

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LÍVIA MARIA FAIM

Estudos estruturais e funcionais da Selenofosfato Sintetase de
Trypanosoma brucei e *Leishmania major*

São Carlos
2014

LÍVIA MARIA FAIM

Estudos estruturais e funcionais da Selenofosfato Sintetase de
Trypanosoma brucei e *Leishmania major*

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

Área de Concentração: Física Aplicada.
Opção: Física Biomolecular.
Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann.

Versão Original

São Carlos
2014

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

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

Faim, Livia Maria

Estudos estruturais e funcionais da Selenofosfato Sintetase de Trypanosoma brucei e Leishmania major / Livia Maria Faim; orientador Otavio Henrique Thiemann -- São Carlos, 2014.
216 p.

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

1. Selênio. 2. Selenocisteína. 3. Selenofosfato Sintetase. 4. SPS2. I. Thiemann, Otavio Henrique , orient. II. Título.

Aos meus pais, Alfredo Faim e Maria Lucia Faim pelo exemplo,
incentivo, carinho e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Alfredo José Gomes Faim e Maria Lucia da Silva Faim por todo amor, carinho e dedicação ao longo desses 29 anos. Aos meus sobrinhos, meus pequenos, minhas duas vidinhas, Yasmin Faim e Cauê Faim. Aos meus irmãos Thiago Henrique Faim, Raphael Lucas Faim, cunhadas, Ana Paula Faim e Camila Freire por todo apoio e incentivo.

Ao meu namorado e amor da minha vida, Otávio Gamboni, por todo amor, carinho, compreensão e força.

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann pela orientação, confiança, ensinamentos e contribuição para meu crescimento científico.

A minha amiga-irmã Daiana Evelin Martil, pela linda amizade, companheirismo, carinho e amor.

Ao aluno de doutorado Ivan Rosa e Silva por toda dedicação, ajuda, amizade, discussões científicas produtivas e idéias sempre interessantes.

Ao Dr. Marco Tulio Alves da Silva (Chaps), pela orientação, amizade, ensinamentos científicos e ajuda no cultivo de parasitas e nos experimentos celulares.

Ao Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias, pela oportunidade, pela amizade e ajuda nos experimentos durante minha estadia de 6 meses em Cambridge.

Ao Prof. Dr. Tom Blundell da Universidade de Cambridge do Reino Unido, pela oportunidade, apoio e orientação durante os 6 meses que estive lá. Aos amigos queridos de Cambridge Leonardo, Sachin, Alice, Van, Laureen, Rinaldo e Liz.

As minhas negas e amigas Fer Costa e Teresa por serem sempre tão lindas e pela ajuda nos experimentos de blotting e na sala de cultura.

A querida amiga Livia Manzine, pela orientação nos meus primeiros passos no laboratório e pela parceria nos momentos de divertimento.

As amigas lindas que fiz no laboratório durante esses anos e que vou levar para sempre no meu coração: Flávio morenã, Maycou, Larissa, Everton, Udi, Fer Bachega, Renatinha, Wan Altei, Ana Puhl, Malu, Jademilson, Ivani, Luizinho, Maluf, Fran, Mamé, Vivi, Fer Batista, André, Marisa, Marina, Liz, Caio, Amanda.

Aos técnicos do laboratório Susana, Bianca, Humberto, Augusto, Simone e Renata. Em especial a amiga Susana, pelos primeiros ensinamentos sobre as selenofosfato sintetases.

Aos colegas de laboratório Atilio, Bruno, B2, Kadowaki, Tavim, Evandro, Bela, Mariana, Juliana, Jaque, Antônio, Helene, Malu, Renata, Napoleão, Ricardo, Leo, Vanessa, Michel pelo convívio diário.

As minhas amigas e negas lindas da graduação Adriane Michele, Letícia, Brianna, Angélica, Joanne, Paula Russo e Anelise, por mesmo distantes me darem força e sempre estarem ali prontas para ouvirem meus desabafos.

As minhas amigas maravilhosas de longa data Aline, Adriana Sicuto, Camila, Crislene e Fernanda Accorsi pela amizade eterna.

Aos colaboradores Prof. Dr. Júlio Cesar Borges, Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto, Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias e Dr. Humberto D´Muniz.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge, pelo suporte para os experimentos e pela oportunidade de realização do doutorado sanduiche.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Biblioteca do Instituto de Física de São Carlos, em especial à Neusa e a Cris pela ajuda na formatação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À todos os amigos da Ourofino e principalmente a Equipe do Bloco X pela amizade, ajuda e força.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Muito obrigada!!!!

"A persistência é o caminho do êxito."

Chaplin

RESUMO

FAIM, L. M. **Estudos estruturais e funcionais da Selenofosfato Sintetase de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major***. 2014. 216 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

A síntese e incorporação de Selenocisteína em selenoproteínas ocorre tradicionalmente direcionado pelo códon de terminação UGA. Uma maquinaria única de enzimas e fatores proteicos é necessária para síntese de selenocisteína e decodificação do códon UGA de terminação da tradução para inserção de selenocisteína. Dentre as enzimas envolvidas, está a Selenofosfato sintetase (SPS2), responsável por catalisar a ativação de seleneto com adenosina 5' – trifosfato (ATP) para gerar selenofosfato, o doador de selênio reativo que é substrato da próxima enzima da via para formação de selenocisteína. Estudos recentes identificaram a presença da via de biossíntese de selenocisteína em parasitas kinetoplastidas e subsequentemente a proteína SPS2 de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* foram caracterizadas. Entretanto, trabalhos estruturais e funcionais das enzimas permaneceram não reportados. Dessa forma, este trabalho teve seu foco estabelecido na realização de estudos estruturais e funcionais da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*. Para caracterização da proteína em solução foram empregadas as técnicas de cromatografia de exclusão de tamanho, eletroforese em gel nativo, espalhamento dinâmico de luz (DLS), espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS) e ultracentrifugação analítica (AUC). Os resultados obtidos revelaram uma mistura de dímeros e tetrâmeros em solução para ambas SPS2 com predominância de dímeros. Muitas estratégias de cristalização e melhorias na difração foram utilizadas para obtenção de cristais proteicos apropriados para determinação da estrutura cristalográfica das SPS2. Cristais de SPS2 de *T. brucei* inteira e SPS2 de *L. major* com N-terminal truncado foram obtidos. Porém, somente a estrutura cristalográfica da proteína SPS2 de *Leishmania major* com o N-terminal truncado a 1,9 Å de resolução foi determinada. Estudos comparativos entre esta estrutura e outras selenofosfato sintetases mostrou a mesma organização estrutural entre elas. Experimento de complementação funcional das SPS2 truncadas e mutadas pontualmente revelou três resíduos localizados no N-terminal como fundamentais para atividade da SPS2 (Leu33, Thr34; Tyr36 e Leu37, Thr38; Tyr40 para SPS2 de *T. brucei* e *L. major*, respectivamente). Análise mutacional baseada nas estruturas cristalográficas indicou que estes resíduos podem estar envolvidos no mecanismo de entrega do selenofosfato para a próxima

enzima da via, a Selenocisteína sintase. Isto poderia evitar a difusão de compostos reativos de selênio, resultando em uma eficiência na síntese de selenocisteína. Os resultados aqui apresentados forneceram informações importantes e novas perspectivas a respeito do mecanismo de catalise da enzima selenofosfato sintetase na via de síntese de selenocisteína.

Palavras-chave: Selênio. Selenocisteína. Selenofosfato sintetase. SPS2.

ABSTRACT

FAIM, L. M. **Structural and functional studies of Selenophosphate Synthetase from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major***. 2014. 216 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The synthesis and incorporation of selenocysteine in selenoproteins occurs cotranslationally directed by the UGA stop codon. A unique machine of enzymes and protein factors are required for selenocysteine synthesis and decoding of UGA translation termination codon for the insertion of selenocysteine. Among the enzymes involved, Selenonofosfato synthetase (SPS2) is the responsible for catalyzing the activation of selenite with adenosine 5' - triphosphate (ATP) to generate selenophosphate, the reactive selenium donor, which is substrate of the next pathway enzyme to formation of selenocysteine. Recent studies have identified the presence of selenocysteine biosynthesis in parasites Kinetoplastidas and subsequently, the SPS2 protein of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major* have been characterized, however, structural and functional studies of enzymes remain not reported. Thus, this present work report biochemical and biophysical studies of SPS2. To characterize the protein in solution, there were employed the techniques of size exclusion chromatography, native gel electrophoresis, dynamic light scattering (DLS), Small angle X-ray scattering angle (SAXS) and analytical ultracentrifugation (AUC). The results revealed a mixture of dimers and tetramers in solution for SPS2 with predominance of dimers. Many strategies and improvements in crystallization and diffraction were used to obtain suitable SPS2 crystals for determination of the crystallography structure. *T. brucei* SPS2 crystals and *L. major* SPS2 crystals with truncated N-terminal were obtained. However, only the structure of SPS2 protein from *L. major* with truncated N-terminal to 1.9 Å of resolution was solved. Comparative studies of this structure with other selenophosphate synthases revealed the same structural organization. Functional complementation experiments of truncated and mutated SPS2 revealed three residues located in the SPS2 N- terminal as essential for the activity of the enzyme (Leu33 , Thr34 and Tyr36 to *T. brucei* SPS2; Leu37 , Thr38 and Tyr40 to *L. major* SPS2) . Mutational analysis based on the crystal structures indicated that these residues may be involved in the mechanism of selenophosphate delivery to the pathway enzyme next, the selenocysteine synthase. This found could prevent the diffusion of reactive selenium, resulting in selenocysteine synthesis efficient. The results presented here provided important

information and new insights about the of selenophosphate synthetase catalysis mechanism in the selenocysteine synthesis pathway.

Keywords: Selenium. Selenocysteine. Selenophosphate synthetase. SPS2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Formas celulares encontradas nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. (A) Amastigota. (B) Promastigota. (C) Epimastigota. (D) Tripomastigota. N: núcleo, C: cinetoplasto e F: flagelo 40
- Figura 2 - Ciclo biológico da transmissão da doença do sono..... 42
- Figura 3 – Ciclo biológico da transmissão da Leishmaniose..... 45
- Figura 4 – Principais tipos de Leishmaniose: (A) Leishmaniose visceral. (B) Leishmaniose cutânea. (C) Leishmaniose mucocutânea. 46
- Figura 5 – Representação em 2D e 3D dos aminoácidos: (A) Cisteína. (B) Selenocisteína. Em vermelho é representado o oxigênio, em azul o nitrogênio, em amarelo o enxofre e em laranja o selênio. As Figuras foram obtidas dos programas *UCSF Chimera*... 51
- Figura 6 – Esquema da participação de fatores proteicos nas reações de síntese e incorporação de aminoácidos padrões..... 54
- Figura 7– Estrutura secundária global em forma de folhas de trevo de todos os tRNAs. (A) Estrutura de tRNA com seus 4 braços, além de um braço extra, necessários para a função de adaptação. (B) O tRNA^{[Ser]^{Sec}} de *Escherichia coli* (C) O tRNA^{[Ser]^{Sec}} de eucariotos. 55
- Figura 8 – Incorporação de Selenocisteína mostrando a localização do elemento SECIS (Sequência de Inserção a Selenocisteína). (A) Em bactéria. (B) Em eucarioto. (C) Em arqueobactéria. Esse mecanismo ocorre em um códon UGA em fase, localizado no interior do gene. A linha simboliza o RNA mensageiro com o códon UGA em fase de leitura. O elemento SECIS, estrutura secundária adquirida pelo mRNA, compreende a estrutura onde a maquinaria de incorporação de selenocisteína (Sec) irá ligar – se. 57
- Figura 9 – Estrutura consenso do elemento SECIS em (A) eubactérias (*E. coli*). O retângulo verde mostra a região reconhecida pela proteína SELB a exatamente 11 nucleotídeos do códon UGA. (B) eucariotos. São observados dois tipos de

elemento SECIS: Forma I e Forma II. Os nucleotídeos conservados que são necessários para a função do elemento SECIS incluem bases AA ou CC na região do loop apical. (C) arqueobactérias.	57
Figura 10 – Representação esquemática comparativa das vias de biossíntese e incorporação de selenocisteína em selenoproteínas em procariotos.	59
Figura 11 – Duas representações esquemáticas da vias de biossíntese e incorporação de selenocisteína em selenoproteínas eucarióticas. (A) Sequência de reações enzimáticas. (B) Possíveis complexos multiproteicos envolvidos na biossíntese e incorporação de selenoproteínas no interior do compartimento celular.	61
Figura 12 - Estrutura 2D prevista para os tRNA ^{Sec} de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i> , identificados por busca genômica.....	62
Figura 13 – Representação da reação enzimática catalisada pela selenofosfato sintetase.	63
Figura 14 – Representação das duas etapas da reação enzimática catalisada pela selenofosfato sintetase.....	65
Figura 15 – Espectro de CD no UV distante de vários tipos de estrutura secundária: (—) α -hélice; (--) folha-antiparalela; (····) volta- β (·-·-·-·) estrutura irregular.	80
Figura 16 - Experimentos de Ultracentrifugação analítica. (A) SV. (B) SE. Amostras e referências são carregadas nos setores no centro da cela ou nas partes centrais. O setor da referência é preenchido ligeiramente mais do que o setor da amostra para gerar sinais claros de absorbância a partir do menisco (fundo).....	91
Figura 17- Análise em gel SDS-PAGE 15% do resultado da purificação da proteína SPS2 através da cromatografia de afinidade: (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> (B) SPS2 de <i>L. major</i> . 1- padrão de massa molecular com suas respectivas massas moleculares indicadas. 2 - Fração solúvel (entrada na coluna). 3- Eluato. 4, 5, 6, 7 e 8- representam as frações eluídas da coluna com tampão A contendo 1 μ M Pepstatina, 1 μ M Leupeptina, 1mM PMSF e um gradiente de concentração de imidazol de 10mM, 20mM, 50mM, 200mM e 500mM, respectivamente.....	92
Figura 18 - Clivagem da cauda 6XHis da proteína SPS2 com Trombina analisada em SDS-PAGE 15%. (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> . (B) SPS2 de <i>L. major</i> . 1 - padrão de massa	

molecular. 2 - Amostra controle não submetida à clivagem. 3 – Amostra submetida a reação de clivagem. 93

Figura 19 - Purificação da proteína SPS2 de *Trypanosoma brucei* por cromatografia de exclusão de tamanho. (A) Perfil cromatográfico indicando o volume de eluição da proteína (13,94 mL) (seta preta) e a pequena saliência (seta vermelha) que possivelmente corresponde a outra forma oligomérica. (B) Gel de SDS – PAGE 15%: 1- Marcador de massa molecular, 2- Eluição da SPS2 de *T. brucei*. 94

