₂ O q.s.p.	30

A reação permaneceu a 70°C por 30 minutos. Em seguida, foi precipitação com fenol/clorofórmio para retirada do excesso da enzima, seguindo o que foi citado no item 3.1.1. Esse DNA foi quantificado e a reação de ligação com o vetor de clonagem preparada.

3.3.2 Clonagem do gene pstk de *T. brucei*

A clonagem do gene de interesse foi realizada seguindo os protocolos descritos no item 3.1.2 da parte A, porém utilizados somente os vetores pGEM-T e pTZ57R.

3.3.2.1 Transformação e caracterização das colônias de *E.coli* DH5α recombinantes

O procedimento realizado para a transformação do produto de ligação nos vetores pGEM-T e pTZ57R e para a caracterização das colônias de *E. coli* DH5α foi o mesmo citado no item 3.1.2.1 e 3.1.2.2 respectivamente.

Os DNAs extraídos de colônias recombinantes foram enviados para sequenciamento utilizando os mesmos oligonucleotídeos internos específicos mostrados na tabela 7 além dos oligonucleotídeos referentes a cada vetor clonado.

3.3.3 Análise dos plasmídeos seqüenciados

O sequenciamento do gene *pstk* de *T. brucei* foi realizado pelo método de Sanger através do equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela técnica de laboratório Dr^a Susana A. Sculaccio. As seqüências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas com a seqüência genômica depositada para o gene *pstk* de *T. brucei*, utilizando o programa SeqMan (DNASTAR).

3.4 Resultados

3.4.1 Amplificação e subclonagem do gene

A reação de PCR para o gene de interesse com a enzima TITANIUM *Taq* DNA Polimerase produziu um fragmento único condizente ao esperado (figura 23).

Figura 23 - Resultado da amplificação do gene *pstk* de *Trypanosoma brucei* visualizado em gel de agarose 1% em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2, 3 e 4) reação de amplificação do gene *pstk* de *T. brucei* (1083pb) com a enzima TITANIUM *Taq* DNA Polimerase.

Foi obtido um fragmento de 1083 pares de bases (pb) pela reação de PCR referente ao gene *pstk* de *T. brucei* que foi purificado do gel e adenilado para utilizar na clonagem dos vetores pGEM-T e pTZ57R. A seleção de colônias recombinantes foi determinada pela técnica de PCR. A figura 24 mostra a confirmação de um clone positivo de cada construção, porém foram obtidos 4 clones positivos para a construção pGEM-T/*pstk* e 3 para pTZ57R/*pstk*.

Figura 24 - Resultado da reação de PCR para amplificação do gene *pstk* a partir dos DNAs plasmidiais de um dos clones obtidos das construções pGEM-T/*pstk* e pTZ57R/*pstk* visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2 e 3) reação de PCR do clone 1 e clone 2, respectivamente, de pTZ57R/*pstk*.

3.4.2 Análise dos plasmídeos seqüenciados

A mesma análise já citada no item 3.2.2 foi realizada com os clones obtidos nesta etapa e o resultado foi semelhante, ou seja, trata-se de mutantes e não do gene de interesse.

Capítulo 4

Nesse capítulo é feita uma descrição geral sobre os procedimentos realizados e os resultados obtidos com o gene pstk de *Leishmania major*. Resumidamente os experimentos realizados foram a clonagem do gene, análise da sua seqüência, sub-clonagem em vetor de expressão específico e testes de expressão e solubilidade protéica.

4.1 Metodologia

4.1.1 Amplificação e subclonagem do gene

Tabela 10 - Dados sobre a PSTK de *L. major* extraídos de programas de predição (Expasy)

PSTK de <i>Leishmania major</i>				
Nucleotídeos	Aminoácidos	Massa Molecular	Oligomerização	pI
1338	445	49.9kDa	Dímero	7.0

```

atggcacaggctccatcatctccgttatcgccgcacccgctcagcgcttctcttcttggtc
M A Q A P S S P L S P H P S A L L F L V
accggcatcccagctgctggaaagtccacttttcttgccgctgcgacgcccacgtcctc
T G I P A A G K S T F L A A A Q R H V L
caacgcgatagcatctcgggaaaagtgcgctcttccggtgggcgctgccacggctgcata
Q R D S I S G K V P L F G G R C H G R I
tgtgctgtgctggagctcgacaaagtgcgcagatctcgatgcccgaacagtgcgcgag
C A V L E L D K V L A D L D A A T V R E
aaagacacagctgcctcagcaggggagcataagtttagcccgcgactttggaggcgagcc
K D T A A S A G E H K F S P R L W R R A
acgaggcgggctgctggaactgactcagtcagcgctgcgacgtgtattgcccgcacccgtc
T R R L L E L T Q S A L R T C I A G T V
aacggtgacgcgacggagaacgcggtgggtcccatgggtctttgtggaggacaacatgcac
N G D A T E N A V V P M V F V E D N M H
taccggagcatgcgagagcgctattatcaggtgtgcccgcacccctggaacgagaagagtat
Y R S M R E R Y Y Q V C R T L E R E E Y
tctctccagtcgtcgagaaagacccgacagccgcggggcagtcacggcagggccctcatt
S L Q S S Q K D P T A A G Q S R Q A L I
gtacttttcgagctccgcttcgccacgcgctggccgtgtgccttgacgcaatgcacag
V L F E L R F A T P L A V C L A R N A Q
cgtggtaatcctcgagaagggtccggcaaagagcaggcacgcgcatctgcgtgggtgcc
R G N P R E G S G K E Q A R A S A W V P
ccgccgtaatctgctctatggatgccttgctgatcactgctacgagaccgcccaccct
P P V I C S M D A L F D H C Y E T A D P
gcggaccatgcggcggtgggcaccatgtcactggaatgagtggcagtggaactgcaacgacc
A D H A A W A P C H W N E W Q W T A T T
cagccgtgggggctgctcgtgcatgccacgcaaggtgctgaggcggatgagatgtgtcct
Q P W G L L V H A T Q G A E A D E M C P
accgcaatgtcagaaacggcagcgtgtttctttgacgtagcgctacagcggcctgaggcg
T A M S E T A A C F F D V A L Q R P E A
tgggacgcgtgccaaagagcagtgccggaacatcgcccgctctcggcttcagcggctgcgc
W D A C Q E Q C R N I A R S R L Q R L R
gacgacgagcagatggatgagaccacgcgtctccggcggtgccgcccagactgtcgaatct
D D E Q M D E T T R L R R A A E T V E S
tacacgcacatcagctggacctgcagcttcggggcgctcgtgcacgcgttccttcgccagcag
Y T H Q L D L Q L R G V V H A F L R Q Q
aatcagcagaaagcgtatgggactgacgctgccccacgccgcagcagcgccctattt
N Q Q K A Y G T D A A P T P Q R A A L F
cgcagaaggattgtagtcgcgaagaaaggccacacagcagttcaaggtgcagctgcga
R R R I V V A K K E A T Q Q F K V Q L R
caactgaacacccgcaaaacacgaacggatagacacgatcaccattgacttgctcggcagt
Q L N T A K H E R I D T I T I D L L G S
ggcattgatgacattcaggagtcgcgttcgttcaacagttccagcaacatctgctagacctc
G I D D I Q E S V V Q Q F Q Q H L L D L
tggcgagaacttgagtaa
W R E L E -

```

Figura 25 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da PSTK de *L. major* traduzida utilizando o programa Expsy.

Para a amplificação do gene *psk* de *L. major*, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos com sítios de clivagem para as enzimas de restrição

Nhe I e *Hind* III para posterior clonagem em vetor de expressão. A sequência dos oligonucleotídeos segue abaixo:

Lm pstk sense:

5' CGG CTA GCA TGG CAG AGC TCC ATC TCC GTT ATC GCC GCA 3'
Nhe I

Tb pstk antisense:

5' CCC AAG CTT TTA CTC AAG TTC TCG CCA GAG GTC TAG CAG ATG 3'
Hind III

O gene foi amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR), a partir do DNA genômico de *Leishmania major*, gentilmente cedido pela doutora Susana Andréa Sculaccio. A reação foi feita segundo condições descritas na tabela 11.

Tabela 11 - Reagentes utilizados na reação de amplificação do gene pstk de *L. major*.

Mistura de reação de amplificação	Volume (µL)
Tampão da enzima [10X]	5
dNTP 10mM (N = A, G, C, T)	1
Oligonucleotídeo 10µM (sense)	1
Oligonucleotídeo 10µM (reverse)	1
DNA molde (genômico) 50ng/µL	2
TITANIUM <i>Taq</i> DNA polimerase [50X]	1
H ₂ O q.s.p.	50

A fase de leitura (ORF) do gene foi amplificada sob condições descritas na figura 26, executada no termocilcador PTC – 100TM Programable Thermal Controller (MJ Research Inc.).

Figura 26 - Ciclo da reação de PCR utilizado para a amplificação do gene.

Após a reação de PCR, os fragmentos de DNA obtidos foram analisados em gel de agarose preparativo (BioRad) 1% marcado com brometo de etídio (0,5µg/mL) em tampão TAE 1X (8mM Tris-acetato, 0,2mM EDTA pH=8,0) e purificados a partir

deste gel utilizando-se o kit “Perfectprep Gel Cleanup” (Eppendorf) de acordo com as condições do fabricante. O produto foi quantificado e adenilado de acordo com as condições descritas na tabela 12.

Tabela 12 - Reagentes utilizados na reação de adenilação do gene *pstk* de *L. major*.

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

Esta reação ocorreu a 72°C por 15 minutos. Posteriormente, se fez uma precipitação com fenol/clorofórmio para retirar o excesso da enzima, segundo procedimento citado no item 3.1.1. Em seguida, o DNA foi quantificado e preparou-se a reação de ligação com o vetor de clonagem.

4.1.2 Clonagem do gene *pstk* de *L. major*

Para a clonagem foi utilizado o vetor pTZ57R (Fermentas), já apresentado na figura 14, que também é um conveniente sistema para clonagem, pois possui em suas extremidades uma timidina 3' terminal que aumenta a eficiência de ligação do gene adenilado, da mesma forma que o vetor pGEM-T (figura 13). A clonagem foi realizada seguindo a reação descrita no capítulo anterior (tabela 6).

A reação foi então incubada a 22°C por 16 horas e depois o volume total de ligação foi utilizado na transformação em células competentes de *E. coli* DH5α.

4.1.2.1 Transformação do produto de ligação ao vetor pTZ57R

Alíquotas de 50μL de células competentes estocadas a -80°C, previamente descongeladas foram misturadas ao produto da reação de ligação e

cuidadosamente homogeneizadas. Em seguida, realizou-se um choque térmico a 42°C de 90 segundos seguido por 3 minutos em gelo. Foi adicionado 250µL de meio LB (Luria Bertane) às células que permaneceram em agitação a 250 rpm por 1 hora a 37°C. Posteriormente, 100 µL e 200µL foram transferidos para placas de meio sólido LB ágar contendo 100µg/mL de ampicilina, 0,5mM de IPTG e 80µg/mL de X-Gal. Estas foram incubadas durante a noite a 37°C. Após esse período de crescimento, escolheram-se algumas colônias para serem analisadas.