Figura 20 - Purificação da proteína SPS2 de *Leishmania major* por cromatografia de exclusão de tamanho. (A) Perfil cromatográfico indicando o volume de eluição da proteína (14,05 mL) (seta preta) e a pequena saliência (seta vermelha) que possivelmente corresponde a outra forma oligomérica. (B) Gel de SDS-PAGE 15%: 1- Marcador de massa molecular, 2- Eluição da SPS2 de *L. major*. 94

Figura 21 - Espectro de Dicroísmo circular das selenofosfato sintetases. (A) SPS2 de *Trypanosoma brucei*. (B) SPS2 de *Leishmania major*. As proteínas estavam a 0,2 mg/mL em 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0 a 25 °C. 95

Figura 22 - Curvas de calibração da superdexTM 200 10/300. (A) Massa molecular. (B) Raio hidrodinâmico. 98

Figura 23 - Eletroforese em gel nativo. (A) Coluna 1- Padrão de massa molecular. Colunas 2 e 3-Selenofosfato sintetase de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, respectivamente. (B) Gráfico da DM (distância de migração) em função do log da massa molecular. 100

Figura 24 - Histograma representando medidas do raio hidrodinâmico (R_H) das proteínas SPS2 de *T. brucei*. e SPS2 de *L. major*. (A) Histograma referente a SPS2 de *T. brucei* com $R_H = 3,7$ nm. (B) Histograma referente a SPS2 de *L. major* com $R_H = 3,9$ nm. 101

Figura 25 - Gráficos de $D_{20,w}$ versus concentração da proteína para as duas selenofosfato sintetases. (A) SPS2 de *T. brucei* e (B) SPS2 de *L. major*. $D_{20,w}$ (calculada por DLS versus concentração da proteína ajustado com uma regressão linear para calcular o $D_{20,w}^0$). 103

Figura 26 - Curva de espalhamento ($\ln I(q) \times q$) para a proteína: (A) SPS2 de <i>Trypanosoma brucei</i> . (B) SPS2 de <i>Leishmania major</i>	104
Figura 27 - Gráfico de Guinier ($\ln I \times q^2$), mostrando a região de Guinier ($q \rightarrow 0$) utilizada no ajuste para o cálculo do R_g e $I(0)$ das proteínas: (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> . (B) SPS2 de <i>L. major</i>	105
Figura 28 - Gráfico da função de Distribuição de Distâncias para: (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> . (B) SPS2 de <i>L. major</i> . A $p(r)$ foi calculada utilizando o programa GNOM a partir dos dados experimentais.	105
Figura 29 - Médias dos envelopes moleculares das proteínas derivado do cálculo <i>ab initio</i> . (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> . (B) SPS2 de <i>L. major</i>	107
Figura 30- Médias dos envelopes moleculares das proteínas derivado do cálculo <i>ab initio</i> . (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> . (B) SPS2 de <i>L. major</i>	108
Figura 31 - Médias dos envelopes moleculares das proteínas derivado do cálculo <i>ab initio</i> . (A) SPS2 de <i>T. brucei</i> . (B) SPS2 de <i>L. major</i>	109
Figura 32- Gráficos de distribuição do coeficiente de sedimentação $c(s)$ em seis diferentes concentrações para a SPS2 de <i>T. brucei</i> , SPS2 de <i>L. major</i> . Nessas análises preliminares, foi utilizado o modelo 1 (sem conhecimento a priori) e o modelo 2 (com conhecimento a priori utilizando o valor inicial de D obtido pelo DLS). ..	112
Figura 33 - Gráficos de $s_{20,w}$ versus concentração da proteína para as duas selenofosfato sintetases. $s_{20,w}$ (calculada pelo AUC velocidade de sedimentação) versus concentração da proteína ajustado com uma regressão linear para calcular o $s_{20,w}^0$	113
Figura 34 - Resultados do experimento de sedimentação por equilíbrio (SE) das selenofosfato sintetases (A) <i>TbSPS2</i> e (B) <i>LmSPS2</i> . As curvas mostradas correspondem à absorbância da amostra x raio da célula e os residuais do ajuste do modelo utilizado do programa SEDPHAT.	117
Figura 35 – Método de Cristalização <i>microbatch</i> . (A) Poços nos quais são adicionadas a solução de cristalização juntamente com a proteína e o óleo de interesse. (B) Placa Greiner de <i>microbatch</i> (Hampton Research).	123

Figura 36 – Aparato experimental para realização do experimento de desidratação dos cristais com umidade relativa controlada.	126
Figura 37 – Métodos aplicados para o experimento de desidratação química.....	127
Figura 38 – Etapas para realização do experimento de <i>crosslinking</i>	128
Figura 39 - Cristais de SPS2 de <i>T. brucei</i> : (A) Apo: 0,1M Tri – citrato de sódio (pH 5,6), 17% Peg 3350. (B) em complexo com AMPCPP e MgCl ₂ – 0,02M Tri-citrato de sódio, 12% Peg 6000.....	141
Figura 40 - Cristais da SPS2 de <i>T. brucei</i> na forma apo (A) e em complexo com AMPCPP (B) obtidos usando a técnica de <i>microbatch</i>	142
Figura 41- Cristais da SPS2 de <i>T. brucei</i> obtidos por <i>microseeding</i> automatizado.....	142
Figura 42 - Padrão de Difração para SPS2 de <i>T. brucei</i> : (A) Apo. (B) em complexo com AMP-PCP: MgCl ₂	143
Figura 43 - (A) Posição relativa do eixo dos cristais em relação ao feixe de raios X. (B) Padrão de difração depois de aplicar a desidratação com umidade relativa controlada. Houve uma melhora na qualidade dos dados quando aplicada 85% de umidade relativa. Essa melhora pode ser visualizada nessas imagens quando comparamos 95% e 85 % de umidade relativa com o cristal na posição de 90° onde a difração é mais crítica devido à anisotropia do cristal.	145
Figura 44 - (A) Predição de desordem de resíduos a partir do servidor Disopred ¹¹¹ . (B) Estruturas obtidas a partir de modelagem por homologia mostrando em azul as regiões que serão truncadas correspondentes aos 25 e 70 resíduos iniciais.....	147
Figura 45 - Amplificação da construção Δ NN25- <i>TbSPS2</i> e Δ NN70- <i>TbSPS2</i> visualizado em gel de agarose 1%. MW - padrão de massa molecular “ <i>Gene Ruler 1Kb DNA Ladder</i> ” (Fermentas); C – Controle negativo; 1 e 2 – Construção Δ NN25- <i>TbSPS2</i> e Δ NN70- <i>TbSPS2</i> amplificada, respectivamente.	148

- Figura 46 - Caracterização do transformante: (A) pGEMT- Δ N25-*TbSPS2* e pGEMT- Δ N70-*TbSPS2*. (B) pET20b- Δ N25-*TbSPS2* e pET20b- Δ N70-*TbSPS2* visualizado em gel de agarose 1% e TAE [1x] corado com brometo de etídeo. MW- padrão de massa molecular “*Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*” (Fermentas); colunas 1 e 2: pGEMT/pET20b extraído e digerido com liberação do inserto da construção Δ N25-*TbSPS2* e Δ N70-*TbSPS2*, respectivamente. 149
- Figura 47- Gel SDS – Page da expressão e da purificação por cromatografia de afinidade. (A) Construção Δ N25-*TbSPS2*; (B) Construção Δ N70-*TbSPS2*. MW - Padrão de massa molecular; 1: Antes da indução; 2: Depois da indução com 1 mM IPTG; 3: Fração insolúvel; 4: Sobrenadante e entrada na coluna; (A) 5 -10: Frações eluídas a partir do gradiente de imidazol. (B) 5 -7: Frações proteicas eluídas a partir do gradiente de imidazol..... 150
- Figura 48 - Perfil Cromatografico e gel de SDS–Page da purificação por cromatografia de exclusão molecular (A) Construção Δ N25-*TbSPS2* (B) Construção Δ N70-*TbSPS2* MW: Padrão de massa molecular; 1-11 e 1-10: Frações de proteína eluída correspondente ao pico majoritário (indicado pela seta vermelha). 151
- Figura 49 - Proteólise *in situ* da SPS2 de *T. brucei* usando a protease α -quimotripsina. (A) Gel de SDS - Page: MW – padrão de massa molecular; 1-SPS2 de *T. brucei* antes de clivar; 2-SPS2 de *T. brucei* depois de clivar com α -quimotripsina. (B) Sequência da proteína com o sequenciamento do N-terminal da proteína após clivagem em negrito e região perdida pela clivagem em verde. (C) Modelo estrutural por homologia mostrando em verde a região correspondente a que foi clivada pela α -quimotripsina..... 153
- Figura 50 - Proteólise *in situ* da SPS2 de *L. major* usando a protease α -quimotripsina. (A) Gel de SDS - Page: MW – padrão de massa molecular; 1 - SPS2 de *L. major* antes de clivar; 2 - SPS2 de *L. major* depois de clivar com α -quimotripsina. (B) Sequencia da proteína com o sequenciamento do N-terminal da proteína após clivagem em negrito e região perdida pela clivagem em azul. (C) Modelo estrutural por homologia mostrando em azul a região que foi clivada pela α -quimotripsina.... 154
- Figura 51 - Amplificação das construções da SPS2 de *T. brucei* e *L. major* visualizado em gel de agarose 1%. MW - padrão de massa molecular “*Gene Ruler 1Kb DNA Ladder*” (Fermentas). 1e 2 - Construção 1 e 2 da SPS2 de *T. brucei*, respectivamente; 3 e 4 – Construção 1 e 2 da SPS2 de *L. major*, respectivamente..... 155

- Figura 52 - Caracterização dos transformantes pGEMT-construções das selenofosfato sintetases visualizados em gel de agarose 1% e TAE [1x] corado com brometo de etídeo. MW- padrão de massa molecular “*Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*” (Fermentas); (A) 1 – pGEM-T extraído e digerido, com liberação do inserto da construção 1 da SPS2 de *T. brucei*; 2 e 3 – Liberação do inserto da construção 1 e 2 da SPS2 de *L. major*. (B) 1- Liberação do inserto da construção 2 da SPS2 de *T. brucei*..... 155
- Figura 53 - Análise do transformante pET28a- Δ N69-*LmSPS2* visualizado em gel de agarose. MW- padrão de massa molecular “*Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*” (Fermentas); coluna 1: pET28a extraído e digerido com liberação do inserto da Δ N69-*LmSPS2* em pET28a (69 primeiros resíduos truncados)..... 156
- Figura 54 - Gel SDS – Page da expressão da Δ N69-*LmSPS2*. MW - Padrão de massa molecular; 1: Antes da indução; 2, 3, 4 e 5: Depois de 2, 4, 6 e 12 horas de indução com [1mM] IPTG. 157
- Figura 55 - Gel SDS-Page da purificação da Δ N69-*LmSPS2* por cromatografia de exclusão molecular. MW - Padrão de massa molecular. 1 a 5: Frações correspondentes ao pico majoritário eluído da coluna de exclusão de tamanho. 157
- Figura 56 - Cristais da Δ N69-*LmSPS2* observados depois de três dias em uma condição consistindo de 0,1M Tri-citrato de sódio (pH 5,2); 0,2 M de sulfato de amônio e 21% de PEG 4000 (w/v). 158
- Figura 57- Cristal da Δ N69-*LmSPS2* montado no *loop* para o experimento de difração de raios X. (B) Uma das imagens do padrão de difração a 1,9Å obtido a partir do cristal (A). 159
- Figura 58 - Diagrama de Ramachandran do modelo cristalográfico final da Δ N69-*LmSPS2*. É avaliada a qualidade da estrutura através da combinação dos ângulos torsionais diedrais (Ψ e Φ). O resultado indica que 98,78% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis (em vermelho), 1,22% em regiões permitidas (em bege) e nenhum resíduo se encontra em regiões generosamente permitida (em amarelo) e desfavorável (em bege claro). 161
- Figura 59 - Estrutura cristalográfica e diagrama de topologia da Δ N69-*LmSPS2* com o N-domínio (em azul) e C-domínio (roxo). Figura gerada pelo Pymol⁹⁵ e diagrama construído pelo servidor PDBsum¹²⁵ 162

- Figura 60 - Dímero Δ N69-*LmSPS2* gerado a partir do simétrico usando o servidor PISA¹²⁴. N-Domínios estão coloridos de azul claro e azul e C-Domínios são coloridos de roxo e rosa. Ânion sulfato esta representado como esferas. 163
- Figura 61 - Alinhamento sequencial baseado na estrutura da Δ N69-*LmSPS2* contra a *LmSPS2*, *TbSPS2* e as selenofosfato sintetases de diferentes organismos e que possuem estrutura cristalográfica como SPS1 humana, (PDB 3FD5); SPS de *E. coli* (PDB 3U00) e SPS de *Aquifex Aeolicus* (PDB 2YYE). O alinhamento foi realizado no servidor T-Coffee¹²⁷ e analisado pelo ESPript 3.0¹²⁸. As estrelas correspondem aos resíduos que estão no sítio de ligação do ATP..... 165
- Figura 62 - Sobreposição da Δ N69-*LmSPS2* (roxo escuro) em relação a: (A) SPS de *Aquifex Aeolicus* (verde). (B) SPS1 humana (vermelha) e (C) SPS *E.coli* (azul)..... 166
- Figura 63 – Comparação da Δ N69-*LmSPS2* (em roxo) com a SPS1-ADP Humana (em vermelho). Os resíduos no sítio de ligação do ATP em roxo (correspondentes aos D69, Gly162 e Thr164 na SPS1 Humana e (D74), (G172) e (G174) na Δ N69-*LmSPS2*), porém os resíduos Lys32, Met68 e Gly67 (em vermelho) não estão na estrutura Δ N69-*LmSPS2*, pois foram perdidos no truncamento (Lys32(Lys37)) ou por não ter densidade eletrônica (Gly67 (Gly72) e Met68 (Met73)) 167
- Figura 64 - Sobreposição da Δ N69-*LmSPS2* (em roxo) com a SPS de *Aquifex Aeolicus* (em verde) evidenciando a localização e a distância do ânion sulfato em relação ao sítio de ligação do ATP. O ânion sulfato está representado em stick na estrutura Δ N69-*LmSPS2* e em esferas na SPS de *A. Aeolicus*..... 168
- Figura 65 - Cristais da *TbSPS2* crescidos na condição de cristalização consistindo de 0,1 M Tri – citrato de sódio (pH 5,6) e 17% Peg 3350 (w/v) observados após dois meses de incubação. 169
- Figura 66 – (A) Cristal da *TbSPS2* montado no *litholoop* (Molecular Dimensions) para o experimento de difração de raios X. (B) Uma das imagens do padrão de difração a 3,4 Å obtido a partir do cristal (A)..... 170
- Figura 67 - Ensaio de Complementação funcional das selenofosfato sintetases selvagem e truncadas. Controle positivo DH5 α , negativo pET28a e pET20b transformados em WL400. *TbSPS2*: Selvagem; com deleção dos 25 primeiros resíduos;

deleção dos 70 primeiros resíduos. *LmSPS2*: Selvagem; com 69 resíduos iniciais deletados. *EcSPS*: Selvagem; com deleção dos 11 primeiros resíduos..... 181

Figura 68 – Parte do alinhamento mostrando regiões circundadas em vermelho que correspondem à região truncada na qual não houve complementação funcional. A região destacada em verde representa a região truncada que complementou a cepa WL400(*selD204(CamR)::cat*). As setas vermelhas estão apontando os três resíduos de aminoácidos a serem investigados em relação a suas funções no mecanismo de catálise da enzima selenofosfato sintetase. . 183

Figura 69 - Parte do sequenciamento dos mutantes da enzima selenofosfato sintetase de *T. brucei*. As regiões assinaladas mostram os resíduo que foram mutados para Alanina. *TbSPS2L33A*, *TbSPS2T34A* e *TbSPS2Y36A*..... 184

Figura 70 - Parte do sequenciamento dos mutantes da enzima selenofosfato sintetase de *L. major*. As regiões assinaladas mostram os resíduos que foram mutados para Alanina. *LmSPS2L37A*, *LmSPS2T38A* e *LmSPS2Y40A*..... 185

Figura 71 - Ensaio de Complementação funcional das selenofosfato sintetases selvagem e mutantes. *TbSPS2*: Selvagem; Mutante: Leu33Ala, Thr34Ala e Tyr36Ala. *LmSPS2*: Selvagem; Mutante: Leu37Ala, Thr38Ala e Tyr40Ala.....186

Figura 72 – Estrutura da SPS1 humana mostrando em verde os resíduos (L19, T20 e F22) correspondentes aos que foram mutados na SPS2 de *T. brucei* (L33, T34 e Y36) e *L. major* (L37, T38 e Y40) e sua grande distância em relação ao sítio de ligação do ATP em pontilhados amarelos.....187

Figura 73 – Resíduos que participam da superfície de interação das duas cadeias que formam o dímero da selenofosfato sintetase: (A) SPS1 humana e (B) SPS *E. coli*. Os resíduos correspondentes aos mutados em SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* não participam da superfície de interação (L19, T20 e F22 em SPS1 humana e L9, T10 e Y11 em SPS de *E. coli*).....188

Figura 74 - Estrutura da SPS1 humana ilustrando o túnel de aproximadamente 15 Å que segundo Wang e colaboradores⁷⁹ é o possível caminho de entrega do selenofosfato. Em verde estão mostrados os resíduos próximos ao início do túnel (L19, T20 e F22) e que correspondem aos resíduos mutados em SPS2 de *T. brucei* (L33, T34 e Y36) e *L. major* (L37, T38 e Y40). O túnel foi encontrado a partir do programa Caver¹³⁰189

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos usados no tratamento da Trypanosomiase Africana humana ⁴	43
Tabela 2 - Fármacos usados no tratamento da Leishmaniose ⁷	48
Tabela 3 - Condições experimentais e parâmetros obtidos pelo SEDNTERP para a SPS2 de <i>T. brucei</i>	90
Tabela 4 - Condições experimentais e parâmetros obtidos pelo SEDNTERP para a SPS2 de <i>L. major</i>	90
Tabela 5 - Deconvolução dos espectros de CD das selenofosfato sintetase de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i> , mostrando a porcentagem de estrutura secundária.	96
Tabela 6 – Padrões de diferentes massas moleculares e raios hidrodinâmicos utilizados para a calibração da Superdex TM 200 10/300 com seus respectivos volumes de eluição (Ve) e o calculo do Kav.	97
Tabela 7– Resultados de massa molecular e raio hidrodinâmico dos picos correspondentes as diferentes estados oligoméricos da SPS2 de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i>	99
Tabela 8 - Coeficiente de difusão (D) para cada selenofosfato sintetase em cinco diferentes concentrações de proteína.....	102
Tabela 9 - Resumo dos dados obtidos pelo experimento de SAXS para a SPS2 de <i>T. brucei</i> e SPS2 de <i>L. major</i>	110
Tabela 10 - Resultados do experimento de SV para a SPS2 de <i>T. brucei</i> para os dois modelos utilizados no tratamento dos dados	114
Tabela 11 - Resultados do experimento de SV para a SPS2 de <i>L. major</i> para os dois modelos utilizados no tratamento dos dados.....	115
Tabela 12 - Sequência dos oligonucleotídeos empregados na montagem e amplificação das novas construções. $\Delta 25$ - <i>Tb</i> SPS2 e $\Delta 70$ - <i>Tb</i> SPS2 – correspondem aos	

oligonucleotídeos para a construção da SPS2 de <i>T. brucei</i> sem os 25 e 70 resíduos de aminoácidos iniciais, respectivamente.....	130
Tabela 13- Mistura da reação em Cadeia da DNA Polimerase	130
Tabela 14 - Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem pGEM-T	131
Tabela 15 - Reação de digestão para análise das colônias recombinantes	131
Tabela 16 - Reação de ligação do inserto ao vetor de expressão pET20b.....	132
Tabela 17 - Desenho dos oligos para as diferentes construções planejadas a partir da proteólise in situ	135
Tabela 18 - Mistura da reação em Cadeia da DNA Polimerase	136
Tabela 19 - Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem pGEM – T	137
Tabela 20 - Reação de digestão para análise das colônias recombinantes	137
Tabela 21 - Reação de ligação do inserto ao vetor de expressão pET28a.....	138
Tabela 22- Estatística da Coleta e Processamento dos Dados de Difração de Raios X	143
Tabela 23 - Estatística da coleta de Dados e resolução da estrutura da Δ N69- <i>Lm</i> SPS2. Valores entre parênteses são para faixa a mais alta resolução.....	160
Tabela 24 – Comparação da porcentagem de estrutura secundária obtida pela estrutura cristalográfica de Δ N69- <i>Lm</i> SPS2 e da deconvolução do espectro de CD da <i>Lm</i> SPS2.....	163
Tabela 25 - Estatística da coleta de Dados da <i>Tb</i> SPS2. Valores entre parentes são para faixa a mais alta resolução.	171

Tabela 26 - Construções que foram transformadas em WL400(<i>selD204</i> (CamR):: <i>cat</i>) para os ensaios de complementação funcional. Sendo que ΔN_n corresponde a ΔN deleção de resíduos no N-terminal e n o número de resíduos deletados.	176
Tabela 27 - Primers construídos para mutagênese sítio dirigida com a trinca de bases mutadas em vermelho. S representa os primers sense e AS os antisense.	178
Tabela 28 - Mistura da reação em Cadeia da DNA Polimerase.....	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Aa</i> SPS	Selenofosfato sintetase de <i>Aquifex Aeolicus</i>
ADP	adenosina-5'-difosfato
AIRS, PurM	aminoimidazol-ribonucleotídeo sintetase
AMP	adenosina-5'-monofosfato
AMPCP	adenosina-5'-(α,β -metileno)-difosfato
AMPCPP	adenosina-5'-(α,β -metileno)-trifosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
AUC	Ultracentrifugação analítica, do inglês <u>A</u> nalytical <u>U</u> ltra <u>C</u> entrifugation
CD	Dicrísmo circular, do inglês <u>C</u> ircular <u>D</u> ichroism
D	coeficiente de difusão translacional
DLS	Espalhamento dinâmico de luz, do inglês <u>D</u> ynamic <u>L</u> ight <u>S</u> cattering
$D_{\text{máx}}$	dimensão máxima de uma proteína
<i>Ec</i> SPS	Selenofosfato sintetase de <i>Escherichia coli</i>
GPx	glutathiona peroxidase
GTP	guanosina-5'-trifosfato
<i>hs</i> SPS1	Selenofosfato sintetase humana
IPTG	isopropil-tio-B-D-galactopiranosídeo
LB	Luria-Bertani
LEC	Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria
<i>Lm</i> SPS2	Selenofosfato sintetase de <i>Leishmania major</i>
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MPD	2-Metil-2,4-pentanodiol
mRNA	RNA mensageiro
MW, M	massa molecular

Na	número de Avogadro
p(r)	função de distribuição de distâncias de centros espalhadores de raios-X
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDB	do inglês, <u>P</u> rotein <u>D</u> ata <u>B</u> ank
Pi	fosfato inorgânico
PSTK	fosfoseril-tRNA ^{Sec} -cinase
q	vetor de espalhamento de raios-X
R	constante universal dos gases
R _g	raio de giro
S	coeficiente de sedimentação
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo, do inglês <u>S</u> mall <u>a</u> n <u>g</u> le <u>X</u> -ray <u>s</u> cattering
Se	Selênio
SE	Sedimentação em equilíbrio, do inglês <u>E</u> quilibrium <u>S</u> edimentation
Sec, U	Selenocisteína
SECIS	sequência de inserção de selenocisteína
SelC, tRNA ^{Sec}	RNA transportador de selenocisteína
SeP	Selenofosfato
SepSecS	selenocisteína sintase
SerRs	seril-tRNA-sintetase
SPS	Selenofosfato sintetase
SPS1	Selenofosfato sintetase 1
SPS2	Selenofosfato sintetase 2
SV	Velocidade de sedimentação, do inglês <u>S</u> edimentation <u>V</u> elocity
TbSPS2	Selenofosfato sintetase de <i>Trypanosoma brucei</i>

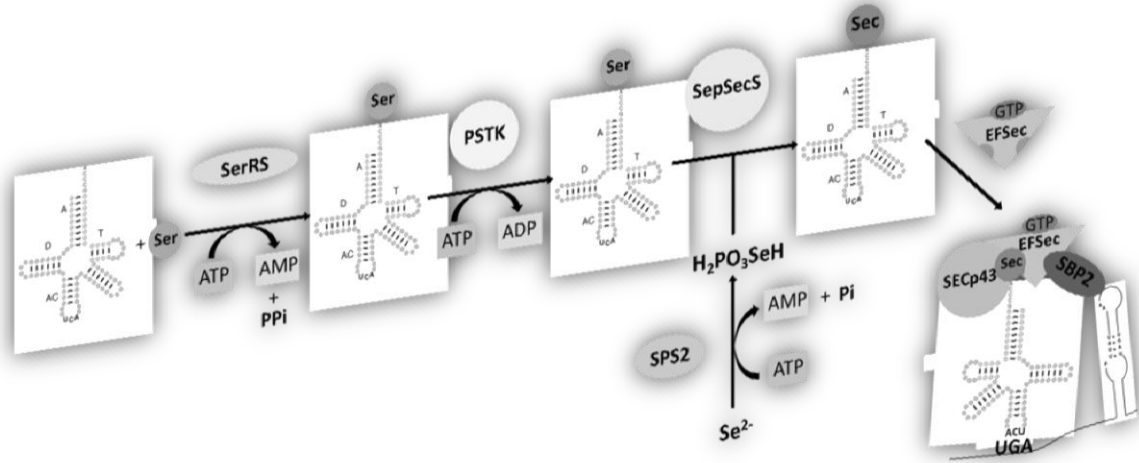
tRNA	RNA transportador
TRx	tiorredoxina reductase
UR	Umidade Relativa
η	viscosidade
v	volume parcial específico
ρ	densidade

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	37
1.1 Doenças Negligenciadas.....	39
1.1.1 Tripanosomatídeos e Tripanosomíases	39
1.1.2 <i>Trypanosoma brucei</i> e Doença do Sono	41
1.2 Selênio	48
1.3 A expansão do código genético: Descoberta do 21º aminoácido Selenocisteína	50
1.4 Selenoproteínas	52
1.5 Síntese de selenocisteínas e incorporação em Selenoproteínas.....	53
1.5.1 Síntese e incorporação de Selenocisteína em Selenoproteínas de Procarioto....	58
1.6 Via de biossíntese de Selenocisteína em Eucarioto.....	59
1.7 Via de Biossíntese de Sec em Kinetoplastida	62
1.8 Selenofosfato sintetase	63
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS	69
2.1 Objetivos Específicos:.....	71
CAPÍTULO 3 - ESTUDOS BIOFÍSICOS E BIOQUÍMICOS	73
3.1 Metodologia.....	75
3.1.1 Estudos iniciais das Selenofosfato sintetases	75
3.1.2 Clonagem do gene <i>sps2</i> de <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Leishmania major</i>	75
3.1.3 Transformação da construção em células competentes de <i>Escherichia coli</i>	76
3.1.4 Expressão da SPS2 de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i>	76
3.1.5 Purificação da SPS2 de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i> por Cromatografia de Afinidade	77
3.1.6 Clivagem da cauda de Histidinas das SPS2 com a protease Trombina.....	78
3.1.7 Purificação da SPS2 de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i> por Cromatografia de Exclusão por Tamanho	78
3.1.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	79
3.1.9 Estimativa da Massa Molecular e do raio hidrodinâmico por cromatografia de exclusão por tamanho	81
3.1.10 Eletroforese em gel não desnaturante (Gel Nativo).....	81
3.1.11 Espalhamento Dinâmico de Luz	82
3.1.12 Espalhamento de Raios X a baixo ângulo	83

3.1.13 Modelagem Molecular da <i>Tb</i> SPS2 e <i>Lm</i> SPS2 para tentativa de validação do envelope de SAXS	86
3.1.14 Ultracentrifugação Analítica (AUC)	86
3.2 Resultados e Discussão	92
3.2.1 Preparo das amostras da SPS2 de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i>	92
3.2.2 Caracterização Biofísica.....	95
CAPÍTULO 4 - CRISTALIZAÇÃO, MÉTODOS DE MELHORIA DA DIFRAÇÃO E ESTUDOS ESTRUTURAIS	119
4.1 Metodologia	121
4.1.1 Cristalização	121
4.1.2 Métodos de melhoria de cristais e da qualidade de Difração	124
4.2 Resultados e Discussão	141
4.2.1 Cristalização Inicial da SPS2 de <i>Trypanosoma brucei</i> , coleta de dados de difração de Raios X	141
4.2.2 Métodos pós-cristalização da SPS2 de <i>T. brucei</i>	144
4.2.3 Métodos pré-cristalização da SPS2 de <i>T. brucei</i>	146
CAPÍTULO 5 – ENSAIOS DE COMPLEMENTAÇÃO FUNCIONAL	173
5.1 Metodologia	175
5.1.1 Informações referentes ao estudo da interação SPS-SELA-SelC em <i>E.coli</i>	175
5.1.2 Ensaio de Complementação Funcional das Selenofosfato sintetases.....	175
5.2 Resultados e Discussão	180
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	191
6.1 Conclusões e Perspectivas	193
REFERÊNCIAS	195
ANEXO – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO EM QUESTÃO	207

Capítulo 1 - Introdução



Capítulo 1 - Introdução

Neste capítulo serão abordadas as doenças negligenciadas, em especial a trypanosomiase africana e a Leishmaniose que são causadas pelos parasitas da Família Trypanosomatidae, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* e são focos deste trabalho. Estes parasitas possuem proteínas que contêm o selênio inserido na forma do aminoácido selenocisteína (Sec) e que são essenciais para sobrevivência do parasita. Estas proteínas são sintetizadas através de uma maquinária complexa que envolve muitos fatores proteicos. Dentre os fatores proteicos determinantes para síntese de Sec está a enzima selenofosfato sintetase que é o principal objeto de estudo deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Negligenciadas

As doenças negligenciadas são doenças tropicais endêmicas que ocorrem principalmente em países de baixa renda da Ásia, África e América do Sul. Dentre as doenças infecciosas que se desenvolvem em climas quentes e úmidos estão a malária, a leishmaniose, a esquistossomose, a filariose linfática, a doença de Chagas, a tripanossomíase Africana e a dengue.