4.1.2.2 Caracterização das colônias de *E.coli* DH5α recombinantes

Para proceder à expressão do produto gênico, a checagem da eficiência da clonagem faz-se necessário. Esta por sua vez foi verificada pela extração do DNA recombinante das colônias escolhidas e clivagem com as enzimas de restrição que flanqueiam o gene.

Algumas colônias brancas da placa foram selecionadas, transferidas para meio LB líquido contendo o respectivo antibiótico exigido pelo vetor para extração de seus DNAs plasmidiais utilizando-se o kit Minipreps Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) e a confirmação dos plasmídeos recombinantes pela digestão com as enzimas de restrição.

Para reação de digestão, utilizou-se 0,5µg de DNA plasmidial, 1,5µL da enzima *Nhe* I, 1,5uL da enzima *Hind* III ambas com 10U/µL (Fermentas), 5µL de tampão apropriado, 2µL de BSA (50mM – BioLabs) e completou-se a reação para 50µL com água milli-Q autoclavada permanecendo por 4 horas a 37°C. Após análise em gel de agarose 1%, os DNAs recombinantes foram enviados para sequenciamento, utilizando oligonucleotídeos 5' e 3' do vetor pTZ57R e oligonucleotídeos internos específicos (sense e antisense) (tabela 13) para o gene *pstk* de *L. major*.

Tabela 13 - Sequência dos oligonucleotídeos internos específicos para o gene pstk de *L. major*.

Oligonucleotídeo	Sequência dos oligos 5'- 3'
LmjPSTK1	TTA GCC CGC GAC TTT GGA G
LmjPSTK2	TGG AGG ACA TGC ACT ACC G
LmjPSTK3R	GCG GCA CAC CTG ATA GCG
LmjPSTK4	CGG CAG CGT TCT TTG AC
LmjPSTK5R	CAG CTG ATG CGT GTA AGA TTC G

4.1.3 Análise dos plasmídeos seqüenciados

As seqüências obtidas pelo sequenciamento foram comparadas com a seqüência genômica depositada no NCBI por (Ivens, A.C. *et al*, 2005) para o gene pstk de *L. major*, utilizando o do programa Seqman (Lasergene Sequence Analysis Software – DNASTAR).

4.1.4 Subclonagem do gene pstk de *L. major* em vetor pET28a.

Os plasmídeos do sistema pET foram desenvolvidos para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes de *E. coli* e apresentam um alto grau de eficiência. A escolha do vetor de expressão pET28a (figura 27) deve-se aos ótimos resultados de expressão promovida por tal vetor que se utiliza de uma região promotora T7 anteriormente localizada ao inserto do gene em estudo e a um bom sistema de controle de indução através da variação da quantidade ministrada do indutor Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside (IPTG). Outra vantagem desse vetor é expressar a proteína de interesse com uma seqüência codificante N-terminal portadora de seis histidinas que auxilia na sua purificação. Essa cauda de histidina é separada do gene por uma região de reconhecimento pela enzima Trombina podendo posteriormente ser clivada para sua retirada, após a purificação da proteína PSTK.

Figura 27 - Mapa do vetor pET28a (disponível em: <<http://www.merckbiosciences.com>>).

Inicialmente o inserto pstk que continha a sequência correta, foi purificado de gel de agarose 1% pelo Kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf), quantificado e digerido utilizando-se as enzimas de restrição *Nhe I* e *Hind III* que flanqueiam suas extremidades. Para a reação de digestão utilizou-se aproximadamente 6µg do inserto amplificado, 1,0µL de enzima *Hind III* [10U/µL], 1,0µL de enzima *Nhe I* [10U/µL], 3,0µL de tampão apropriado, 2,0 µL de BSA [50mM] e completou-se a reação para 30µL com água milli-Q autoclavada permanecendo essa mistura a 37°C por 4 horas.

Do mesmo modo o vetor pET28a foi purificado de gel de agarose 1%, quantificado e digerido utilizando-se as mesmas enzimas que flanqueiam o inserto pstk. Para a reação de digestão foram utilizados aproximadamente 2,6µg do DNA plasmidial pET28a, 1,0µL de enzima *Hind III* [10U/µL] e 1,0 µL *Nhe I* [10U/µL], 3,0µL de tampão apropriado, 2,0 µL de BSA [50mM] e completou-se a reação para 30µL com água milli-Q autoclavada também permanecendo essa mistura a 37°C por 4 horas.

O inserto digerido foi então ligado ao vetor também digerido com sítios de clonagens complementares. A reação de ligação foi de aproximadamente 16 horas a 16°C, utilizando 250ng de DNA plasmidial digerido, 180ng de inserto digerido, 1,0µL de enzima T4 DNA Ligase [3U/µL] e 1,5µL do seu respectivo tampão para uma concentração final de [1X] resultando em um volume final de 15µL de reação.

Uma nova transformação foi realizada com as cepas de *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta e Origami. O protocolo de transformação utilizado foi o mesmo citado acima para *E.coli* DH5 α , sendo que, quando transformada em Origami adicionou-se também o antibiótico tetraciclina [15 μ g/ml] e em Rosetta o antibiótico clorofenicol [34 μ g/ml]. Mais uma vez, colônias recombinantes foram analisadas através da extração de seus DNAs plasmídias em gel de agarose para confirmar a presença do inserto estudado.

4.1.5 Expressão da proteína codificada pelo gene pstk de *L. major*

4.1.5.a) Cepa de expressão *E. coli* Origami.

Um pré-inóculo de 5mL contendo cepas Origami transformadas com a construção pET28a-pstk foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seus respectivos antibióticos kanamicina [25 μ g/mL] e tetraciclina[15 μ g/ml]. Da mesma forma, um controle negativo de cepas Origami transformadas com pET28a foi cultivado. Depois de atingida a saturação do meio de cultura uma alíquota de 50 μ L (1:100) de cada um dos pré-inóculos foi transferido para um novo tubo de LB+kanamicina+tetraciclina que permaneceu sob agitação de 250rpm a 37° C até atingida uma densidade ótica (D.O_{600nm}) de aproximadamente 0.6.

Teste 1

Separou-se em quatro alíquotas: 1) 0,5mM do indutor IPTG; 2) 1,0mM do indutor IPTG; 3) 0,5mM do indutor IPTG; 4) 1,0mM do indutor IPTG; foram adicionados aos tubos de cultura para início da expressão que prolongou-se por 4

horas sob mesmas condições de agitação e temperatura tubos 1 e 2 e 20 horas sob temperatura de 20° C tubos 3 e 4.

Terminado o período de indução as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 6000rpm. Os precipitados foram dissolvidos em 2mL de tampão A (20mM Tris /HCl pH = 8.0, 300mM NaCl) e alíquotas referentes a cada um dos precipitados dissolvidos foram retiradas e misturadas a tampão TA [3X] contendo β -mercaptoetanol na proporção 1:2 (amostra: tampão) e colocadas sob gelo para posterior análise em SDS-PAGE 15%. Ao precipitado dissolvido (construção pET28a-pstk) foi adicionado [10 μ g/mL] de Lisozima permanecendo em repouso sob gelo por 30 minutos para facilitar o rompimento da parede celular. Decorrido esse tempo, a amostra foi sonicada com 4 pulsos de 15 segundos cada com intensidade 4 (aproximadamente 110 Watts) e intervalos entre eles de 30 segundos. Novamente uma alíquota foi retirada após a sonicação para verificação de eventuais perdas da proteína em estudo.

A cultura sonicada foi centrifugada por 30 minutos a 13000rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente uma alíquota foi retirada. O precipitado formado foi dissolvido em 2mL de tampão B (20mM Tris /HCl pH = 8.0, 300mM NaCl e 10mM Imidazol) para retirada de nova alíquota.

As alíquotas foram então fervidas 10 minutos e posteriormente analisadas em SDS-PAGE 15% para verificação da solubilidade da proteína PSTK.

Teste 2

Separou-se em quatro alíquotas: 1) Sem a presença do indutor IPTG; 2) 0,1mM do indutor IPTG; 3) 0,3mM do indutor IPTG; 4) 0,7mM do indutor IPTG; foram adicionados aos tubos de cultura para início da expressão que prolongou-se por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação.

Terminado o período de indução foram seguidos os mesmo passos já citados em teste 1.

Teste 3

Separou-se em três alíquotas: 1) 0,3mM do indutor IPTG+ Rifampicina [150µg/mL]; 2) D.O_{600nm} de 0,3, abaixou-se a temperatura para 20° C, deixou por 2 horas e em seguida adicionou-se 0,3mM do indutor IPTG; 3) 0,6mM do indutor IPTG + o mesmo volume da alíquota de meio de cultura (meio enriquecido); para início da expressão que prolongou-se por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação.

Terminado o período de indução foram seguidos os mesmos passos já citados em teste 1.

4.1.5.b) Cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3).

Um pré-inóculo de 5mL contendo cepas *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com a construção pET28a-pstk foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seu respectivo antibiótico kanamicina [30µg/mL]. Da mesma forma um controle negativo de cepas *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com pET28a foi cultivado.

Após atingida a saturação do meio de cultura, uma alíquota de 50µL (1:100) de cada um dos pré-inóculos foi transferida para um novo tubo de LB+kanamicina que permaneceu sob agitação de 250rpm a 37° C até atingida uma densidade ótica (D.O_{600nm}) de aproximadamente 0.6. Adicionou-se 0,3mM do indutor IPTG ao tubo de cultura para início da expressão que prolongou-se por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação.

Terminado o período de indução foram seguidos os mesmos passos já citados em teste 1.

4.1.5.c) Cepa de expressão *E. coli* Rosetta.

Um pré-inóculo de 5mL contendo cepas *E. coli* Rosetta transformadas com a construção pET28a-pstk foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seus respectivos

antibióticos kanamicina [30µg/mL] + clorofenicol [34µg/ml]. Da mesma forma um controle negativo de cepas *E. coli* Rosetta transformadas com pET28a foi cultivado.

Após atingida a saturação do meio de cultura uma alíquota de 50µL (1:100) de cada um dos pré-inóculos foi transferida para um novo tubo de LB+kanamicina+clorofenicol que permaneceu sob agitação de 250rpm a 37° C até atingindo uma densidade ótica ($D.O_{600nm}$) de aproximadamente 0.6. Adicionou-se 0,3mM do indutor IPTG ao tubo de cultura para início da expressão que prolongou-se por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação.

Terminado o período de indução foram seguidos os mesmo passos já citados em teste 1.

4.2 Resultados

4.2.1 Amplificação e subclonagem do gene pstk de *L. major*

Utilizando os oligonucleotídeos específicos, foi possível amplificar a fase de leitura (ORF) do gene pstk de *L. major* por PCR, utilizando a enzima TITANIUM *Taq* DNA polimerase. O resultado obtido na amplificação é mostrado na figura abaixo.

Figura 28 - Verificação da amplificação do gene *pstk* de *Leishmania major* em gel de agarose 1% em TAE [1X]. 1) marcadores de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de amplificação do gene *pstk* de *L. major* (1338 pb).

Pelo gel de agarose, os fragmentos de DNA obtidos apresentaram uma migração aproximada de 1338 pb, confirmando a amplificação do gene desejado que, posteriormente foi purificado do gel e adenilado para realizar a reação de ligação no vetor pTZ57R. A seleção de colônias recombinantes foi determinada pela clivagem das construções pTZ57R/*pstk* (figura 29), realizada com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Hind* III.

Figura 29 - Análise da reação de digestão dos DNAs plasmidiais em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcadores de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de digestão com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Hind* III do clone 1; 3) clone 2; 4) clone 3; 5) clone 4; 6) clone 5; 7) clone 6, obtidos pela construção pTZ57R/*pstk*.

4.2.2 Análise dos plasmídeos seqüenciados

O sequenciamento do gene *pstk* de *L. major* foi realizado pelo método de Sanger através do equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela técnica de laboratório Dr^a Susana A. Sculaccio. As cinco colônias positivas obtidas para a construção pTZ57R/*pstk* foram analisadas através do programa SeqMan (DNASTAR) tendo como base a seqüência genômica depositada para o gene *pstk* de *L. major*. Analisou-se também o eletroferograma, porém neste caso os clones analisados não continham mutações.

Os oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento cobriam de maneira satisfatória todo o gene estudado, como pode ser visto na figura 30. Isso foi preservado para todos os clones seqüenciados.

Figura 30 - Representação da porção coberta por cada oligonucleotídeo no alinhamento produzido pelo programa SeqMan para o gene *LmjPSTK*. As setas indicam a alinhamento da extremidade 5' (esquerda pra direita) e da extremidade 3' (direita pra esquerda).

LmjPSTK-origi	1	MAQAPSSPLSPHPSALLFLVTGIPAAGKSTFLAAAQRHVLQRDSISGKVP	50
LmjPSTK-clone	1	MAQAPSSPLSPHPSALLFLVTGIPAAGKSTFLAAAQRHVLQRDSISGKVP	50
LmjPSTK-origi	51	LFGGRCHGRICAVLELDKVLADLDAATVREKDTAASAGEHKFSPRLWRRRA	100
LmjPSTK-clone	51	LFGGRCHGRICAVLELDKVLADLDAATVREKDTAASAGEHKFSPRLWRRRA	100
LmjPSTK-origi	101	TRRLELTQSALRTCIAGTVNGDATENAVVPMVFVEDNMHYRSMRERYQ	150
LmjPSTK-clone	101	TRRLELTQSALRTCIAGTVNGDATENAVVPMVFVEDNMHYRSMRERYQ	150
LmjPSTK-origi	151	VCRTLEREESYSLQSSQKDPAAAGQSRQALIVLFELRFATPLAVCLARNAQ	200
LmjPSTK-clone	151	VCRTLEREESYSLQSSQKDPAAAGQSRQALIVLFELRFATPLAVCLARNAQ	200
LmjPSTK-origi	201	RGNPREGSGKEQARASAWVPPFVICSMDALFDHCYETADPADHAAWAPCH	250
LmjPSTK-clone	201	RGNPREGSGKEQARASAWVPPFVICSMDALFDHCYETADPADHAAWAPCH	250
LmjPSTK-origi	251	WNEWQWTATTQPWGLLVHATQGAEMCPTAMSETAACFFDVALQRPEA	300
LmjPSTK-clone	251	WNEWQWTATTQPWGLLVHATQGAEMCPTAMSETAACFFDVALQRPEA	300
LmjPSTK-origi	301	WDACQEQCRNIARSRLQRLRDDEQMDTTLRRAAETVESYTHQLDLQLR	350
LmjPSTK-clone	301	WDACQEQCRNIARSRLQRLRDDEQMDTTLRRAAETVESYTHQLDLQLR	350
LmjPSTK-origi	351	GVVHAFLRQQNQKAYGTDAAPTQRAALFRRRIVVAKKEATQQFKVQLR	400
LmjPSTK-clone	351	GVVHAFLRQQNQKAYGTDAAPTQRAALFRRRIVVAKKEATQQFKVQLR	400
LmjPSTK-origi	401	QLNTAKHERIDTITIDLLGSGIDDIQESVVQQFQQHLLDLWRELE	445
LmjPSTK-clone	401	QLNTAKHERIDTITIDLLGSGIDDIQESVVQQFQQHLLDLWRELE	445
Length: 445			
Identity: 445/445 (100.0%)			
Similarity: 445/445 (100.0%)			

Figura 31 -Análise comparativa das seqüências de aminoácidos de um clone obtido com a seqüência original da proteína *LmjPSTK*. Análise realizada em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>>.

4.2.3 Subclonagem do gene pstk de *L. major* em vetor pET28a.

Foi realizada a digestão do inserto pstk e do vetor pET28a com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Hind* III como mostra a figura 32 do gel de agarose.

Figura 32 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcadores de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2) reação de digestão com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Hind* III do clone 1; 3) pET28 sem digerir; pET28 digerido com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Hind* III.

O inserto digerido foi então ligado ao vetor também digerido com sítios de clonagens complementares. A ligação foi transformada em células competentes DH5 α e novamente verificou-se qual colônia era positiva como mostrado na figura abaixo:

Figura 33 - Análise do padrão de digestão por enzimas de restrição dos DNAs plasmidiais visualizado em gel de agarose 1% após eletroforese em TAE [1X]. 1) marcadores de massa molecular 1 Kb Plus (Fermentas); 2), 3), 4), 5), 6) e 7) reação de digestão dos clones 1, 2, 3, 4, 5 e 6 com as enzimas de restrição *Nhe* I e *Hind* III do vetor pET28 com o inserto do gene *pstk* de *L. major*.

Dentre estes, foi escolhido um plasmídeo (clone 6) que foi transformado em *E. coli* cepas BL21 (DE3), Rosetta e Origami seguindo os mesmos passos utilizados para a DH5 α , sendo que quando transformada em Origami adicionou-se também o antibiótico tetraciclina [15 μ g/ml] e em Rosetta o antibiótico clorofenicol [34 μ g/ml].

4.2.5 Expressão da proteína codificada pelo gene pstk de *L. major*

4.2.5a) Cepa de expressão *E. coli* Origami.

Teste 1

Os ensaios de expressão da proteína PSTK demonstraram que esta se apresentava solúvel, porém em pequena quantidade, como visualizada nos géis de poliacrilamida 15% (figuras 34 e 35).

Figura 34 - Análise da expressão da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) lisado 37°C + 0.5mM IPTG; 2) lisado 20°C + 1mM IPTG; 3) lisado 20°C + 0.5mM IPTG; 4) induzido 37°C+1mM IPTG; 5) induzido 37°C+0.5mM IPTG; 6) induzido 20°C+1mM IPTG; 7) induzido 20°C+0.5mM IPTG; 8) Sem induzir; 9) Controle negativo; 10) Padrão de massa molecular.

Figura 35 - Análise da expressão e localização (sobrenadante ou fração insolúvel) da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) lisado 37°C + 1mM IPTG; 2) fração insolúvel 20°C + 0.5mM IPTG; 3) fração insolúvel 20°C + 1mM IPTG; 4) fração insolúvel 37°C + 0.5mM IPTG; 5) fração insolúvel 37°C + 1mM IPTG; 6) sobrenadante 20°C + 0.5mM IPTG; 7) sobrenadante 20°C + 1mM IPTG; 8) sobrenadante 37°C + 0.5mM IPTG; 9) sobrenadante 37°C + 1mM IPTG; 10) Padrão de massa molecular.

Nota-se uma pequena banda na coluna 7 (seta vermelha) da figura 34 que é a expressão bacteriana com o inserto que não está presente quando comparado com o controle negativo (expressão das proteínas da bactéria sem o inserto). Porém essa fração não era suficiente para dar prosseguimento aos experimentos de purificação.

Teste 2

Os resultados obtidos no teste 2 a fim de aumentar a produção protéica não foram satisfatórios (figura 36).

Figura 36 - Análise da expressão e localização (sobrenadante ou fração insolúvel) da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) Padrão de massa molecular; 2) Fração insolúvel sem IPTG; 3) Fração solúvel sem IPTG; 4) Fração insolúvel com 0,1mM IPTG; 5) Fração solúvel com 0,1mM IPTG; 6) Fração insolúvel com 0,3mM IPTG; 7) Fração solúvel com 0,3mM IPTG; 8) Fração insolúvel com 0,7mM IPTG; 9) Fração solúvel com 0,7mM IPTG.

Nota-se que não teve melhoras na expressão da *Lmj*PSTK com esses teste realizados.

Teste 3

Para tentar aumentar a expressão da proteína PSTK a fim de dar continuidade aos experimentos de caracterização protéica, realizaram-se várias modificações durante a expressão (figura 37 e 38), estas já citadas no item 4.1.5.(a).

Figura 37 - Análise da expressão da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) Padrão de massa molecular; 2) controle negativo; 3) amostra lisada proveniente de 0,3mM do indutor IPTG+ Rifampicina; 4) amostra lisada proveniente de 0,3mM do indutor IPTG; 5) amostra lisada proveniente de 0,6mM do indutor IPTG + meio enriquecido; 6) amostra lisada proveniente de D.O_{600nm} de 0,3, abaixou-se a temperatura para 20° C.

Figura 38 - Análise da expressão da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) fração insolúvel com rifampicina 2) sobrenadante com rifampicina; 3) fração insolúvel sem rifampicina; 4) sobrenadante sem rifampicina; 5) fração insolúvel enriquecido; 6) sobrenadante enriquecido; 7) fração insolúvel D.O_{600nm} de 0,3; 8) sobrenadante D.O_{600nm} de 0,3; 9) e 10) Padrão de massa molecular.

Porém os resultados obtidos ainda não eram suficientes para dar continuidade aos experimentos de purificação.

Diante de todos os testes de expressão realizados, constatamos que a melhor condição era aquela em que era adicionado 0,5mM do agente indutor IPTG, e permanecia induzindo por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação. Então resolvemos mudar de cepa de expressão para verificar se a produção aumentava.

4.2.5.b) e c) Cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) e Rosetta.

Os ensaios de expressão da proteína PSTK nestas novas cepas, não demonstraram um aumento na produção da proteína de interesse, o que pode ser verificado na figura 39 e 40 do gel de poliacrilamida 15%.

Figura 39 - Análise da expressão da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) extrato bruto origami (controle negativo); 2) extrato bruto origami+inserto pstk; 3) extrato bruto BL21 (controle negativo); 4) extrato bruto BL21+ inserto pstk; 5) extrato bruto Rosetta controle negativo); 6) extrato bruto Rosetta+inserto pstk; 7) Padrão de massa molecular..