Essas doenças resultam em um total de aproximadamente 534.000 mortes por ano e constituem sérios obstáculos ao desenvolvimento socioeconômico e a qualidade de vida dos países em desenvolvimento devido ao enorme impacto negativo que gera nas comunidades. Este impacto é decorrente das consequências das doenças que incluem a perda de produtividade de jovens e adultos, aumento da miséria e discriminação social. Pesquisas são necessárias para entender a biologia dos parasitas infectantes, desenvolver novos diagnósticos, remédios, para que ocorram intervenções acessíveis de prevenção, cura e tratamento das Doenças Negligenciadas¹.

1.1.1 Tripanosomatídeos e Tripanosomíases

A ordem Kinetoplastida à qual pertence à família Trypanosomatidae é composta por protozoários flagelados que apresentam cinetoplasto, porção de DNA circular presente na mitocôndria única dos parasitas. Fazem parte da família Trypanosomatidae, os parasitas que infectam uma variedade de organismos e que possuem um único flagelo. A família Trypanosomatidae subdivide-se em vários gêneros, sendo os mais estudados os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, os agentes causadores das tripanosomíases humanas (doença de Chagas e doença do sono) e leishmanioses, respectivamente².

Os trypanosomatídeos são organismos eucariotos que apresentam uma única mitocôndria, que se ramifica por todo o corpo e uma bolsa flagelar de onde emerge um flagelo que pode ou não se exteriorizar. A mitocôndria, além de possuir DNA mitocondrial como em outros organismos, apresenta também um DNA que se organiza na forma de minicírculos. Esse DNA se concentra em uma determinada região da mitocôndria, dando origem à estrutura denominada cinetoplasto. É a partir dessa estrutura que é possível diferenciar as formas celulares nas quais os organismos podem ser encontrados durante seu ciclo biológico. Estas formas celulares são amastigota, promastigota, epimastigota e tripomastigota².

A forma amastigota apresenta pequenas dimensões e uma forma circular, ovóide ou fusiforme. O corpo é achatado, apresenta pouco citoplasma, núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico. O cinetoplasto é bem visível e o flagelo reduzido que não se exterioriza, por isso essa forma é praticamente imóvel (**Figura 1A**)². Já a forma promastigota é longa e achatada. O núcleo está localizado na região média e o cinetoplasto anterior ao núcleo, de onde sai o flagelo, na porção anterior da célula (**Figura 1B**)².

A forma epimastigota distingue-se da promastigota, pois o cinetoplasto está localizado mais próximo do núcleo, na região anterior do parasita. O flagelo emerge da região do cinetoplasto, mas mantém-se colado na membrana do citossomo por uma prega da bainha flagelar formando a membrana ondulante, que se torna livre na porção anterior da célula (**Figura 1C**)².

A forma tripomastigota é semelhante à epimastigota, porém apresenta o cinetoplasto posterior ao núcleo com flagelo que se estende por toda a célula e torna-se livre na porção anterior (**Figura 1D**)².

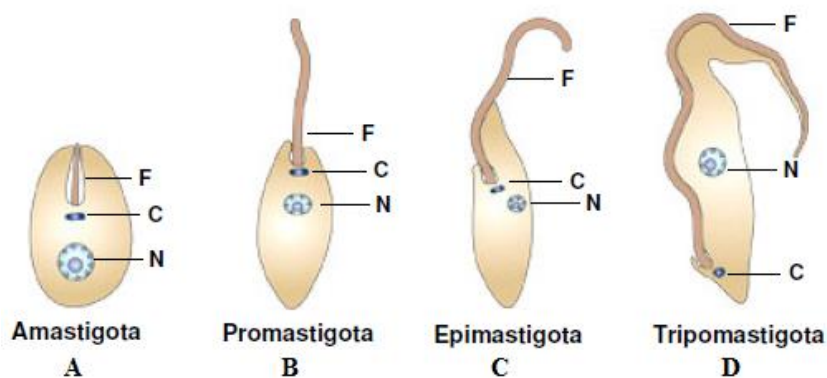


Figura 1 – Formas celulares encontradas nos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. (A) Amastigota. (B) Promastigota. (C) Epimastigota. (D) Tripomastigota. N: núcleo, C: cinetoplasto e F: flagelo.

Fonte: Extraído e Modificado de REY²

1.1.2 *Trypanosoma brucei* e Doença do Sono

A Tripanosomíase africana humana, HAT (*Human African Trypanosomiasis*), ou doença do sono é causada pela infecção com o parasita unicelular pertencente ao gênero *trypanosoma*. Os parasitas entram no corpo através da picada da mosca tsé-tsé (*Glossina spp*). HAT é quase sempre fatal quando não tratada ou tratada de forma inadequada: os parasitas multiplicam no corpo, cruzando a barreira sangue-cérebro e invadem o sistema nervoso central³. De acordo com a organização mundial da saúde³, em 2009, aproximadamente 10.000 casos foram reportados e é estimado que em torno de 60 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença em muitos países da África Subsaariana⁴.

Existem duas formas da doença: a forma crônica, mais comum e a aguda, mais grave e menos comum. A forma crônica da HAT causada pela infecção com o *Trypanosoma brucei gambiense*, é endêmica em 24 países, e representa 98% dos casos reportados. A forma aguda da doença, causada pela infecção com o *Trypanosoma brucei rhodesiense* é endêmica em 13 países e representa 2% de todos os casos da doença reportados durante 2009 – 2011⁴.

O *Trypanosoma brucei* foi descoberto em 1989 por David Bruce, quando ele identificou que a doença severa de gado e animais domésticos e selvagens na África (Nagana) era causada por *Trypanosoma*. Na década seguinte Bruce envolveu-se com a descoberta das subespécies *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* como causa da doença do sono humana e as moscas tsé-tsé *Glossina palpalis* e *G. morsitans* na transmissão delas^{5,6}. O ciclo completo da doença foi descrito em 1914 pelo pesquisador e está esquematizado na Figura 2.

Durante o ciclo de vida de *T. brucei* a mosca tse-tsé pica um animal infectado, tais como selvagem ou gado doméstico no caso de *T. brucei rhodesiense* ou seres humanos no caso de *T. brucei gambiense* e injeta um alimento de trypanosomas durante a picada. Os parasitas então sofrem uma série complexa de mudanças anatômicas e bioquímicas no mesêntero da mosca, o qual resulta em formas altamente infectivas de *trypanosoma* alcançando as glândulas salivares⁴.

A mosca tse-tsé permanece infectada para a vida. Quando a mosca tse-tsé pica o hospedeiro humano, os trypanosomas entram na corrente sanguínea; nodos linfáticos e

organismo sistêmico incluindo o baço, coração, fígado, tal como os olhos, organismos endócrinos na qual é conhecido como estágio inicial (também conhecido como estágio 1)⁴.

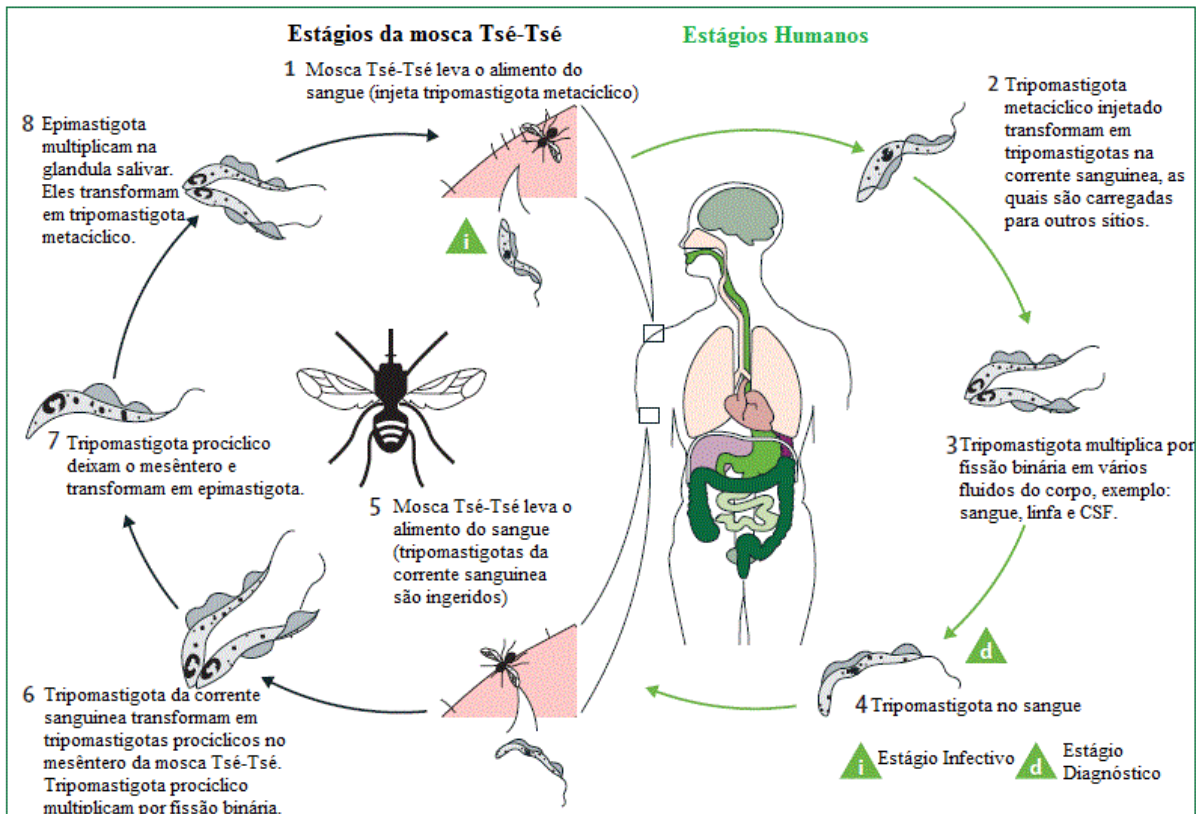


Figura 2 - Ciclo biológico da transmissão da doença do sono³.

Fonte: Extraído e Modificado de SIMARRO³

A lesão primária é dolorosa e aparece entre 5 e 15 dias depois da picada inicial. Depois, o período é variável, o qual é tipicamente poucas semanas no caso de *T. brucei rhodesiense* e muitos meses no caso de *T. brucei gambiense*, os parasitas cruzam a barreira sangue-cérebro e entram no sistema nervoso central. Uma vez que isso acontece a doença entra no estágio tardio, caracterizado patologicamente por uma meninge encefalite (estágio 2)³.

O diagnóstico da doença é realizado pela localização geográfica do paciente, análise dos sinais clínicos e exames laboratoriais parasitológicos (lâmina corada de sangue, lâmina corada de punção do gânglio e exame do líquor) e imunológicos (hemaglutinação, ELISA e PCR).

Capítulo 1 - Introdução

Os sintomas da fase inicial dão início 1-3 semanas após a picada da mosca tsé-tsé e incluem dor de cabeça, mal-estar, artralgia, perda de peso, fadiga e febre. À medida que a doença se desenvolve, os pacientes podem desenvolver diversos sintomas, incluindo linfadenopatia; alargamento do baço, fígado, ou ambos; sintomas cardíacos como miocardite, pericardite; sintomas oftalmológicas tais como irite, ceratite, e conjuntivite, disfunção endócrina incluindo anormalidades no ciclo menstrual, impotência, calvície; e problemas de fertilidade, incluindo esterilidade e prematuridade⁴.

Durante a fase tardia da doença um grande número de sintomas podem ocorrer, podendo envolver todas as regiões do sistema nervoso que estão potencialmente envolvidas. Estes sintomas incluem distúrbios mentais como dor de cabeça, alucinações, delírio, ansiedade, irritabilidade e impulsos sexuais excessivos; distúrbios do sistema motor como mielite, mielopatia, fasciculação muscular e neuropatia periférica motora. Distúrbios do sono que dão o nome a doença e ocorrem em 74% dos pacientes. Anormalidades do sono que consistem em uma reversão do sono normal como insônia noturna e diurna, sonolência, episódios incontroláveis de sono, e uma alteração da estrutura do próprio sono como no início do sono com movimentos oculares rápidos ao invés de ocorrer no final⁴.

O tratamento de HAT tem sido insatisfatório devido as quatro fármacos utilizados no estágio inicial e tardio não serem disponíveis oralmente, frequentemente tóxicos e muitas vezes não efetivos fazendo com que os pacientes, muitas vezes, abandonem o tratamento (**Tabela 1**)⁴. Assim, cada vez mais se faz necessário estudo de potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da doença do sono⁴.

Tabela 1 - Fármacos usados no tratamento da Trypanosomiase Africana humana⁴.

	Primeira linha de Tratamento	Segunda linha de tratamento
Estágio Inicial		
<i>T b rhodesiense</i>	Suramina (IV)	Pentamidina (IM)
<i>T b gambiense</i>	Pentamidina (IM)	Suramina (IV)
Estágio Tardio		
<i>T b rhodesiense</i>	Melarsoprol (IV)	Nenhum disponível
<i>T b gambiense</i>	Eflornitina (IV) mais nifurtimox (oral)	Melarsoprol (IV)

* IV-Intravenoso; IM-Intramuscular.

Fonte:Extraído de KENNEDY⁴

1.1.3 *Leishmanias* e Leishmanioses

Leishmaniose é um amplo termo aplicado a um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*. Os parasitas são transmitidos através da picada de insetos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* infectados em um reservatório animal ou humano. Infecção humana é causada por aproximadamente 21 a 30 espécies que infectam mamíferos. Estes incluem o complexo da *L. donovani* com 3 espécies (*L. donovani*, *L. infantum*, e *L. chagasi*), o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, e *L. venezuelensis*), *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*, e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana*)⁷. Leishmaniose é predominante em 79 países. Existem aproximadamente 200 milhões de pessoas em risco de contrair a doença, com uma incidência de aproximadamente 300.000 casos por ano⁸.