Figura 40 - Análise da expressão da PSTK de *L. major* em extratos de *E. coli* em SDS-PAGE 15%. 1) Padrão de massa molecular; 2) fração insolúvel BL21 (controle negativo); 3) fração insolúvel BL21+inserto pstk; 4) fração insolúvel Rosetta (controle negativo); 5) fração insolúvel Rosetta+inserto pstk; 6) sobrenadante BL21(controle negativo); 7) sobrenadante BL21+inserto pstk; 8) sobrenadante Rosetta(controle negativo); 9) sobrenadante Rosetta+inserto pstk;

Resumidamente, de todos os testes e modificações realizadas para melhorar a expressão protéica, a que melhor apresentou resultado foi em cepa de expressão Origami, induzindo com 0,3mM IPTG por 20 horas a 20° C. Porém, como já dito, a fração de proteína expressa obtida não era suficiente para dar prosseguimento aos experimentos de purificação. Foi analisada a seqüência de códons do gene pstk de

L. major através do programa SeqMan (DNASTAR) onde pode constatar-se que está seqüência era constituída de 20% de códons raros (Figura 41) para expressão em *E. coli*.

atg **aca** gtt **tgt** ctt gtt **cta** **cta** act **ggg** ctg **cca** **gga** gcg **ggg** aag acg **aca** **cta** ggc aag gct ctt aaa cag
 ttg **ggg** gat cac **ata** acc cat gaa **ctc** **tcc** **ctc** **ata** gtc acg gca gtg gtg gaa tta gat gac ttt atg **tgt** aac
 gtc ggt gcg **agt** aat **ggg** **tcc** cgt gta gag **agt** acc gtt ttc gat **cca** **agt** **cgg** tgg **cga** gag gcg ttc gaa
 gcg gct cgt cag gca act cgc cag gag ttg gag **cgg** **tgc** **cta** atg atg gag agg aat aaa gcg gta atg **cac**
 ttg gtt ttt ctg gtg gat ccg ctg **cca** tat agg **agt** atg **aga** gca **tgc** tac tgg aaa atg **tgc** aag gaa tta **agt**
 gcc aag **tgt** gct gag act cac ttt cat gat **tca** tgg gaa gtg cag agc att gtt gtc ttg ttg gag gtg **cgg** atg
 aac acc ccg gag gag gtt **tgt** **ctc** caa cgc aat gag **ctc** cgc gcc **gga** acc ccg cag tat att **ccc** ccg tat
 gtt att aag **ggg** **ata** **agt** gac **tgc** ttt gac cgt ggt gac **ctc** act gct gtg ctg ccg ggt **aca** gac **gga** aat atg
 tgg gcc gta ctt **ccc** **ggg** cag **agg** **tgc** gca ccg tgg **ccc** gtt ctt tta ctg gtt gat gaa gtg **aga** **tgt** **tgc** gcg
tca **cca** **ccc** aat ttg ttg gcc acg cag ttg ctg gag cgt atc **cga** **ggg** gaa gac **ata** atg cgt gag atg acg
 gaa caa caa gta **agt** gtt ttt aat tat tac aag **tgc** caa gtg gaa **ggg** **ggg** aag **tgc** aag tg c ttg gcg **agt**
gga gaa gca cat gac aac gtt aac aac **tgt** ctt cat caa gtg gac **ctc** cac atg **cgg** gca gtt gtg **gga** cat tac
 atg gtc cag **cgg** cag **agt** att ggt **tca** ctg aag **cca** ggc act **ggg** caa cgc gta agc aaa **tgt** cgt **tgc** acc
 cac tac gcg **gga** att **cgg** gca gca atc acg aag **gga** acg **aga** aac **aca** **gga** **gga** tct ttt **tcc** gaa gtg caa
gga **cta** ctg cag cag tta ctt ttg gaa ttc gag cat gcc tta gta gat ctt

Figura 41 - Análise da freqüência de códons raros para expressão em *E. coli* do gene pstk de *L. major*, realizada no programa SeqMan. Destacado em amarelo os códons raros em *E. coli*.

Capítulo 5

Neste capítulo é feita uma descrição geral sobre os procedimentos realizados e os resultados obtidos com o gene da proteína Seril-tRNA Sintetase (SerRS) de *Trypanosoma brucei* (parte A) e com os Ser-tRNA^{Sec} e SELC (parte B). Resumidamente foram realizados experimentos visando obter um protocolo de purificação e estabilidade protéica em tampão apropriado da SerRS. A caracterização da proteína envolveu experimentos de gel nativo, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e anisotropia de fluorescência. Também foram desenvolvidos procedimentos com os tRNAs, para amplificações dos genes codificantes, transcrições *in vitro* e purificações necessárias para a obtenção dos transcritos apropriados. Experimentos preliminares de dicroísmo circular (CD) e anisotropia de fluorescência foram realizados para análise da estrutura secundária desse transcrito e verificação de sua ligação com a proteína SerRS.

Parte A

Gene da enzima Seril-tRNA Sintetase (SerRS) de *T. brucei*

5.1 Metodologia

5.1.1 Amplificação, clonagem, subclonagem, análise da sequência e expressão.

Tabela 14 - Dados sobre a SerRS de *T. brucei* extraídos de programas de predição (Expasy)

SerRS de <i>Trypanosoma brucei</i>				
Nucleotídeos	Aminoácidos	Massa Molecular	Oligomerização	pI
1440	479	53.8 kDa	Dímero	5.8

```

atgggtgcttgatatacagctgtttcgagacgagacgggtgcaaatatcatacgcgagtcg
M V L D I Q L F R D E T G A N I I R E S
cagcgccgcggttttgcgatcctgacattgttgacgctattatagaggcggacaaaaa
Q R R R F A D P D I V D A I I E A D K K
tggcgccgcacccagttcctcactgaggccagtaagaagctgatcaacatctgcagcaaa
W R R T Q F L T E A S K K L I N I C S K
gctgtgggagcaaaaaagaaagcaaaggaagccgatgggtgatacgtctgagatcccaccg
A V G A K K K A K E A D G D T S E I P P
caagtgaaggaggcggtatgaaaatgggacgctgaagggggaacagggtcgagcagctttgc
Q V K E A Y E N G T L K G E Q V E Q L C
gtcctgcagctgaaacagttgtcgaaggacctgtcggatcaagtggctggcctcgcaaaa
V L Q L K Q L S K D L S D Q V A G L A K
gaagcacaacagctggaagaggagcgggacaaactcatgcttaacgtgggtaacattttg
E A Q Q L E E E R D K L M L N V G N I L
catgagtcagtgccaatagcacaggatgaagaaactggtaacactgtggtgcgcaccttc
H E S V P I A Q D E E T G N T V V R T F
gggaatacgcgaagcgggcaaagcttaatatgtgtcaattatggagcgcacttggtatg
G N T T K R A K L N H V S I M E R L G M
atggacacctcaaaggcagttacctcaatggcaggtggccgttcttacgtgttgaaagggc
M D T S K A V T S M A G G R S Y V L K G
ggactcgttcagctgcaggtggctctcgtatcgtacagtccttgattttctcgtcaagcgg
G L V Q L Q V A L V S Y S L D F L V K R
ggctacacaccattctatcctccctttttcttgaacagggacgtcatgggcgaggtggcg
G Y T P F Y P P F F L N R D V M G E V A
cagctttcccaatttgacgaggagctataccaggtatctggggacggagacaaaaagtat
Q L S Q F D E E L Y Q V S G D G D K K Y
ttgatcgccaccagcgcagatgccaatcgccgcgtaccacccggggaaggtgggttcacggag
L I A T S E M P I A A Y H R G R W F T E
cttaaggaacccttgaaatacgccggaatgtccacgtgtttccgaaaggaagctggcgct
L K E P L K Y A G M S T C F R K E A G A
catggacgtgacactctcgggtattttccgagtgacaccaatttgataaaatagagcagttt
H G R D T L G I F R V H Q F D K I E Q F
gtcgtgtgtcacctcggcaggaggagtcgtggcgccacttagaggatatgattacaacc
V V C S P R Q E E S W R H L E D M I T T
tctgaggaatttaacaagagcctcggcctgccataccgcgctcgttaacatttgctccggt
S E E F N K S L G L P Y R V V N I C S G
gctttgaacaacgcgcagcaaagaagtacgatttggaggcttggttccctgcgtctggg
A L N N A A A K K Y D L E A W F P A S G
gcgttccgtgagctagtgtcatgttccaattgcaccgactaccagtcacaaagcgtgaat
A F R E L V S C S N C T D Y Q S Q S V N
tgccgttatggaccaaacctgcgtgggtacagccgctcagaatgtgaaggagtactgtcac
C R Y G P N L R G T A A Q N V K E Y C H

atgctgaatggcactctgtgtgtctattacacgcactatgtgtgtgtatttgcgagaactat
M L N G T L C A I T R T M C C I C E N Y
cagacggaggaaggtgttgttataccgatgtactccgcccgtacatgatgggaattgag
Q T E E G V V I P D V L R P Y M M G I E
atgataaggtttgagaacaacgctcaggcggagggaacgacacccgacaagggggagtg
M I R F E N N A Q A E G T T P D K G E -

```

Figura 42 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da SerRS de *T. brucei* traduzida utilizando o programa Expsy.

Todo o trabalho inicial com o gene da proteína Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei* (TbSerRS), o qual envolveu experimentos de amplificação, clonagem, subclonagem, análise da sequência e desenvolvimento de um protocolo de expressão foi realizado pela aluna de doutorado Joci Neuby Alves Macedo, como monitora na disciplina de Biologia Molecular do curso de graduação Ciências Físicas e Biomoleculares do Instituto de Física de São Carlos sob a supervisão do docente da disciplina Prof. Dr. Otavio H. Thiemann. O gene que codifica esta proteína foi clonado no vetor pTZ57R e subclonado no vetor pET28a.

5.1.2 Expressão da proteína codificada pelo gene *serrs* de *T. brucei*

Um pré-inóculo de 5mL contendo cepas *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com a construção pET28a-serrs foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seu respectivo antibiótico kanamicina [30µg/mL]. Após atingida a saturação do meio de cultura, uma alíquota de 50µL (1:100) do pré-inóculo foi transferida para um novo tubo de LB+kanamicina que permaneceu sob agitação de 250rpm a 37° C até atingida uma densidade ótica ($D.O_{600nm}$) de aproximadamente 0.6. Adicionou-se 0,1mM do indutor IPTG ao tubo de cultura para início da expressão que prolongou-se por 20 horas sob temperatura de 20° C e agitação.

Terminado o período de indução a cultura foi centrifugada por 15 minutos a 6000rpm. O precipitado foi dissolvido em 10mL de tampão A (50mM Tris/HCl pH = 7.6 e 10mM NaCl) e adicionou-se [10µg/mL] de lisozima permanecendo em repouso sob gelo por 30 minutos para facilitar o rompimento da parede celular. Decorrido esse tempo, a amostra passou por uma sequência (6 repetições) de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e depois foi sonicada com 4 pulsos de 15 segundos cada, intensidade 4 (aproximadamente 110 Watts) e intervalos entre eles de 30 segundos. A cultura sonicada foi centrifugada por 30 minutos a 13000rpm.

5.1.2 Purificação da proteína *TbSerRS*

Como a proteína de interesse, *TbSerRS*, é expressa no vetor pET28a com uma cauda N-terminal portadora de 6 histidinas e esta, por sua vez tem uma alta afinidade para ligação em resinas de cromatografia contendo um íon metálico, o primeiro passo de purificação empregado foi a cromatografia por afinidade, utilizando-se a resina “Ni-NTA Superflow” (Qiagen). Como segundo passo de purificação, empregamos a cromatografia por diferença de migração em uma resina porosa. Como o resultado obtido não foi satisfatório, resolvemos testar outros métodos para a purificação da proteína *TbSerRS*.

Após a lise celular, o sobrenadante foi aliquoteado em 4 frações e transferidas para béqueres em banho de gelo, aos quais foram acrescentados, aos poucos, diferentes concentrações de sulfato de amônio macerado e sob agitação constante (barra eletromagnética) nas seguintes concentrações finais: 1) 30% sulfato de amônio; 2) 40% sulfato de amônio; 3) 50% sulfato de amônio; 4) 60% sulfato de amônio. Após homogeneização, as frações foram centrifugadas por 20 minutos a 14000rpm, 4°C. As proteínas precipitadas pós-sulfato de amônio foram solubilizados em tampão A. Amostras desses passos foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

A fração precipitada com 60% de sulfato de amônio apresentou o melhor resultado (figura 47), então foi escolhida para fracionamento empregando interação hidrofóbica em resina de Phenyl Sepharose High Performance (Amersham Bioscience).

O precipitado da fração de 60% de sulfato de amônio foi ressuspensionado em tampão A e então aplicado na coluna Phenyl Sepharose (10mL), previamente equilibrada no tampão B (50mM Tris /HCl pH = 7.6, 10mM NaCl e 2M Sulfato de Amônio). A proteína de interesse foi eluída em um gradiente linear de sulfato de amônio de 2M a 0M. As frações eluídas, que apresentaram picos de absorbância à 280nm, foram analisadas em SDS-PAGE 15%.

O pico referente à proteína *TbSerRS* foi então aplicado à coluna de cromatografia por afinidade, utilizando-se a resina “Ni-NTA Superflow” (Qiagen), previamente equilibrada com 4 volumes de coluna (vc) do tampão A. Em seguida, a coluna foi lavada com 4vc de tampão C (50mM Tris/HCl pH = 7.6, 10mM NaCl e 20mM Imidazol) para retirada das proteínas que se ligaram fracamente à resina. A

proteína recombinante *TbSerRS* foi eluída da coluna com a aplicação de 2vc do tampão D (50mM Tris /HCl pH = 7.6, 10mM NaCl, 500mM Imidazol e 5% Glicerol). As frações foram analisadas em SDS-PAGE 15%, como descrito anteriormente. A proteína foi dialisada em tampão E (50mM Tris /HCl pH = 7.6, 10mM NaCl, 5mM DTT e 5% Glicerol) para os experimentos seguintes, pois foi neste tampão que a proteína apresentou maior estabilidade após diversos testes.

5.1.3 Determinação Estrutural da Proteína *TbSerRS*

Tendo como objetivo a caracterização do estado de oligomerização da proteína Seril-tRNA Sintetase (*SerRS*) foram empregadas as técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) e eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas.

5.1.3.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

Medidas de espalhamento dinâmico de luz ("Dynamic Light Scattering" ou DLS) foram empregadas utilizando o equipamento "Protein Solutions DynaPro" para a determinação da forma oligomérica da *TbSerRS*. A técnica de DLS mede a intensidade de luz espalhada por moléculas em solução (figura 43), isto é, o coeficiente de difusão translacional. Na prática, as macromoléculas em solução não são esféricas e o raio calculado a partir do coeficiente de difusão das partículas oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula hidratada ou solvatada. Esta medida é designada de "raio hidrodinâmico". O raio hidrodinâmico inclui o efeito decorrente da forma e da hidratação das partículas a partir de modelos estimados. Desta maneira, a técnica pode fornecer informações sobre a homogeneidade estrutural da amostra, em relação à presença ou ausência de agregados e também

fornecer uma estimativa da massa molecular das moléculas espalhadoras de luz (BERNE; PECORA, 1976) e os parâmetros utilizados na medida estão na tabela 15.

Figura 43 - Esquema representativo de um experimento de DLS. Os centros espalhadores são as moléculas de proteína em solução.

Tabela 15 - Parâmetros utilizados no experimento de DLS.

Parâmetros	
Solvente	5% de glicerol
Tempo de aquisição	2,5 segundos
Sensibilidade	Variação de 60 – 100%
pH da solução	7,6
Concentração da proteína	5mg/mL

5.1.3.2 Estudo do estado de oligomerização da *TbSerRS* através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)

O estado de oligomerização da *TbSerRS* também foi analisado através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes. “Native PAGE - Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis” que é uma das técnicas utilizadas para o estudo da composição e estrutura de proteínas nativas, uma vez

que a conformação e a atividade biológica das proteínas permanecem intactas durante esta técnica. Tal metodologia separa as proteínas com base em tamanhos, cargas resultantes e conformações das mesmas. Géis formados por gradiente de poliacrilamida comprimem as bandas de proteína e aumentam a faixa de resolução para análise dos tipos moleculares presentes. O gradiente no gel de separação determina o campo de separação por massa molecular, possível de se analisar em uma corrida. Para proteínas nativas e globulares de tamanho entre 66-669kDa, o gradiente de 8-25% de poliacrilamida é indicado (Amersham Biosciences) a fim de obter uma relação linear entre a distância de migração da proteína e o logaritmo de sua massa molecular. A distância de migração de proteínas não globulares ou com excesso de cargas pode não ser proporcional ao logaritmo da massa molecular resultando em estimativas incorretas de massa molecular.

Para a realização deste estudo empregou-se o equipamento “PhastSystem” (Amersham Biosciences) e géis prontos “PhastGel gradient media” 8-25% (Amersham Biosciences). O sistema de tampão empregado foi de tiras de tampão geleificado em agarose contendo 0,88M de L-alanina e 0,25M Tris, pH 8,8 fornecidas pelo fabricante do gel (Amersham Biosciences).

Aplicou-se no gel 4,0µl de *TbSerRS* pura a 1,0mg/mL juntamente com as proteínas padrões do Kit da Amersham Biosciences que já possuem massas moleculares definidas (tabela 16). A eletroforese foi efetuada sob condições padrão do equipamento (descritas no manual) e as proteínas foram coradas com 0,1% de “Comassie Blue R”, em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%.

Tabela 16 - Massas moleculares das proteínas padrão (Amersham Biosciences) utilizado no experimento de gel nativo

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

5.1.4 Ensaios cristalográficos da proteína Seril-tRNA Sintetase

A determinação da estrutura tridimensional de uma proteína por difração de Raios-X é um processo que possui como uma das etapas críticas, a obtenção de um mono cristal de proteína. Um cristal de proteína é formado por moléculas idênticas que se repetem num arranjo tridimensional ordenado e periódico. A formação de um cristal é dependente de vários parâmetros, como pH da solução, temperatura, concentração de proteína e a natureza do tampão e do agente precipitante. Uma das metodologias utilizadas para a cristalização de proteínas é a difusão de vapor. Neste método, a técnica mais usada é a gota suspensa (figura 44), na qual a gota contendo solução de proteína misturada à solução contendo o agente precipitante é exposta gradualmente à saturação pela perda de água da gota para o reservatório que contém o agente precipitante em maior concentração. Alcançadas as condições ideais para a proteína de interesse, esta difusão de vapor ocorre lentamente, possibilitando o arranjo das moléculas de forma ordenada, resultando na formação do cristal e não na formação de um precipitado amorfo (DRENTH, 1994 e RHODES, 1993).

Figura 44 - a) Esquema representando a placa de cristalização por gota suspensa; b) Esquema de um poço, em vista lateral, ilustrando a técnica de gota suspensa.

Com o intuito de buscar uma condição promissora para a cristalização da Seril-tRNA Sintetase, foi feita uma varredura com vários tampões, contendo diferentes agentes precipitantes dos Fatoriais “Crystal Screen Reagent Formulation I”, “Crystal Screen Reagent Formulation II” e “Grid Screen Ammonium Sulphate” (Hampton Research).

A cada poço de cristalização foram adicionados 500µL de solução precipitante. Em uma lamínula siliconizada fez-se uma gota contendo 2µL de

solução precipitante (solução do poço) mais 2 μL da solução de proteína (5mg/mL), sendo esta lamínula vedada na borda do poço usando graxa de vácuo (figura 44 b). Os ensaios de cristalização foram realizados a temperatura de 18°C.

5.1.5 Anisotropia de Fluorescência

A técnica de anisotropia de fluorescência mede, indiretamente, a movimentação de moléculas em solução, pela emissão de luz pelo cromóforo excitado em um comprimento de onda determinado, onde complexos maiores possuirão maiores valores de anisotropia por se moverem mais lentamente. Neste experimento as amostras são excitadas com uma luz verticalmente polarizada (LAKOWICZ, 2002). A anisotropia foi utilizada para investigar forças dominantes envolvidas na interação proteína-proteína (*TbSerRS-TbSerRS*), com o objetivo de se determinar a concentração mínima em que a proteína se apresenta totalmente na forma dimérica (forma ativa). Esses dados são essenciais para futuros experimentos de determinação das constantes de associação do complexo *TbSerRS* com seus diferentes tRNAs, saber se este tipo de interação é cooperativa e quais elementos facilitam ou dificultam a ligação no tRNA.

Todas as medidas foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS_PCI (ISS, Champaign, IL), montado em geometria L, à 18°C, como esquematizado na figura 45.

Figura 45 - Esquema do Espectrofluorímetro montado em geometria L (Figura extraída de LAKOWICZ, 2002).

Para a aplicação da técnica ao sistema estudado, houve a necessidade de marcar a proteína *TbSerRS* com um fluoróforo (sonda) que não interferisse nos comprimentos de onda que são absorvidos pela proteína. Para isso, escolheu-se como sonda o reagente fluoresceína. Esse marcador apresenta um ótimo rendimento quântico e uma boa solubilidade em água. O espectro de absorção e emissão da fluoresceína em tampão pH 9,0 é mostrado a seguir:

Figura 46 - Espectro de absorção e emissão da sonda fluoresceína (disponível em: <www.invitrogen.com.br>).

O ensaio de marcação foi preparado incubando-se a proteína à 5mg/mL com 140µM de fluoresceína, que representa três vezes a concentração molar protéica estimada em 46µM, por 12 horas à 4 °C. Após este processo, o complexo proteína-sonda foi aplicado em uma coluna de *desalting* (HiTrap desalting – GE healthcare) para a separação do excesso da sonda do complexo *TbSerRS* -fluoresceína. As amostras foram monitoradas em 280nm para checar a presença da proteína e 495nm da sonda.

O comprimento de onda utilizado para a excitação da sonda foi 480nm e o uso de um filtro de *cutoff* de 515nm (corte de 50% da intensidade em 515nm) foi importante para evitar que o espalhamento de luz interferisse na medida. Os valores de anisotropia foram calculados pelo programa Vinci-ISS da seguinte maneira:

$$R = [I_{VV} - (G \cdot I_{VH})] / [I_{VV} + (2 \cdot G \cdot I_{VH})]$$

Em que I refere-se à intensidade de fluorescência medida, os índices V (vertical) e H (horizontal) referem-se à posição dos polarizadores durante a excitação (primeiro índice) e emissão (segundo índice) e G é um fator de correção o qual considera diferenças da sensibilidade, nas duas direções I_{VH} e I_{HH} , de acordo com (LAKOWICZ, 2002):

$$G = I_{VH} / I_{HH}$$

Para os ensaios de anisotropia, adicionou-se à cubeta de quartzo, 250µL de proteína marcada em uma concentração final de 20nM e então titulou-se diferentes concentrações de proteína não marcada (0nM, 30nM, 40nM, 90nM, 100nM, 120nM, 170nM, 190nM e 230nM) através de adições sucessivas, porém foi tomado o cuidado para que o volume final não excedesse em mais de 20% do volume inicial. As curvas de titulação foram realizadas em triplicata e foi considerado o estado reversível de monômero para dímero para análise dos dados.

5.2 Resultados

5.2.1 Amplificação, clonagem, subclonagem e análise da sequência

Como todo o trabalho inicial com o gene da proteína Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei*, foi desenvolvido pela aluna de doutorado Joci, estas etapas não serão mostradas neste trabalho.