A descoberta da *Leishmania donovani* ocorreu em 1903 quando Leishman e Donovan observaram esses parasitas em pacientes sofrendo Kala-azar (denominada posteriormente de Leishmaniose visceral) e classificaram os parasitas como pertencentes ao gênero *Leishmania*. Posteriormente, entre 1904 e 1908, foi observado um parasita semelhante em crianças da região do mediterrâneo, que foi denominado *Leishmania infantum*. Em 1941, S. Adler & M. Ber mostraram a transmissão da Leishmaniose por flebotomíneos (espécie *Phlebotomus* no mundo velho e *Lutzomyia* no novo mundo)⁹.

Durante seu ciclo, a Leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados. Os flebotomíneos injetam o estágio infeccioso (isto é a forma promastigota) do probóscide durante o alimento de sangue (1-Figura 3). Promastigotas que atingem o ferimento são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares (2-Figura 3). Promastigotas transformam nestas células em amastigotas (3-Figura 3), o qual multiplica por simples divisão e avançam para infectar outras células fagocíticas mononucleares (4-Figura 3). Parasita, hospedeiro e outros fatores afetam se a infecção se torna sintomática e se resultam de leishmaniose cutânea ou visceral. Flebotomíneos tornam-se infectados por ingerir células infectadas durante o alimento de sangue (5 e 6 da Figura 3). Em flebotomíneos, amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem no intestino (7-Figura 3), no

intestino grosso para organismos de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, e migram para o probóscide (8-Figura 3)¹⁰.

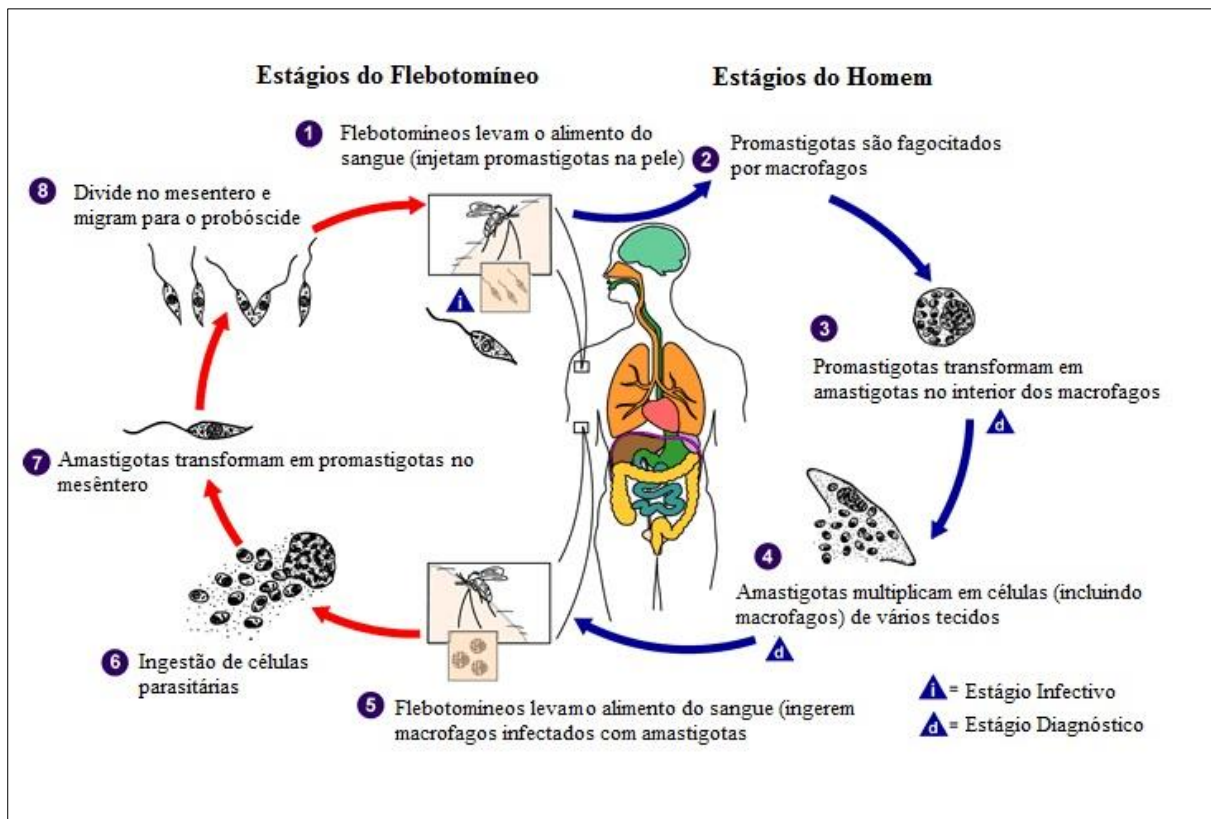


Figura 3 – Ciclo biológico da transmissão da Leishmaniose¹⁰.

Fonte: Extraído e Modificado de <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm>>¹⁰.

As formas da doença são definidas por síndromes clínicas causada por várias espécies do parasita. Três principais tipos de leishmaniose podem ser encontrados: leishmaniose visceral (VL ou kala-azar), leishmaniose cutânea (CL) e leishmaniose mucocutânea (MLC)⁸.

Os sintomas da leishmaniose visceral são febre, perda de peso, pigmentação da pele, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, ou pode ser assintomática. Pode acometer também cães que em muitos casos desenvolvem lesões renais e hepáticas. A leishmaniose cutânea inicia com uma pápula no local da picada do inseto, que aumenta de tamanho, forma uma crosta e eventualmente uma úlcera. No caso da mucocutânea ocorre o envolvimento da mucosa do nariz, cavidade oral e faringe⁷. A Figura 4 ilustra os três principais tipos de Leishmaniose.

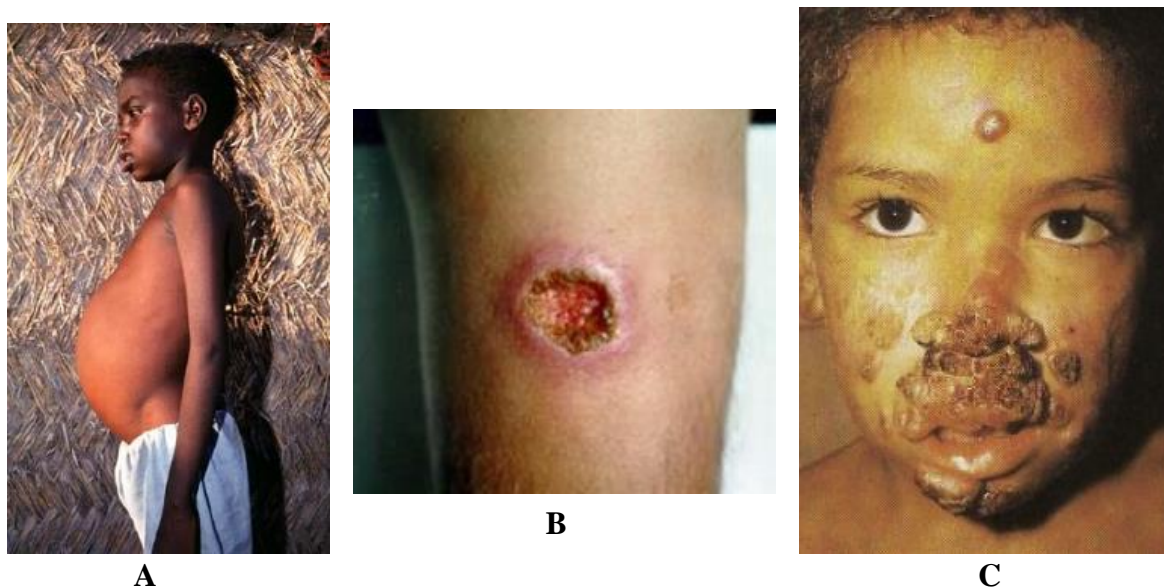


Figura 4 – Principais tipos de Leishmaniose: (A) Leishmaniose visceral. (B) Leishmaniose cutânea. (C) Leishmaniose mucocutânea.

Fonte: Extraído e Modificado de <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm>>¹⁰

O diagnóstico da Leishmaniose visceral é frequentemente baseada na detecção microscópica de amastigotas em tecidos aspirados ou amostras de biópsia de baço. Anticorpos de *Leishmania* (teste de aglutinação direta) podem ser detectados com alta especificidade e sensibilidade⁷.

No caso da Leishmaniose cutânea e mucocutânea o diagnóstico é geralmente baseado em exame microscópico da pele, normalmente feito a partir de lesões. Este exame é rápido e de baixo custo, mas tem sensibilidade limitada, especialmente em lesões crônicas. A melhor análise clínica nesse caso é por PCR, o qual é rápido, com alta sensibilidade e especificidade. Outros diagnósticos disponíveis para Leishmaniose cutânea incluem teste da pele (Montenegro), o qual detecta reação de hipersensibilidade tardia, porém não faz a distinção entre uma infecção recente ou passada⁷.

As medidas de prevenção, tais como o controle de vetores, uso de repelentes de insetos, pela construção de moradias humanas a distância superior a 500 metros da mata silvestre e pela erradicação dos *Phlebotomus/Lutzomyia* não são suficientes, pouco práticas ou difícil de sustentar¹⁰.

O tratamento recomendado para cada tipo de leishmaniose está resumido na **Tabela 2**. Para Leishmaniose Visceral o tratamento é amplamente baseado em antimonialis

Capítulo 1 - Introdução

pentavalentes, porém a resistência a antimoniais é o maior problema ocasionando falhas de até 50%. A anfotericina B é um tratamento eficaz utilizado em casos de resistência à antimoniais, no entanto, é tóxico e precisa ser dado por um período prolongado em regime de internamento. A alternativa é a de utilizar formas de lipossomas, o que é altamente eficaz e menos tóxica, porém muito caro. Miltefosina é o primeiro medicamento ativo por via oral eficaz contra leishmaniose, embora as preocupações sobre eventual resistência foram comprovadas. Outros fármacos eficazes têm sido usados no tratamento de leishmaniose. A pentamidina pode ser utilizado em casos de resistência ao tratamento de leishmaniose visceral, no entanto seu uso é limitado pela sua substancial toxicidade⁷.

O tratamento para a leishmaniose cutânea pode ser físico, incluindo crioterapia; lâmpadas de calor infravermelhas locais. A paromomicina (aminosidina) combinada com metilbenzetônio pomada também é utilizada no tratamento, no entanto, causa reação inflamatória local severa. O imiquimod, um imunomodulador tópico foi bem sucedido quando utilizado em combinação com antimoniato de meglumina. Os medicamentos imidazol/triazóis, fluconazol por via oral tem sido útil nas principais infecções. Além disso, cetoconazol e miltefosina foram estudados e mostraram-se efetivos⁷.

Apesar de ter muitos fármacos que estão sendo utilizados no tratamento da Leishmaniose, falhas no tratamento têm sido relatadas. Isso por causa da falta de efetividade, acessibilidade, falta de fármacos minimamente tóxicos, eficazes de fácil administração e facilmente disponíveis. Assim, uma vacina eficaz para o controle da leishmaniose é necessária¹¹.

Tabela 2 - Fármacos usados no tratamento da Leishmaniose⁷.

Fármacos Utilizados	
Leishmaniose Visceral	Antimoniais Pentavalentes Anfotericina B Lipossomal Miltefosina
Leishmaniose Mucocutânea	Anfotericina B
Leishmaniose Cutânea	Antimoniais Pentavalentes Fluconazola Ketoconazola Miltefosina Pentamidina Paromomicina

Fonte: Extraído de PISCOPO⁷

1.2 Selênio

Selênio foi descoberto em 1817 pelo químico suíço Jöns Jacob Berzelius e seu colega Gahn quando estudavam um precipitado avermelhado que era formado a partir da torrefação do enxofre. Inicialmente, eles acreditavam que este precipitado era o elemento químico Telúrio, devido ao cheiro de raiz forte quando aquecido, entretanto, estudando melhor perceberam um novo elemento químico. Este elemento no seu estado metálico tinha um brilho intenso acinzentado que fez Berzelius nomeá-lo Selênio, do grego selene, deusa da lua¹².

Selênio é um elemento químico com símbolo Se e número atômico 34, está na posição 6A da tabela periódica e é um semi-metal com propriedades intermediárias entre um metal e um não-metal. A afinidade do selênio para o oxigênio é menor que a do enxofre. Somente dois óxidos de selênio são bem conhecidos: SeO_3 e SeO_2 . Selênio também reage com hidrogênio, com água ou selenetos metálicos formando o composto seleneto de hidrogênio (H_2Se), que é altamente reativo e que se decompõe rapidamente em ar úmido, formando um depósito de selênio vermelho¹³.

O selênio está presente na natureza e em organismos em formas orgânicas e inorgânicas. As principais formas orgânicas são selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCys). As

Capítulo 1 - Introdução

formas inorgânicas são selenito (SeO_3^{-2}); seleneto (Se^{-2}); selenato (SeO_4^{-2}) e selênio elementar (Se)¹³. O ponto de entrada de selênio em animais é via plantas, que absorvem o elemento em sua forma inorgânica a partir do solo como sais de selenato e selenito férrico. Em uma escala global, a disponibilidade de selênio no solo varia entre áreas, e as concentrações de selênio em plantas estão relacionadas aos níveis de selênio nos solos circundantes. Solos alcalinos liberam mais selênio que solos ácidos. Em solos alcalinos, selenito é oxidado e torna-se selenato solúvel, o qual é facilmente assimilado pela planta. Por outro lado, em solos ácidos, selenito é ligado a hidróxidos de ferro, o que o faz ser altamente fixado a partir do solo. A incorporação e redistribuição de selênio por raízes, além de depender do tipo de solo, é também dependente das condições fisiológicas e espécie da planta¹⁰. Existem mais de 20 espécies de plantas acumuladoras de selênio. Dentre elas, a *Astragalus*, que pode acumular milhares de ppm. Plantas com alto conteúdo de selênio são tóxicas para animais e o risco de envenenamento animal torna-se alto acima de 5 ppm¹⁰.

Inicialmente, selênio foi considerado ser um agente tóxico para mamíferos. Por volta de 1930, descobriu-se que este elemento era responsável por doenças severas em animais. A primeira referência à toxidez do selênio foi feita por Madison, em 1856, que descreveu uma doença crônica fatal de equinos em Nebraska, EUA, região de elevada concentração de Se no solo¹⁴.

O foco sobre os efeitos tóxicos do selênio seguiu até 1957, quando Schwarz e Foltz identificaram o selênio como essencial à saúde animal. Estes pesquisadores demonstraram que quantidades traço de selênio protegiam contra necrose de fígado em ratos deficientes em vitamina E¹⁵. Além disso, foi visto que selênio era fundamental para crescimento anaeróbico de *Escherichia coli* quando crescidas em meio com glicose. Assim, tornou-se evidente a importância do selênio para mamíferos e algumas bactérias.

No final dos anos 60, interessados na função do selênio na saúde humana, pesquisadores reuniram forças para investigar doenças humanas similares às aquelas encontradas em animais devido à deficiência de selênio¹⁶. Atualmente, sabe-se de muitos benefícios à saúde humana atribuídos a este elemento, tais como: supressor da repressão viral, prevenção de doenças cardíacas e musculares, agente retardador do envelhecimento, retardador da progressão da AIDS em HIV soropositivos, elemento atuante na prevenção do câncer e essencial na formação de espermatozoides, no desenvolvimento de mamíferos e funcionamento do sistema imune¹⁷.

A falta de selênio na dieta está relacionada com várias doenças em humanos e animais e a mutação em determinados genes do metabolismo desse elemento é letal¹⁷. Assim, segundo a resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é necessária uma ingestão diária de 34 µg de selênio que pode ser obtida através da dieta de vários grãos e vegetais¹⁸. Entre eles estão: ervilha, feijão, cenoura, tomate, beterraba, pepino, cebola, alho, repolho, mostarda, brócolis, aspargos, castanhas do Brasil, entre outros. Para seres humanos, doses diárias acima de 880 µg de selênio são consideradas tóxicas, enquanto doses diárias abaixo de 20 µg são consideradas insuficientes¹⁹.

Apesar do conhecimento dos muitos benefícios a saúde devido ao selênio, a explicação de como isso ocorre é pouco elucidada^{20,21}. Existe em torno de 20 proteínas conhecidas contendo selênio em mamíferos e é bem provável que elas sejam mediadoras dos benefícios da dieta de selênio. Portanto, é necessário entender como o selênio é inserido em proteínas, sua identidade nelas e função.

1.3 A expansão do código genético: Descoberta do 21º aminoácido Selenocisteína

A elucidação de como o selênio é incorporado em proteínas teve um grande progresso na última década e revelou alguns resultados surpreendentes que têm alterado o conceito inicial do código genético.

O código genético descoberto em 1960 consiste de 64 códons de nucleotídeos. Cada uma das possíveis 64 combinações de três nucleotídeos foi vista durante muito tempo como tendo um único uso, codificar um dos 20 aminoácidos ou atuar como o ponto final ou inicial na leitura da cadeia polipeptídica²². Acreditava-se que este código era universal e invariante. Com o passar dos anos modificações foram surgindo, alterando este conceito e mostrando que o código genético poderia sofrer expansão.

Assim, em 1973 houve a expansão do código genético com a descoberta da principal forma ativa do selênio, o vigésimo primeiro aminoácido selenocisteína (Sec, U). Sec foi descoberta por dois grupos de pesquisadores que observaram o selênio como componente essencial da enzima glutatona peroxidase de mamíferos e posteriormente identificaram este componente de selênio como sendo o resíduo de Sec em selenoproteína A do complexo formado pela enzima glicina redutase de bactéria²³.

Mais tarde, em 1986, quando foi realizado o sequenciamento gênico e proteico da glutationa peroxidase de bovino e formato desidrogenase de bactéria, descobriu-se como Sec era decodificada. Pelo alinhamento da sequência dos genes com a sequência das proteínas correspondentes, eles observaram que a localização do resíduo Sec na proteína coincidia com o códon TGA do gene. Portanto, revelou-se o paradigma da biossíntese de uma selenoproteína, mostrando que o códon TGA, inicialmente reconhecido somente como códon de terminação da síntese proteica tinha dupla função: parada da tradução e inserção de Sec²³. Porém, para o reconhecimento do códon UGA como inserção de Sec são necessários fatores proteicos específicos.

O aminoácido selenocisteína está presente no sítio ativo de selenoproteínas que estão envolvidas em vários processos de oxidorredução²⁴. Sua fórmula estrutural é muito similar ao aminoácido cisteína, diferindo pela substituição do enxofre pelo selênio em sua cadeia lateral (Figura 5).

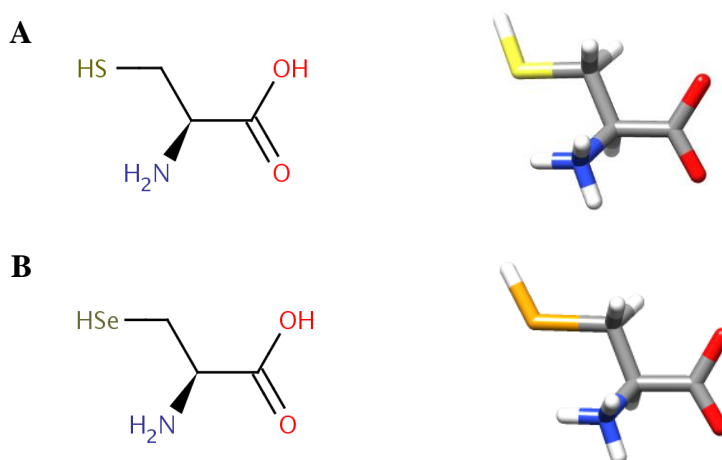


Figura 5 – Representação em 2D e 3D dos aminoácidos: **(A)** Cisteína. **(B)** Selenocisteína. Em vermelho é representado o oxigênio, em azul o nitrogênio, em amarelo o enxofre e em laranja o selênio. Fonte: Elaborado pela Autora a partir do programa UCSF Chimera²⁵.

A troca do enxofre pelo selênio faz com que o aminoácido Sec tenha propriedades peculiares como, por exemplo, sob condições fisiológicas o grupo selenol em selenocisteína esta mais reativo, isto é, na sua forma desprotonada, enquanto que o grupo tiol da cisteína esta protonado e menos reativo²⁶. Pelo fato do selênio ser mais reativo que o enxofre, ele atua em processos como antioxidante, isto é, perde elétrons para combater os radicais livres. Isso

ocorre devido as características do selênio em relação ao enxofre como ser menos eletronegativo e possuir um raio atômico maior.

1.4 Selenoproteínas

A família de selenoproteínas exhibe diversidade de forma, função, distribuição e evolução. A primeira selenoproteína identificada foi a glutathiona peroxidase (GPx), pela forte relação demonstrada entre a concentração de selênio nos eritrócitos e a atividade da enzima. Assim, a GPx foi o primeiro marcador bioquímico funcional do status de selênio celular. Existem 8 formas de GPx e elas têm características similares, ou seja, todas têm como principal função proteger as células, juntamente com vitamina E, contra o acúmulo de H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos, garantindo a integridade de membranas celulares. A atividade enzimática das GPx é diretamente proporcional à absorção de selênio. Especialmente, as formas 1 a 4, as quais são dependentes de selênio com intuito de realizar a neutralização. Assim, existe uma forte relação entre deficiência de selênio e estresse oxidativo²⁷.

As deiodinases, segundo tipo de selenoproteínas a serem caracterizadas exercem função no metabolismo do hormônio da tireóide²⁸.

SelP é uma glicoproteína extracelular e foi descoberta em humanos em 1993 e é a mais abundante selenoproteína encontrada no plasma²⁹. Ela constitui mais de 50% da reserva de selênio no plasma³⁰. Exerce uma função na homeostase e no transporte de selênio nos tecidos e é também um antioxidante extracelular³¹.

As três selenoproteínas tiorredoxinas redutases (TR1, TR2, TR3) funcionam como antioxidante e no controle do potencial redox intracelular. Além disso, atuam também como fator de crescimento celular, na síntese de DNA e inibição de apoptose (morte celular programada)²⁸.

Enquanto, muitas das primeiras selenoproteínas descritas utilizam o potencial redox do selênio no sítio ativo das enzimas, as mais recentes selenoproteínas identificadas exibem uma variedade de funções, incluindo estrutural, transporte, sinalização, enzimática e algumas não definidas. Selenoproteínas podem ser intracelulares, transmembranares ou secretadas. São encontradas nos três domínios de vida, porém, não são igualmente representadas dentro

deles³². A glicina redutase de *Clostridium sticklandii* foi a primeira selenoproteína de bactéria a ser descoberta. É formada por um complexo de três proteínas A, B e C. Em *E.coli* foram identificadas três selenoproteínas, as formato desidrogenases H, N e O (FDH_H, FDH_N e FDH_O). Estas selenoenzimas são expressas sob diferentes condições de crescimento e todas catalisam a oxidação do formato em CO₂ e H⁺³³.

Estudos sugerem que mais de 100 selenoproteínas pode existir em animais, nas quais 30 foram identificadas pela marcação de Se⁷⁵ *in vivo*³⁴. Dentre elas, estão a SelK e SelT, as quais foram encontradas homólogas em tripanossomatídeos. Além disso, foi identificada no selenoproteoma de Tripanossomatídeos, a proteína SelTryp, que é exclusiva desta família.

A SelK é uma selenoproteína transmembrana, cuja função permanece desconhecida. Estudos mostraram que esta proteína pode estar relacionada à proteção de células de danos oxidativos³⁵, com a regulação da homeostase no retículo endoplasmático, estando envolvida na degradação de proteínas mal-enoveladas³⁶.

A selenoproteína SelT humana possui um domínio catalítico tiorredoxina com um motivo redox (CxxU)³⁷. SelT esta localizada no retículo endoplasmático e complexo de Golgi e esta relacionada com a adesão celular, equilíbrio do status redox³⁸ regulação da homeostase de Ca⁺² em resposta a neuropeptídeos³⁹. Além disso, devido ao seu domínio tiorredoxina pode estar envolvida em um mecanismo de proteção celular contra danos oxidativos⁴⁰.

Segundo predição de localização celular, SelTryp é mitocondrial e possui, assim como SelT, um motivo (CxxU). Sua função não esta ainda bem definida. Análises de sequência apontam que ela pode estar envolvida em reações que envolvem a transferência de enxofre, desintoxicação de cianeto, metabolismo de selênio e enxofre e biossíntese de grupos prostéticos em proteínas com ferro e enxofre⁴¹.

1.5 Síntese de selenocisteínas e incorporação em Selenoproteínas

A descoberta de que o aminoácido selenocisteína era codificado pelo códon de parada TGA (UGA) e que a inserção ocorria co-traducionalmente reabriu discussões consistindo na estabilidade e evolução do código genético. A regra geral do código genético estabelece que em um organismo um códon específico não pode ter dois diferentes significados de leitura.

Por outro lado, a via de síntese e incorporação de Sec no códon UGA (também códon de parada) viola esta regra. Assim, é necessária uma maquinaria complexa, envolvendo enzimas e fatores proteicos para permitir que ocorra a síntese e incorporação de Sec no polipeptídeo nascente.

A maioria dos 20 aminoácidos canônicos são carregados para suas espécies de tRNA cognatas por aminoacil-tRNA sintetases individuais. Todas as aminoacil-tRNAs carregadas dos aminoácidos canônicos sofrem a formação de um complexo terciário com o fator de alongação Tu (EF-Tu) e a molécula de GTP os quais constituem o sistema de entrega para o sítio A ribossomal para decodificar os 61 códons (Figura 6).

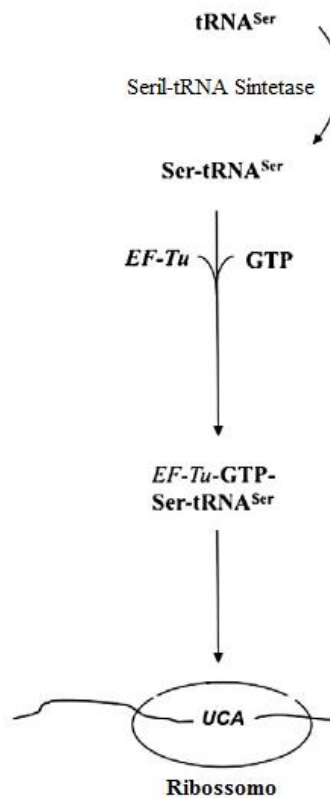


Figura 6 – Esquema da participação de fatores proteicos nas reações de síntese e incorporação de aminoácidos padrões⁴².

Fonte: Extraído e Modificado de YOSHIZAWA⁴²

As vias para inserção dos 20 aminoácidos canônicos e do 21º aminoácido, selenocisteína, são paralelas e suas funções requerem mecanismos precisos de controle de fidelidade. Porém, para a biossíntese e incorporação de Sec são necessários muitos outros e diferentes fatores celulares, o que faz dela complexa e dispendiosa para os organismos que a produzem⁴².

Apesar da síntese de selenoproteínas ser um processo evolucionariamente conservado, existem algumas diferenças no mecanismo entre procariotos, arqueas e eucariotos.

A característica comum a todos os organismos é o códon UGA-Sec, o tRNA específico, um elemento específico de estrutura secundária no mRNA e alguns fatores proteicos⁴³. O tRNA transportador específico para a incorporação de Sec, tRNA^{[Ser]Sec} ou *SelC*, possui um anticódon UCA, correspondente à serina no entanto também reconhece o códon UGA. *SelC* possui características estruturais distintas dos demais tRNAs, e portanto não é reconhecido pela maquinaria padrão que adiciona aminoácidos a partir de tRNAs aminoacilados ao peptídeo nascente pela via ribossomal⁴².

Como exemplo das peculiaridades de *SelC*, pode-se citar o tRNA^{[Ser]Sec} de *E. coli*, o mais longo da espécie formado por 95 ribonucleotídeos, sendo que 8 pares de bases estão no braço acceptor e 5 no braço T, além de 6 no braço D⁴⁴. Em eucariotos e arqueobactérias o número de ribonucleotídeos é cerca de 90, sendo 9 pares de bases no braço acceptor e 4 no braço T. Além disso, verifica-se a presença do nucleotídeo modificado 5-metilaminometil-2selenouridina (mnm5Se2U) na região do anti-códon do tRNA^{Sec} no caso de eucariotos e arqueobactérias⁴⁵ (Figura 7).