5.2.2 Expressão da proteína codificada pelo gene serrs de *T. brucei*

A proteína foi obtida por expressão em células de *E. coli* como já citado no item 5.1.2.

5.2.3 Purificação da proteína *TbSerRS*

Uma vez expressa a proteína *TbSerRS* em fração solúvel, foi necessário purificá-la. A purificação em larga escala foi feita a partir de 500 mL de cultura crescida em meio LB, após indução com 0,1mM de IPTG. A lise das células foi realizada por choque térmico seguido do processo de sonicação. O sobrenadante proveniente da lise celular foi submetido a uma pré-purificação com a precipitação em diferentes concentrações de sulfato de amônio. Cada amostra foi analisada em gel SDS-PAGE (figura 47).

Figura 47 - Análise da SerRS em diferentes concentrações de sulfato de amônio. 1) Padrão de massa molecular; 2) fração insolúvel; 3) sobrenadante; 4) extrato bruto; 5) fração insolúvel com 30% sulfato amônio; 6) sobrenadante com 30% sulfato amônio; 7) fração insolúvel com 40% sulfato amônio; 8) sobrenadante com 40% sulfato amônio; 9) fração insolúvel com 50% sulfato amônio; 10) sobrenadante com 50% sulfato amônio; 11) fração insolúvel com 60% sulfato amônio; 12) sobrenadante com 60% sulfato amônio; A seta vermelha mostra que toda a proteína de interesse precipita com 60% de sulfato de amônio e fica no fração insolúvel.

Estando a proteína de interesse em uma solução tampão com alta concentração de sulfato de amônio, utilizou-se como o próximo passo de purificação a coluna de phenyl sepharose (baseado no livro “Protein Purification Protocols”). A figura 48 é referente ao gel desta purificação e a figura 49, do gráfico obtido neste passo.

Figura 48 - Análise dos picos resultantes da purificação em resina de phenyl sepharose. 1) Padrão de massa molecular; 2) sobrenadante; 3) sobrenadante com 60% sulfato de amônio; 4) fração insolúvel com 60% sulfato de amônio (pré-coluna, seta vermelha: *TbSerRS*); 5 e 6) amostras pico 1; 7 e 8) amostras pico 2; 9 e 10) amostras pico 3; 11 e 12) amostras do pico 4. A seta vermelha mostra a banda correspondente a proteína *TbSerRS*.

Figura 49 - Cromatograma referente à passagem da amostra pela coluna Phenyl Sepharose, a seta vermelha indica o pico (4) referente à *TbSerRS*.

Através da análise feita dos géis obtidos, constatou-se que o pico 4 (seta vermelha) contém a proteína *TbSerRS* eluída durante o gradiente linear de sulfato de amônio [2M – 0M]. A amostra deste pico foi então submetida a mais um passo de purificação que consistiu na passagem pela resina de afinidade por Níquel, mostrado na figura 50.

Figura 50 - Resultado da purificação em resina de afinidade por níquel analisado em SDS-PAGE 15%. 1) Padrão de massa molecular; 2) amostra pré-coluna (níquel); 3) fração que não liga à resina; 4) lavagem 1; 5) lavagem 2; 6) lavagem 3; 7) lavagem 4; 8) eluído; 9) eluído concentrado (4 μ L); 10) eluído concentrado (2 μ L).

Analisando o resultado obtido pelo SDS-PAGE, concluímos que os passos empregados para purificação da proteína de interesse foram satisfatórios, pois como mostrado na figura 50 a amostra eluída é constituída por apenas uma banda, no caso da proteína *TbSerRS*.

5.2.4 Organização estrutural da proteína *TbSerRS*

5.2.4 a) Espalhamento Dinâmico de Luz

Os ensaios de DLS nos dão uma indicação da pureza estrutural da preparação de proteína e fornecem uma maneira de estimar o raio hidrodinâmico para a amostra analisada (figura 51). No caso da *TbSerRS* recombinante, a medida foi realizada utilizando-se proteína na concentração de 5mg/mL. Os resultados mostram uma solução protéica homogênea, com massa molecular de 103kDa e raio hidrodinâmico de 4.32nm. Esses valores são condizentes ao valores encontrados para esta enzima em outros organismos e ao valor obtido em programas de predições através da sequência inserida.

Figura 51 - Resultado do ensaio de DLS utilizando proteína *TbSerRS* na concentração de [5mg/mL]. A) Experimentos iniciais de DLS, B) Experimentos de DLS após estabelecer o protocolo de estabilidade protéica.

Como pode ser observado na figura acima, o melhor resultado para o DLS foi obtido após estabilização com o melhor tampão para a proteína. Comparando A com B da figura 51 notamos que o raio hidrodinâmico encontrado em B para essa proteína foi de 4,32 nm e a o histograma possui um pico indicando uma amostra pura homogênea. Esse raio hidrodinâmico encontrado refere-se a estado dimérico da proteína em estudo, segundo o programa de predição ProtParam (ExPASy).

5.2.4 b) Estudo do estado de oligomerização da *TbSerRS* através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (não desnaturantes) mostrou que a proteína estudada, após todas as etapas de purificação, apresentava apenas um tipo de população (figura 52), ou seja, não havia sinais de degradação ou de agregação protéica. A massa molecular da proteína *TbSerRS* fica entre os padrões com massa de 140kDa e 232kDa, porém como esses padrões utilizados são referentes a proteínas globulares, e formas protéicas deslocam-se de maneira diferente, justificam a proteína não estar na posição de tamanho esperado (110kDa).

Figura 52 - Gel nativo com gradiente 8 – 25% de poliacrilamida, a seta vermelha mostra a banda referente à *TbSerRS*.

Este resultado é condizente a uma molécula trimérica, mas quando comparamos com os dados obtidos no DLS e sabendo que as cargas influenciam muito no gel nativo, concluímos que a proteína é dimérica e não apresenta aglomerações ou degradações, pois obtivemos uma banda única no gel nativo. Devemos considerar também que como descrito na literatura, todas as aaRS de classe II são diméricas e que a *TbSerRS* interage com um tRNA, que é carregado negativamente, portanto, a *TbSerRS* possui uma grande região carregada positivamente, justificando seu deslocamento no gel nativo.

5.2.5 Anisotropia de Fluorescência

Para o experimento de interação *TbSerRS* - *TbSerRS* através de anisotropia de fluorescência, necessitou-se marcar a proteína com a sonda fluoresceína. A marcação ocorreu durante 12 horas à temperatura de 4°C, logo após foi realizada uma cromatografia através de uma coluna de *desalting* para a separação da proteína marcada e o excesso de sonda (figura 53).

Figura 53 - Cromatografia utilizando coluna de *desalting* – A) Pico referente à *TbSerRS* marcada com fluoresceína; B) e C) Picos referentes ao excesso de fluoresceína.

Na tentativa de descobrirmos a concentração em que a proteína encontrava-se totalmente na forma dimérica, variamos a concentração de proteína não marcada e medimos a anisotropia. As medidas foram realizadas em triplicatas e o gráfico obtido foi uma média das várias vezes que o experimento foi realizado (em purificações diferentes). Obtivemos o gráfico abaixo, onde se notam três estágios: o primeiro platô, onde encontram-se somente monômeros da proteína (entre 0 e 80nM), o segundo estágio que é de transição, onde a proteína está tanto na forma monomérica com dimérica (entre 80 e 120nM) e o último platô, onde a proteína está totalmente como dímero (acima de 120nM) (Figura 54). A curva que passa pelos pontos foi traçada pelo modelo livre de Hill (Equação: $f = a_i + (a_f - a_i) * ((x^n)/(k^n)) / (1 + ((x^n)/(k^n)))$), com $k = 109,01 \text{ nM} \pm 1,87$ e $n > 1$, no programa SigmaPlot.

Curva de associação

Figura 54 - Curva de associação *TbSerRS* - *TbSerRS* por anisotropia de fluorescência. Nota-se um platô definido a partir da concentração de 150nM indicando que só há formas diméricas a partir dessa concentração.

5.2.6 Ensaios cristalográficos da proteína Seril-tRNA Sintetase

Em uma das condições testadas obtiveram-se cristais (figura 55a), porém era necessário testar outras condições e refiná-las, precisando investir um grande tempo até poder resolver a estrutura tridimensional da proteína. Devido a este fator, esse trabalho foi interrompido e tais experimentos estão sendo realizados pela aluna de doutorado Daiana Evelin Martil, sob a orientação do Prof. Dr. Otavio H. Thiemann. A aluna já conseguiu um cristal maior, com menos nucleações na gota e que difratasse (figura 55b), porém ainda os resultados mostraram-se insatisfatórios para a resolução estrutural (difração a 7Å).

Figura 55 - Cristais da proteína *TbSerRS*. A) Condição de 0,1M Ácido cítrico pH=5,0; 2,4M Sulfato de amônio. B) 0,1M de sulfato de amônio, 0,1M BIS-TRIS pH=5,7 e 20% PEG 3350.

Parte B

Isoformas do Ser-tRNA e o SELC

5.3 Metodologia

5.3.1 Amplificação e transcrição *in vitro* dos tRNAs (Ser-tRNA^{Sec} e SELC).

Para a realização das amplificações dos materiais genéticos bem como reações de transcrição *in vitro* de tRNAs, termocicladores PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ RESEARCH, INC) e oligonucleotídeos sintetizados a partir de seqüências disponíveis em banco de dados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram utilizados.

As amplificações do gene de Inserção Selenocisteína-tRNA^{[Ser]_{Sec}} (SELC) e dos isoformas Ser-tRNA^{Sec} foram realizadas utilizando os oligonucleotídeos mostrados abaixo:

Tb03a

taatagcactcactataggGTCACCATACCCAAGTGGTTACGGGGACTGACTGAAATCAGTTGCGATCTCGCGCGCAGGTTTCAATCCTGCTGTTGACGcca
attatgctgagtataccCAGTGGTATGGGTTCACCAATGCCCCCTGACTGATCTTTAGTCAACGCTAGAGCGCGCTCCAAGCTTAGGACGACCACTGCggt

Tb03b

taatagcactcactataggGTCACCATACCCAAGTGGTTACGGGGACTGACTGAAATCAGTTGCGATCTCGCGCGCAGGTTTCAATCCTGCTGTTGACGcca
attatgctgagtataccCAGTGGTATGGGTTCACCAATGCCCCCTGACTGAGCTTTAGTCAACGCTAGAGCGCGCTCCAAGCTTAGGACGACCACTGCggt

Tb04a

taatagcactcactataggGTCGACATACCCAAGTGGTTACGGGGTTTACTGAAATCAAATGCGATCTCGCGCGCAGGTTTCAATCCTGCTGTCGACGcca
attatgctgagtataccCAGTGTATGGGTTCACCAATGCCCCAACTGAACTTTAGTTTACGCTAGAGCGCGCTCCAAGCTTGGGACGACAGCTGCggt

Tb07a

taatagcactcactataggGCAAACGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGCTGCTGCTAAGCAGGTGTGATCTACGCGAAGGTTTCAATCCTTCCGTTTGCgcca
attatgctgagtataccCGTTTGACCGGCTACCAATTCCGCGGACGGACGATTTCGTCCACACTAGAGTGCCTTCCAAGCTTGGGAAGGCAAACGCggt

SELC

taatagcactcactataggGCCACAAGAGCUCAGCUGGUGCUGGGUGCGGGCUUCAACCCGUAGGCGAGUUGGACUCGCAGCCGUUCGAUUCGGCCUUUGUGGCGcca
attatgctgagtataccCGGTGTTACTCGAGTCGACACGACCCACGCCGAAGTTTGGGCATCCGCTCAACCTGAGCGTCGGCAAGCTAAGCCGGAACACCGCggt

Os genes de Inserção Selenocisteína-tRNA^{[Ser]_{Sec}} (SELC) e Selenocisteína-tRNA^{ser} foram amplificados a partir dos oligonucleotídeos correspondentes descritos acima, que possuem uma região interna complementar de 20 nucleotídeos, além de uma sequência promotora T7 RNA polimerase (em letras minúsculas e em negrito).

A reação de amplificação segue descrita na tabela 17 e seu programa de amplificação como descrito na figura 56.

Tabela 17 - Reação para amplificação dos genes de inserção de selenocisteína.

Reagentes	Volume (μL)	Concentração final
Oligonucleotídeo 3' [100μM]	1,0	2μM
Oligonucleotídeo 5' [100μM]	1,0	2μM
Tampão Tac rec [10X]	10,0	1X
dNTP Mistura (A, C, G, T) [10mM]	2,0	0,2mM
Cloreto de magnésio [25mM]	6,0	1,5mM
Enzima Taq rec polimerase	1,0	2,5U
Água milli-Q autoclavada q.s.p.	100,0	-

Figura 56 - Esquema do programa de PCR utilizado para amplificação dos genes de Inserção Selenocisteína-tRNA^{[Ser]Sec} (SELC) e Selenocisteína-tRNA^{ser} + região promotora T7.

Os fragmentos de 110pb amplificados (genes de Inserção Selenocisteína-tRNA^{[Ser]Sec} (SELC) e Selenocisteína-tRNA^{ser} + região promotora T7) foram purificados do gel de agarose 2% utilizando o “Kit Eppendorf Perfect Gel Cleanup”.

A reação de transcrição *in vitro* dos tRNAs utiliza como DNA molde o gene de inserção Selenocisteína-tRNA^{[Ser]Sec} (SELC) ou Selenocisteína-tRNA^{ser}. Para tal, utilizamos o “Kit Megashortscript – Ambion” desenvolvido para transcrição de pequenas seqüências de RNA. A transcrição permaneceu incubada a 37 °C por 6 horas. A reação encontra-se descrita na tabela 18.

Tabela 18 - Reação para transcrição *in vitro* dos tRNAs a partir dos genes de Inserção utilizando “Kit Megashortscript – Ambion”.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
DNA molde gene SELC [0,84µg]	5,2	150nM
T7 reaction buffer [10X]	2,0	1X
T7 ATP solution [75mM]	2,0	7,5mM
T7 CTP solution [75mM]	2,0	7,5mM
T7 GTP solution [75mM]	2,0	7,5mM
T7 UTP solution [75mM]	2,0	7,5mM
T7 enzyme mix	2,0	
Água milli-Q autoclavada livre de RNase	2,8	-

Os tRNAs transcritos foram purificados utilizando-se fenol/clorofórmio seguido por precipitação com etanol, (seguindo o protocolo de HARTMANN et al, 2005). Os tRNAs foram ressuspensos em um 20µL de água livre de RNase e o enovelamento tridimensional dos tRNAs foi feito pelo aquecimento dos mesmos em

banho até 80 °C por 10 minutos seguido de um lento resfriamento da temperatura, até aproximadamente 35°C, em que foi adicionado 20mM de cloreto de magnésio e esperou-se o total resfriamento até 25 °C .

5.3.2 Dicroísmo Circular

Dicroísmo Circular, do inglês Circular Dichroism, (CD) é a técnica capaz de detectar a estrutura secundária, a baixas concentrações, utilizando uma luz circularmente polarizada. Isso ocorre porque toda molécula que apresenta quiralidade é opticamente ativa, promovendo interações distintas na luz polarizada que a incide (FASMAN et al, 1996).

Após ser enovelado, o tRNA foi submetido a esta técnica para confirmação de sua forma ativa (correto enovelamento), pois para ser funcional, o tRNA precisar adquirir sua estrutura tri-dimensional (MOULTON et al, 2000). Para este experimento, utilizou-se o tRNASer Tb03b numa concentração de 0,4mg/mL. Os espectros de CD foram registrados num intervalo de comprimento de onda de 210-320nm em um intervalo de temperatura de 85 °C (inicial) a 5 °C (final) sendo a varredura dos espectros realizada a cada 10 °C de abaixamento gradual da temperatura utilizando-se cubeta retangular de quartzo de 1mm de caminho óptico. As medidas foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J715 (JASCO Corporation, Japão), equipado com sistema de controle de temperatura (Peltier). A fim de descontar a influência do meio onde o tRNA estava diluído, foi preparado um branco correspondente e seus espectros foram subtraídos daqueles realizados em presença do tRNA. Os espectros de CD foram tratados no programa Origin versão 7.0 e a análise do pareamento das bases do tRNA para formação da estrutura secundária foi acompanhado pela mudança na elipsidade (como descrito em MOULTON et al, 2000).

5.3.3 Anisotropia de Fluorescência

A mesma técnica já explicada no item 5.1.5, foi utilizada neste experimento com tRNA, porém, desta vez tendo a cubeta de quartzo com 250µL de proteína numa mistura de marcada e não marcada, resultando em uma concentração final de 150nM, concentração na qual a *TbSerRS* já se encontra totalmente na forma dimérica. Adicionou-se o tRNA de maneira que ficasse em uma razão final de 5 tRNAs:1 *TbSerRS*, garantindo desta forma a saturação dos sítios de ligação do tRNA na *TbSerRS*.

5.4 Resultados

5.4.1 Amplificação e Transcrição in vitro dos tRNAs (*Ser-tRNA^{Sec}* e SELC).

Como descrito no item 4.5, os genes referentes aos tRNAs (*Ser-tRNA^{Sec}* e SELC) foram amplificados através de oligonucleotídeos que apresentam uma região complementar (figura 57) e posteriormente, os produtos amplificados foram purificados de gel de agarose 2%.

Figura 57 - Resultado da amplificação dos genes referentes aos tRNAs (*Ser-tRNA^{Sec}* e SELC em gel de agarose 2% em TAE [1X]. 1) Padrão de massa molecular de 1Kb Plus (Invitrogen); 2) TbSEC, 3) Tb03a, 4) Tb03b, 5) Tb04a, 6) Tb07a.

Os DNAs foram então transcritos utilizando o kit de transcrição (“Kit Megashortscript – Ambion”) e esta reação foi purificada. Após a purificação com fenol/clorofórmio, o valor da quantificação se reduz a 50-60% do valor inicial. Isso se deve aos contaminantes que são eliminados com a excisão da banda desejada e a perdas inerentes ao procedimento experimental.

5.4.2 Dicroísmo Circular

Através deste experimento verificou-se um aumento nos valores de elipsidade sugerindo a ocorrência do pareamento das bases presentes no tRNA para a formação de sua estrutura secundária. Partindo do aquecimento a 85°C, os espectros medidos pelo equipamento de 10 em 10°C chegando até 5°C, foram sobrepostos e são apresentados na figura 58. Como mencionado, nota-se um aumento na elipicidade no comprimento de onda de 260nm, concluindo que o tRNA adquiriu uma conformação estrutural.

Figura 58 - Gráfico de elipicidade em função do comprimento de onda para uma variação de temperatura de 85°C até 5°C, para o Ser-tRNA Tb03b.

5.4.3 Anisotropia de Fluorescência

Para esse experimento inicial de interação *TbSerRS*-tRNA, o mesmo procedimento citado no item 5.2.3 foi realizado com a proteína e o tRNA foi utilizado após verificação do seu enovelamento pela técnica de CD. Para verificar o comportamento da anisotropia da proteína com a adição do tRNA, que futuramente será melhor investigado, foram feitas algumas medidas de anisotropia (tabela 19). Os valores obtidos de anisotropia foram graficados depois de normalizados e são mostrados na figura 59.

Tabela 19 - Medidas realizadas nos ensaios preliminares de anisotropia de fluorescência da interação *TbSerRS*-tRNA.

Medida	Conteúdo da cubeta
1	Branco
2	100nM de proteína
3	150nM de proteína
4	150nM de proteína + 1500nM de Ser-tRNA Tb03b

Figura 59 - Curva obtida pela interação *TbSerRS*-tRNA por anisotropia de fluorescência. Trata-se de dados preliminares que serão futuramente estudados. Nota-se que houve um aumento no valor da anisotropia com o aumento da concentração proteica, concluindo que a proteína passou de monômero para dímero e a posterior adição do tRNA causou uma diminuição no calor de anisotropia (medida circulada em vermelho), fenômeno que posteriormente será investigado.

Com esse ensaio preliminar de interação da SerRS com o tRNA, esperávamos um aumento no valor de anisotropia, porém o resultado obtido foi o contrário. Portanto futuramente esses ensaios envolvendo a interação *TbSerRS* - tRNA serão melhor estudados, elaborados e realizados para que seja possível a determinação da constante de dissociação do complexo *TbSerRS* -tRNA e suas isoformas de maneira precisa e reprodutível.

Capítulo 6

6 Discussão

A correta inserção de um aminoácido no processo de síntese protéica envolve vários fatores, sendo os dois passos iniciais: a correta aminoacilação do tRNA pelo aminoácido formando um tRNA aminoacilado (aa-tRNA) e a interação do anticódon do aa-tRNA com o códon do mRNA (YUAN, 2006). A aminoacilação do tRNA é realizada por uma família de enzimas denominadas de aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs).

Para a inserção da selenocisteína (Sec), o 21º aminoácido do código genético, várias enzimas estão envolvidas. O primeiro passo desta síntese é a aminoacilação do Ser-tRNA^{Sec} (SELC) com uma serina pela enzima Seril-tRNA Sintetase (SerRS). A conversão de serina em selenocisteína foi descrita em *Escherichia coli*, e recentemente em eucariotos (figura 60). Em *E. coli* uma Sec-sintase dependente de piridoxal fosfato (SELA) remove o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário aminoacrilil. Este intermediário serve como acceptor de seleno-fosfato gerando a selenocisteína. Em eucariotos, o processo análogo é feito realizado pela PSTK e pela SepSecS, que respectivamente fosforila e seleniza a serina (YUAN, 2006).

Figura 60 - Transformação de Ser-tRNA^{Sec} em Sec-tRNA^{Sec}. Acima o passo realizado por SELA que ocorre em bactérias e abaixo realizado por PSTK/SepSecS. Modificado de YUAN, 2006.

Em uma tentativa de contribuir com a compreensão e caracterização da via de selenocisteína em Kinetoplastida realizamos este trabalho com as duas enzimas envolvidas nas primeiras etapas desta via.

Primeiramente iniciou-se o trabalho na caracterização do gene da enzima *TbPSTK*, porém nenhum dos clones obtidos através da técnica de PCR resultou em uma seqüência livre de mutações. Analisando sua seqüência nucleotídica notamos que aproximadamente 25% são seqüências repetitivas, exemplos: TTTT, GACGAC, ATTATTA, dentre outras, fato que pode levar a DNA polimerase termoestável empregada no processo de amplificação por PCR a cometer erros que resultaram na presença de mutações. As mutações ocorridas não ocorreram em regiões conservadas, ou seja, quando comparadas a seqüência depositada no banco de dados, notou-se que em cada clone as mutações ocorreram em diferentes posições. Como no trabalho desenvolvido com o gene da enzima *TbPSTK* foram realizadas diferentes amplificações no qual variou-se a enzima Polimerase e também os oligonucleotídeos específicos para a reação e nenhum resultado positivo foi obtido, decidimos interromper esta parte do projeto e realizar algumas tentativas de amplificação do gene da enzima homólogo de *L. major*.