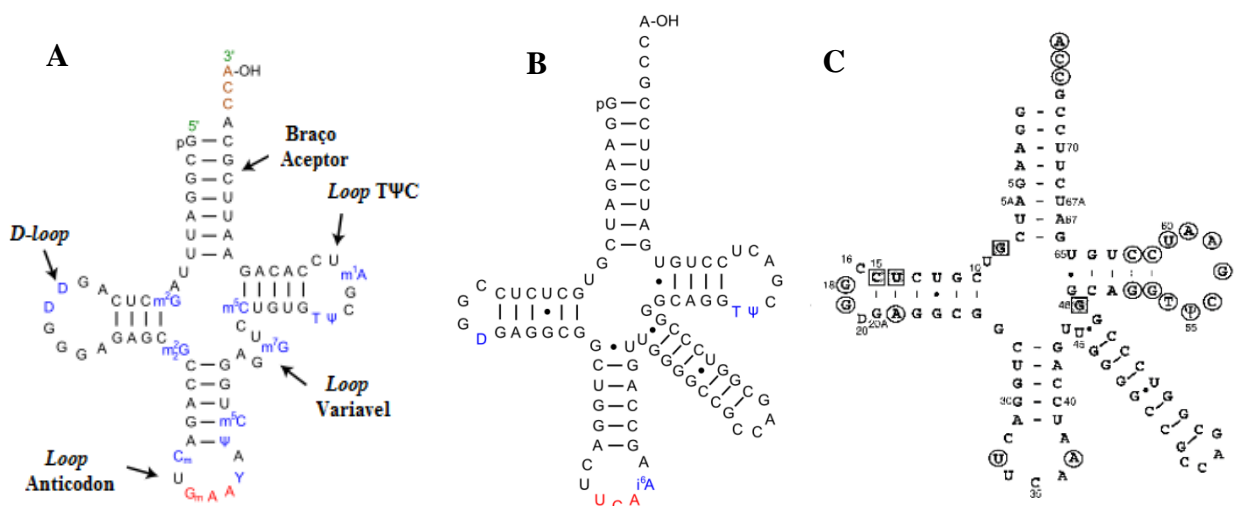


Figura 7– Estrutura secundária global em forma de folhas de trevo de todos os tRNAs. (A) Estrutura de tRNA com seus 4 braços, além de um braço extra, necessários para a função de adaptação. (B) O tRNA^{[Ser]Sec} de *Escherichia coli* (C) O tRNA^{[Ser]Sec} de eucariotos.

Fonte: Extraído e Modificado de COMMANS⁴⁶.

Durante todo o processo de síntese e incorporação de Sec verificou-se que o Sec tRNA^{[Ser]Sec} é necessário, mas não é suficiente na decodificação do UGA como uma Sec. Assim,

outro fator determinante é necessário e extremamente importante na leitura do códon UGA como uma Sec. Esse fator está ligado a estrutura secundária em alça do RNA, designado como elemento SECIS - Sequência de Inserção a Selenocisteína (Seleno Cystein Insertion Sequence)⁴⁷.

O elemento SECIS é uma estrutura secundária em alça no mRNA de genes de selenoproteínas. Em bactérias, o elemento SECIS contém pelo menos 40 nucleotídeos que formam a alça. Nesse organismo, SECIS se localiza na região codificante dos genes de selenoproteínas, imediatamente anterior ao códon UGA que codifica a Sec (Figura 8A)⁴⁸. Estudos mostram que apenas 17 pb na região superior da alça são suficientes para permitir a incorporação do resíduo Sec. Entretanto, esses 17 pb tem que estar localizados a 11 pb do códon UGA (Figura 9A).

Em eucariotos, SECIS está presente na região 3' UTR (não traduzida) do mRNA dos genes de selenoproteínas (Figura 8B) e a distância entre o códon UGA e o elemento SECIS está parcialmente restrita, em alguns casos até alguns kilobases distante do códon UGA^{49,50}. Nesses organismos, o elemento SECIS possui estruturas secundárias bem conservadas para incorporação de Sec como: um motivo AAR conservado com duas bases AA consecutivas não pareadas ou duas bases CC, localizadas na alça apical; um quarteto de bases que não obedece o pareamento Watson-Crick (A – T e C – G), apresentando um G pareado com um A no núcleo do SECIS e um A pareado com G anterior ao núcleo SECIS. O elemento SECIS de eucariotos pode ser classificado em duas formas: Forma I e Forma II referentes a ausência ou presença de uma alça apical adicional, respectivamente⁴³ (Figura 9B). Em arqueobactérias, o elemento SECIS também está localizado no 3'UTR, mas a estrutura se diferencia em alguns aspectos da de eucariotos (Figura 8C e Figura 9C)⁵¹.

Qualquer alteração na estrutura SECIS ou na distância entre o códon UGA e o elemento SECIS é prejudicial na incorporação de Sec na cadeia polipeptídica nascente⁵².

A SECIS é reconhecida por um fator de alongação de tradução, chamado SELB em *E. coli*, arqueobactérias e SBP2 em eucariotos⁴⁸.

Capítulo 1 - Introdução

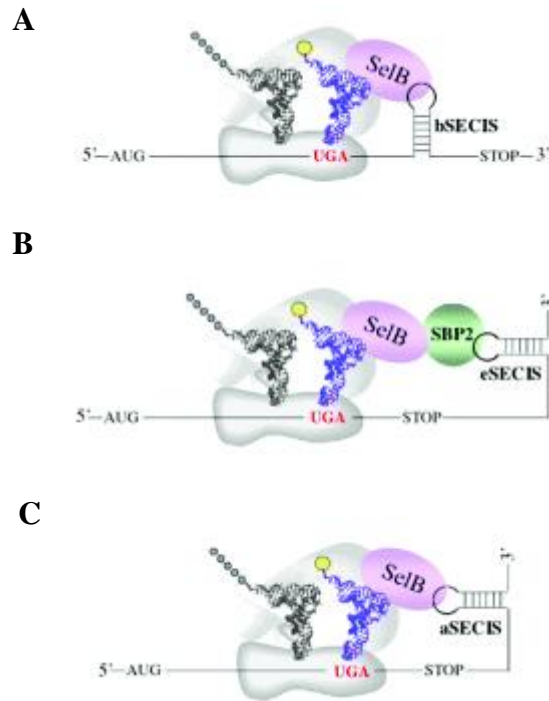


Figura 8 – Incorporação de Selenocisteína mostrando a localização do elemento SECIS (Sequência de Inserção a Selenocisteína). (A) Em bactéria. (B) Em eucarioto. (C) Em arqueobactéria. Esse mecanismo ocorre em um códon UGA em fase, localizado no interior do gene. A linha simboliza o RNA mensageiro com o códon UGA em fase de leitura. O elemento SECIS, estrutura secundária adquirida pelo mRNA, compreende a estrutura onde a maquinaria de incorporação de selenocisteína (Sec) irá ligar-se.

Fonte: Extraído e Modificado de COBUCCI-PONZANO ⁴⁸

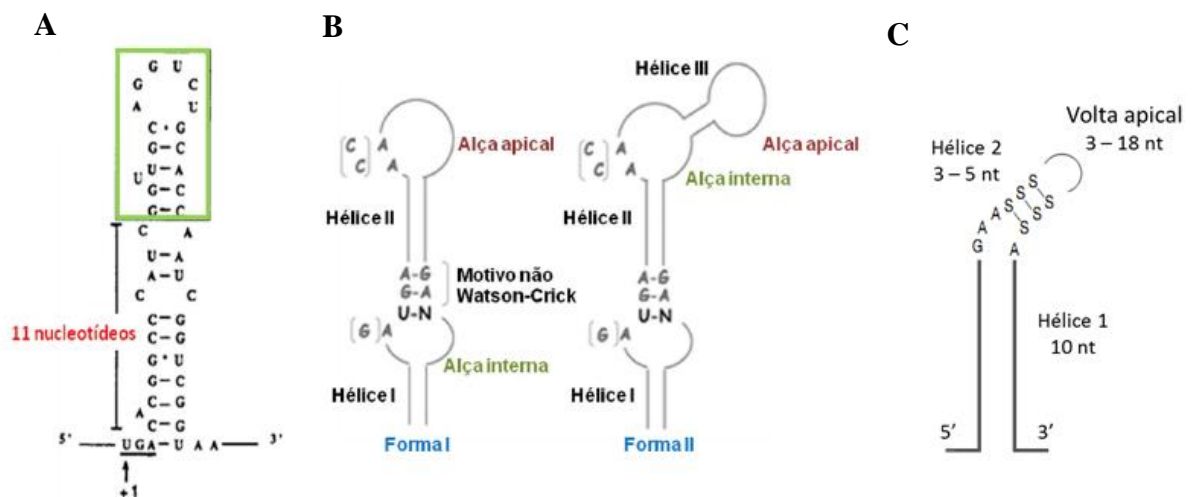


Figura 9 – Estrutura consenso do elemento SECIS em (A) eubactérias (*E. coli*). O retângulo verde mostra a região reconhecida pela proteína SELB a exatamente 11 nucleotídeos do códon UGA. (B) eucariotos. São observados dois tipos de elemento SECIS: Forma I e Forma II. Os nucleotídeos conservados que são necessários para a função do elemento SECIS incluem bases AA ou CC na região do *loop* apical. (C) arqueobactérias ⁴³⁻⁵³⁻⁵⁴.

Fonte: Extraído e Modificado de PAPP, ROTHER, LI ⁴³⁻⁵³⁻⁵⁴

O sistema responsável pela biossíntese de selenocisteína foi bem caracterizado em *E. coli*, mas em eucariotos ainda existem questionamentos apesar dos consideráveis avanços que foram obtidos na sua elucidação.

1.5.1 Síntese e incorporação de Selenocisteína em Selenoproteínas de Procarioto

A síntese de Sec é peculiar, uma vez que em todos os casos reportados na literatura até o momento a sua síntese ocorre a partir da aminoacilação do $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ por uma serina pela enzima Seril- tRNA sintetase⁴².

Uma enzima denominada Sec Sintase (SELA) a qual tem como co-fator o piridoxal fosfato converte a seril - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ em selenocisteil - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ através da remoção do grupo hidroxila da cadeia lateral da serina, eliminando uma molécula de água, criando um intermediário enzimático aminoacrilil- $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ ⁴².

Posteriormente, o selenofosfato é transferido para a molécula intermediária (aminoacrilil - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$) resultando no Sec - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ maduro. O selenofosfato é obtido através da fosforilação de seleneto, a partir de ATP, pela enzima selenofosfato sintetase, SELD⁵⁵. Outra enzima, denominada SELB, liga-se ao elemento SECIS do mRNA e atua como fator de alongação. SELB interage com Sec - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$, GTP e o elemento SECIS formando um complexo quaternário estável. A formação deste complexo permite que ocorra a inserção de selenocisteína no polipeptídeo nascente no sítio A do ribossomo, após a hidrólise de GTP catalisada pela SELB⁵⁶ (Figura 10).

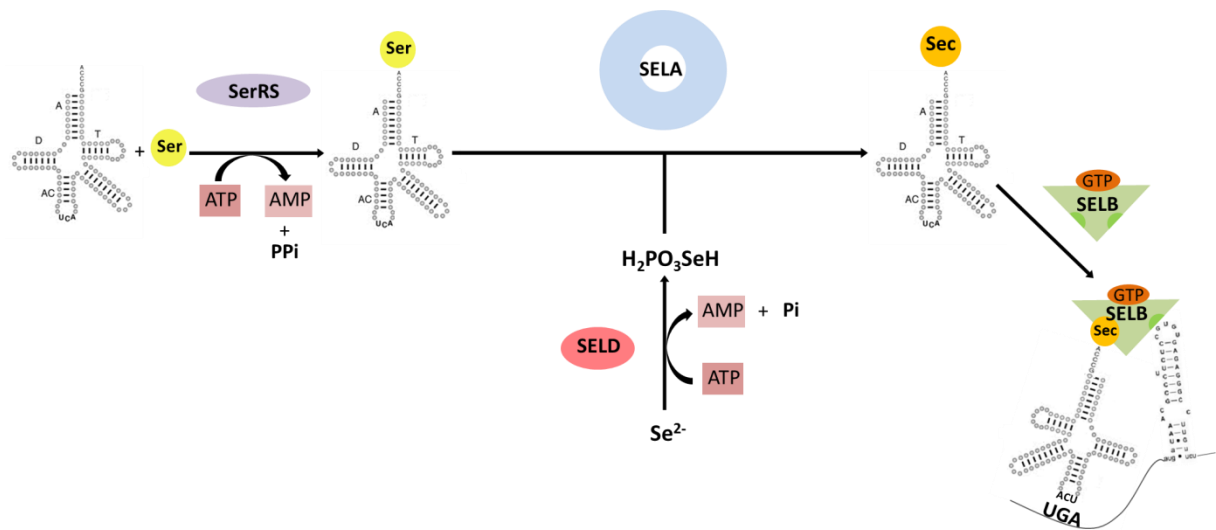


Figura 10 – Representação esquemática comparativa das vias de biossíntese e incorporação de selenocisteína em selenoproteínas em procariotos.

Fonte: Extraído e modificado de STOCK⁵⁷.

1.6 Via de biossíntese de Selenocisteína em Eucarioto

Descrições recentes da via de biossíntese de Sec em eucariotos e arqueobactéria demonstram que os processos são similares, mas não idêntico a via em procarioto⁵⁸.

A via de biossíntese de selenocisteína em eucarioto e arqueobactéria parece conter diferentes enzimas para etapas particulares e pode também requerer etapas adicionais. Em eucarioto onde a transcrição é nuclear e a tradução citoplasmática existe um desafio regulatório adicional, não está claro se toda ou parte da via de biossíntese de Sec ocorre no núcleo ou no citoplasma. No modelo atual da via de biossíntese de Sec a presença de ambos sinais de localização nuclear e sinais de exportação nuclear em muitos fatores de biossíntese de selenoproteínas sugere que fatores Sec eucariotos pode lançar entre o citoplasma e o núcleo, conforme necessário.

Outras diferenças entre a incorporação da Sec em procariotos, eucariotos e arqueobactérias envolve a exigência de fatores protéicos. Em procariotos, um único fator protéico, SELB executa múltiplas funções. SELB liga-se ao elemento SECIS e atua como um fator de alongação carregando o Sec-tRNA^{[Ser]Sec} e associando com o ribossomo⁵⁹. Em ambos, eucarioto e arqueobactérias, homólogos de SELB foram identificados que funcionam como fatores de alongação, ligando a Sec-tRNA^{[Ser]Sec}. Em eucarioto, dois ou mais fatores protéicos são exigidos para realizar as funções de ligação a SECIS e o fator de alongação. Dentre eles

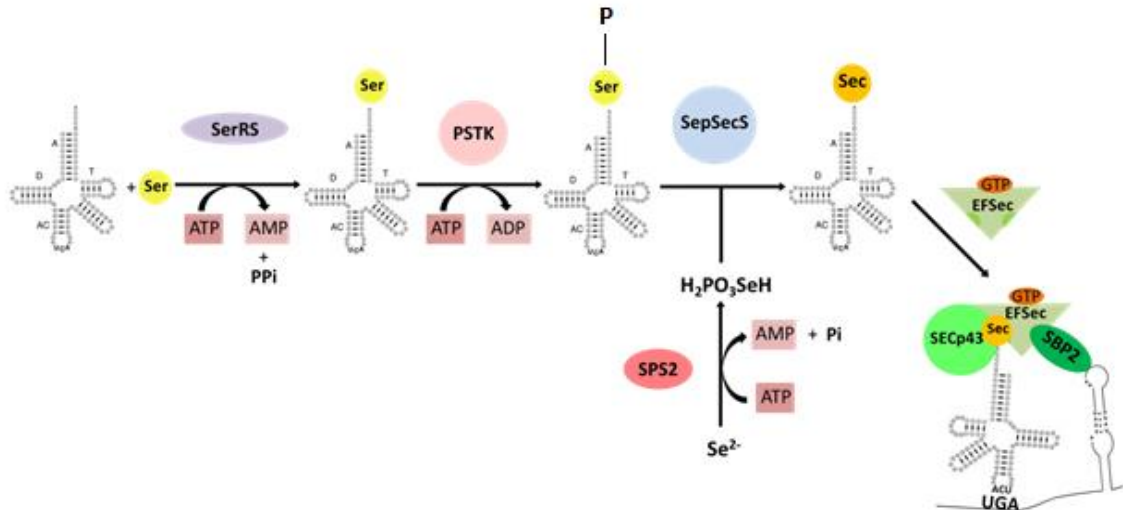
estão a proteína SBP2 (proteína ligante ao elemento SECIS), o fator específico para Sec (EFSec)⁶⁰.