A partir da técnica de PCR foram amplificados fragmentos de 1338pb referente ao gene *pstk* de *L. major* codificando para a proteína com 446 aminoácidos. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação contém sítios de clivagem das enzimas *Nhe* I e *Hind* III para posterior subclonagem no vetor pET28a.

Foram realizadas diversas tentativas a fim de obtermos uma expressão da *LmjPSTK* em quantidade suficiente para realizarmos experimentos de caracterização molecular e estrutural. Variou-se a temperatura e o tempo de indução, a concentração do agente indutor (IPTG), o meio utilizado e o tipo de cepa de *E. coli* hospedeira da construção. Tentou-se também a adição do antibiótico rifampicina que inibe a atividade da RNA polimerase bacteriana, porém não possui atividade inibitória sobre a T7 RNA polimerase intensificando a expressão da banda de interesse (MARTÍNEZ-ABARCA; ALONSO; CARRASCO, 1993). Dentre todas as técnicas empregadas nenhum aumento significativo na expressão da *LmjPSTK* foi conseguido, e a quantidade obtida se mostrou insuficiente para posteriores experimentos de caracterização enzimática.

Pelo programa Seqman, analisamos a seqüência dos códons do gene *pstk* de *L. major* e constatamos que a mesma é constituída de 20% de códons raros para

expressão em *E. coli*. Já a sequência dos códons do gene *pstk* de *T. brucei* possui 25% de códons raros para expressão neste sistema heterólogo. Diante desta análise, utilizar *E. coli* como sistema heterólogo para expressão dos genes *pstk* *L. major* e *T. brucei* pode ser limitante. Alterar o sistema heterólogo de expressão ou obter o gene sintético com uma relação de códons mais favorável para expressão em *E. coli* podem ser soluções para este tipo de problema encontrado. Porém esta estratégia demanda um longo tempo e também não é necessariamente sinônimo de sucesso, pois seria mais um teste a fazer e o resultado obtido poderia não ser o esperado. O nosso colaborador, Prof. Dr. Dieter Soll (Yale University, USA) realizou tentativas de expressão do gene sintético de *LmjPSTK* sem sucesso. Portanto construção de gene sintético pode não representar a melhor estratégia para expressão da *LmjPSTK*.

Passamos a investigar a enzima SerRS *T. brucei* que também está envolvida na biossíntese da selenocisteína e sua caracterização será de grande contribuição para a melhor compreensão desta via por ser responsável pela aminoacilação do Ser-tRNA^{Sec}. O gene codificante da SerRS de *T. brucei* já havia sido clonado e sua expressão e purificação se mostraram promissoras.

A expressão heteróloga foi em células de *E. coli* e sua purificação consistiu de precipitação com 60% de sulfato de amônio, seguidas por purificações em resinas de hidrofobicidade e de afinidade por níquel. Foi obtida uma condição na qual a enzima permanece estável e livre de agregações e degradações, como mostrado pelos resultados de gel nativo. DLS e fluorescência de anisotropia foram as técnicas utilizadas para a organização estrutural da proteína. Constatamos que a SerRS de *T. brucei*, assim como a de outros organismos, é dimérica, com um raio hidrodinâmico de 4,32nm, massa molecular de 110kDa e encontra-se totalmente na forma dimérica em concentrações acima de 150nM. Informações sobre a ligação com o Ser-tRNA^{Sec} poderão ser obtidos a partir da técnica de anisotropia de fluorescência visto que em experimentos iniciais realizados com a SerRs adicionando-se o Ser-tRNA^{Sec} revelaram a existência de uma diferença na anisotropia. Esses experimentos futuramente poderão revelar informações quanto a essa ligação e se há diferença entre os isoformas dos Ser-tRNA^{Sec} e o SELC. Juntamente com os estudos de cristalização que estão sendo realizados por uma aluna do nosso grupo de pesquisa, os resultados finais obtidos na investigação

desta enzima proporcionará informações importantes para a melhor compreensão desta via.

Capítulo 7

7 Conclusões

- Não foi possível obter um clone sem mutação para o gene da enzima Fosfoseril-tRNA Kinase de *T. brucei* (TbPSTK).
- O clone contendo a ORF para o gene da enzima Fosfoseril-tRNA Kinase de *L. major* (LmjPSTK) foi clonado.
- A LmjPSTK foi expressa na forma recombinante em *E. coli* presente na fração solúvel, porém com baixo rendimento e sem melhoras nas técnicas testadas.
- A Seril-tRNA Sintetase de *T. brucei* foi expressa na forma recombinante em *E. coli* com sucesso.
- A purificação realizada com a enzima foi bem sucedida apresentando um rendimento de aproximadamente 5,0 mg por litro de cultura.
- A proteína recombinante mostrou-se ativa e na forma dimérica após todas as etapas de purificação.
- Experimentos de DLS resultaram um raio hidrodinâmico da molécula protéica de 4,32nm e uma massa molecular de aproximadamente 110kDa.
- Experimentos de gel nativo confirmaram a presença de uma única população protéica.
- Experimentos de anisotropia de fluorescência revelaram que em concentrações acima de 150nM a proteína encontra-se somente na forma dimérica.
- Amplificações, transcrições *in vitro* e purificações realizadas com os genes codificantes dos tRNAs (isoformas do tRNA^{Ser} e o SELC) mostraram-se eficientes.
- Experimentos de dicroísmo circular (CD) revelaram um aumento na elipicidade no comprimento de onda de 260nm, concluindo que o tRNA adquiriu sua conformação estrutural através da técnica para enovelamento que foi utilizada.
- Experimentos de anisotropia de fluorescência da ligação do tRNA com a

proteína diferenciaram-se dos resultados obtidos somente com a proteína, mostrando que ocorre uma mudança quando há adição de tRNA na proteína, fenômeno que futuramente será estudado.

Capítulo 8

8 Perspectivas futuras

- Obter o gene da pstk de *T. brucei* sem mutações para futuras tentativas de expressão heteróloga;
- Investigar outros métodos de expressão heteróloga para a obtenção da TbPSTK e LmjPSTK;
- Caracterizar molecular e estruturalmente essas proteínas;
- Realizar experimentos de anisotropia de fluorescência para investigar a interação da Seril-tRNA Sintetase com os isoformas do Ser-tRNA^{Sec} e o SELC;
- Investigar se a proteína possui uma maior afinidade na ligação com um desses tRNAs;
- Refinar as condições de cristalização da proteína TbSerRS para melhorar o cristal obtido e resolver sua estrutura tridimensional;

Referências

- ALBERTS, B.; et al. **Molecular biology of the cell. 4. ed.** New York: Garland Science Taylor & Francis Group, 2002. p. 335-342.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. **Short protocols in molecular biology.** 2ed. New York: Wiley, 1995.
- BARRET, M. P.; et al. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. **British Journal of Pharmacology**, USA, v. 152, p. 1155-117, 2007.
- BARRET, M. P. The trypanosomiasis. **The Lancet**, Glasgow, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics.** New York: Wiley-interscience publication, 1979.
- BERRIMAN, M.; et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**. UK, v. 309, n. 5733, p. 416-422, 2005.
- CARLSON, B. A.; et al. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]^{Sec} kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, v. 101, n. 35, p. 12848-12853, 2004.
- CASSAGO, A. et al. Identification of *Leishmania* selenoproteins and SECIS element. **Molecular & Biochemical Parasitology**. Brasil, v. 149, p. 128–134, 2006.
- CATON-WILLIAMS, J.; HUANG, Z.; Biochemistry of selenium-derivatized naturally occurring and unnatural nucleic acids. **Chemistry & Biodiversity**. USA, v. 5, n. 3, p. 396-407, 2008.
- CHIRAC P., TORRELEE E.; Global framework on essential health R&D. **The Lancet**. France, V. 367, n. 9522, p. 1560-1561, 2006.

DRENTH, J. **Principles of protein X-ray Crystallography**. Springer-Verlag. New York, 1994.

DRISCOLL, D.M.; COPELAND, P.R. Mechanism and regulation of seleprotein synthesis. **Annual Review of Nutrition**, USA, v. 23, p. 17-40, 2003. doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073318

DRUGS for NEGLECTED DISEASES *INITIATIVE* (DNDI) Disponível em: <http://www.dndi.org.br/>. Acesso em 2009.

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

GESLAIN, R. et al. Trypanosoma Sery-tRNA synthetase is a metazoan – like enzyme with high affinity for tRNA Sec. **The Journal of Biological Chemistry**. Barcelona, v. 281, n. 50, p. 38217-38225, 2006.

Hartmann, R. K. et al. (Eds). **Handbook of RNA Biochemistry**. Weinheim: WILEY-VCH V, 2005.

HATFIELD, D. L.; et al. How selenium has altered our understanding of the genetic code. **Molecular and Cell Biology**, Nebraska, v. 22, p. 3565-3567, 2002.

IBBA, M.; FRANCKLYN, C.; CUSACK, S. (Eds). **The Aminoacyl-tRNA Synthetase**. Georgetown: Landes Bioscience, 2005.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**. UK, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

KAMTEKAR, S.; et al. Toward understanding phosphoseryl-tRNACys formation: the crystal structure of Methanococcus maripaludis phosphoseryl-tRNA synthetase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA, v. 104, n. 8, p. 2620- 2655, 2007.

KROL, A. Evolutionarily different RNA motifs and RNA–protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. **Biochimie**. France, v. 84, p. 765–774, 2002.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3.ed. New York: Plenum Press, 2002, p. 1-25, 353-382, 492-575.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of biochemistry**. 3.ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 1037-1043.

LU, J.; HOLMGREN, A. Selenoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**. Sweden, v. 284, p. 723-724, 2008.

MARTÍNEZ-ABARCA, F.; ALONSO, M. A.; CARRASCO, L. High level expression in *Escherichia coli* and purification of poliovirus protein 2A^{pro}. **Journal of General Virology**, Espanha, v. 74, n. 12, p. 2645-2652, 1993.

MCCULLOCH, R. Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. **Trends in Parasitology**, Glasgow, v. 20, n.3, p. 117-121, 2004.

MOULTON, V. et al. RNA folding argues against a hot-start origin of life. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 51, n. 4, p. 416-421, 2000.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1991.

PAPP, L. V. et al. From Selenium to Selenoproteins: synthesis, identity and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**. Australia, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

RHODES, G. **Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models**. Academic Press, Inc, 1993.

ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. **Foundations of Parasitology**. 7ed. New York, McGraw-Hill, 2005.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

REY, L. **Parasitologia**: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, Washigton, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

TROUILLER, P.; et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, Grenoble, v. 359, n. 9324, p. 2188-2194, 2002.

WHORLTD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <http://www.who.int/en>. Acesso em 2009.

YUAN, J.; et al. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v. 103, n. 50, p. 18923-18927, 2006

.

VOET, D. et. al. **Fundamentals of Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999. p. 851-861.