Embora a via de biossíntese de Sec em eucariotos esteja ainda sendo elucidada, muitas das proteínas envolvidas têm sido identificadas baseada na via de procarioto. Em eucariotos, duas enzimas selenofosfato sintetase distintas, SPS1 e SPS2, convertem seleneto e ATP em monoselenofosfo. Recentemente foi reportado que SPS2 possui a capacidade de sintetizar selenofosfato *in vitro*, enquanto que SPS1 não possui essa capacidade⁶¹. SPS1 parece estar envolvida na reciclagem de selenocisteína e no resgate de selênio⁶².

Em ambos, procariotos e eucariotos, o tRNA^{[Ser]Sec} é carregado com serina pela enzima seril-tRNA sintetase. Em seguida ocorrem as etapas em eucariotos que ainda não estão estabelecidas inteiramente. Pela analogia com a via em procariotos, uma enzima com atividade de Sec sintase seria necessária para converter a seril-tRNA^{[Ser]Sec} resultante em selenocisteil- tRNA^{[Ser]Sec}. A SLA/LP, uma proteína identificada em associação com o tRNA^{[Ser]Sec} provavelmente exerce a função de Sec sintase em eucariotos⁶³, pois a análise das sequências revelam que esta proteína é um membro da superfamília da transferase dependente de piridoxal fosfato, uma família que também inclui a Sec sintase bacteriana⁶⁴. Recentemente a Sec sintase (SLA/LP) foi identificada como SEPSECS⁶⁵. Além disso, uma fosfoseril-tRNA quinase foi identificada e atua na conversão da seril- tRNA^{[Ser]Sec} para fosfoseril-tRNA^{[Ser]Sec}, que provavelmente é um intermediário na transição para selenocisteil – tRNA^{[Ser]Sec}⁶⁶. Outro fator proteico é a SECp43 que se liga ao tRNA^{[Ser]Sec} e pode ter uma função adicional promovendo a associação de complexos supramoleculares envolvidos na incorporação da Sec (Figura 11)⁶⁷.

Capítulo 1 - Introdução

A



B

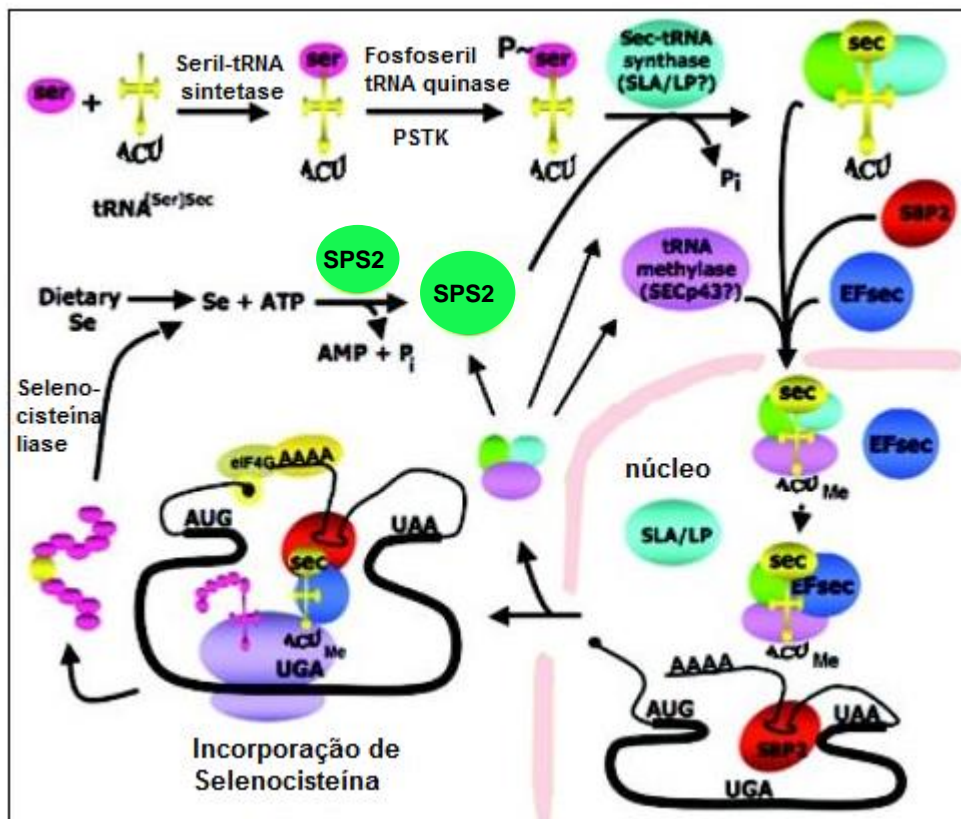


Figura 11 – Duas representações esquemáticas das vias de biossíntese e incorporação de selenocisteína em selenoproteínas eucarióticas. (A) Sequência de reações enzimáticas. (B) Possíveis complexos multiproteicos envolvidos na biossíntese e incorporação de selenoproteínas no interior do compartimento celular.

Fonte: Extraído e modificado de (A) STOCK⁵⁷ e (B) SMALL-HOWARD⁶⁷

1.7 Via de Biossíntese de Sec em Kinetoplastida

Em Kinetoplastida (*Trypanosoma* e *Leishmania*) a via de síntese de Sec até meados de 2003 não tinha sido explorada. A primeira evidencia que Kinetoplastida devia ter a maquinaria de síntese de Sec resultou a partir da identificação de um transcrito (ODD1) em *Leishmania major* contendo diversos códons de terminação UGA em sua fase de leitura e um possível elemento SECIS⁶⁸. Esse gene foi sugerido como sendo uma selenoproteína, mas sem maiores evidências.

Não era óbvia a existência dessa via em protozoários. Diversos organismos não possuem, como algumas eubactérias, plantas, fungos e *Saccharomyces cerevisiae*. Assim sendo, a via de incorporação de selenocisteína em Kinetoplastida permaneceu uma incógnita durante anos⁶⁹.

Estudos realizados em nosso grupo identificaram a via de biossíntese de Sec em Trypanosomatídeos⁶⁹. Através de buscas computacionais e análise de transcritos, foi identificado homólogos de tRNA^{[Ser]Sec} em todas as espécies de Kinetoplastida que possuem o genoma sequenciado e disponível. Estes tRNAs possuem todas as características que os assinalem como homólogos de tRNA^{[Ser]Sec} (Figura 12).

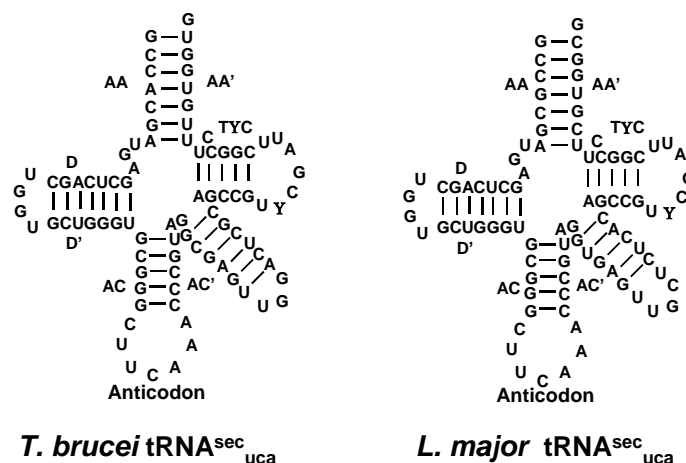


Figura 12 - Estrutura 2D prevista para os tRNA^{Sec} de *T. brucei* e *L. major*, identificados por busca genômica. Fonte: Extraído de CASSAGO⁶⁹

Posteriormente, diversos genes codificantes para as enzimas conhecidas em eucariotos envolvidas nessa via metabólica como *SelD*, *SelB*, *SelA* e *Secp43*, foram identificados tanto em *Leishmania* quanto em *Trypanosoma*. Dentre os genes identificados em Kinetoplastida está o *SelD* que codifica a enzima selenofosfato sintetase (SPS2) a qual exerce um importante papel na via de Biossíntese de Sec.

1.8 Selenofosfato sintetase

Selenofosfato sintetase (SPS) é uma enzima central na via de biossíntese de Sec^{70;51}, catalisando a produção de monoselenofosfato (SeP). A reação ocorre pela ativação de seleneto com ATP e água, em uma estequiometria de 1:1:1, resultando na formação de adenosina 5'-monofosfato (AMP), ortofosfato (Pi) e a forma ativa biologicamente de selênio, monoselenofosfato (SeP)⁴⁷ (Figura 13).

Resultados recentes demonstraram que SeP é derivado da transferência do grupo γ -fosfato do ATP para seleneto, enquanto o grupo β -fosfato é liberado como ortofosfato⁷¹.

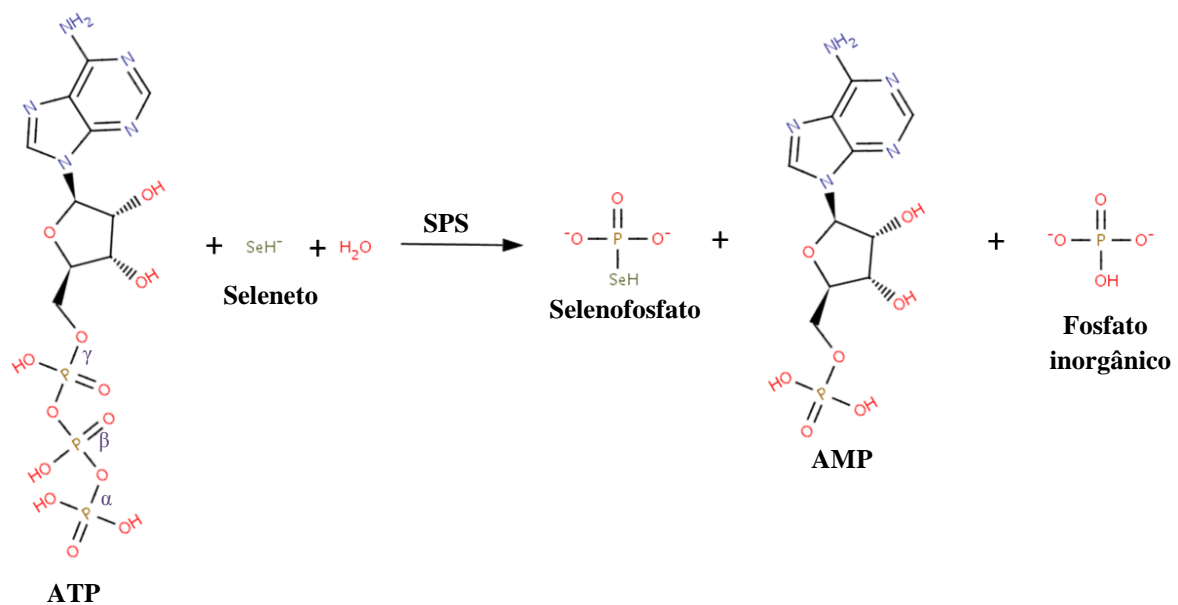


Figura 13 – Representação da reação enzimática catalisada pela selenofosfato sintetase.

Fonte: Elaborado pelo Autora

SPSs são encontradas em todos os domínios de vida e tem um resíduo de cisteína ou selenocisteína na região N-terminal rica em glicina, correspondendo ao sítio catalítico da enzima⁷². Em animais, existem dois homólogos de selenofosfato sintetase, designados por SPS1 e SPS2, com identidade sequencial de 72% em humano. Enquanto observa-se a conservação da cisteína/selenocisteína catalítica para a SPS2, a SPS1 não a possui e sua função é desconhecida. Especula-se que a SPS1 esteja envolvida na via de salvação de selênio que recicla selenocisteína⁶².

Selenofosfato sintetase de *Trypanosoma brucei* (TbSPS2) e *Leishmania major* (LmSPS2) foram identificadas em kinetoplastidae e assim como o ortólogo em *Escherichia coli*, não são selenoproteínas⁷³, contrastando com a selenoproteína SPS2 de mamíferos. Além disso, TbSPS2, inicialmente considerada irrelevante para sobrevivência de *T. brucei*⁷⁴ foi recentemente demonstrada estar envolvida na proteção contra estresse oxidativo. O silenciamento do gene *SelD* em *T. brucei* resulta em morte celular quando tratada com peróxido de hidrogênio, estabelecendo sua importância no metabolismo celular⁷⁵.

Em 2008, foi publicada a primeira estrutura cristalográfica de uma selenofosfato sintetase, a SPS de *Aquifex aeolicus*⁷⁶. Esta estrutura era da proteína nativa e truncada no N-terminal em 25 resíduos (código PDB 2ZAU). A estrutura revelou um enovelamento do tipo α/β , composto por dois domínios homólogos que correspondem aos apresentados pelas proteínas pertencentes à Superfamília AIRS. Nesta superfamília de proteínas, encontram-se as enzimas que se ligam a ATP que possuem no N-terminal sequência conservada, ligadora do nucleotídeo⁷⁷, tamanho similar e são ativas na forma dimérica.

Entretanto, existe uma peculiaridade da enzima selenofosfato sintetase em relação às outras proteínas dessa família, que consiste do consumo de ambas ligações fosfoéster de alta energia do ATP na catálise para formar o produto selenofosfato, o AMP e o fosfato inorgânico. Essa peculiaridade é devida a um possível mecanismo de auto-regulação da reação catalítica como uma forma de proteção da célula contra o produto selenofosfato reativo^{76,77}. Assim, a proposta para o mecanismo de reação é dividida em duas etapas (Figura 14).

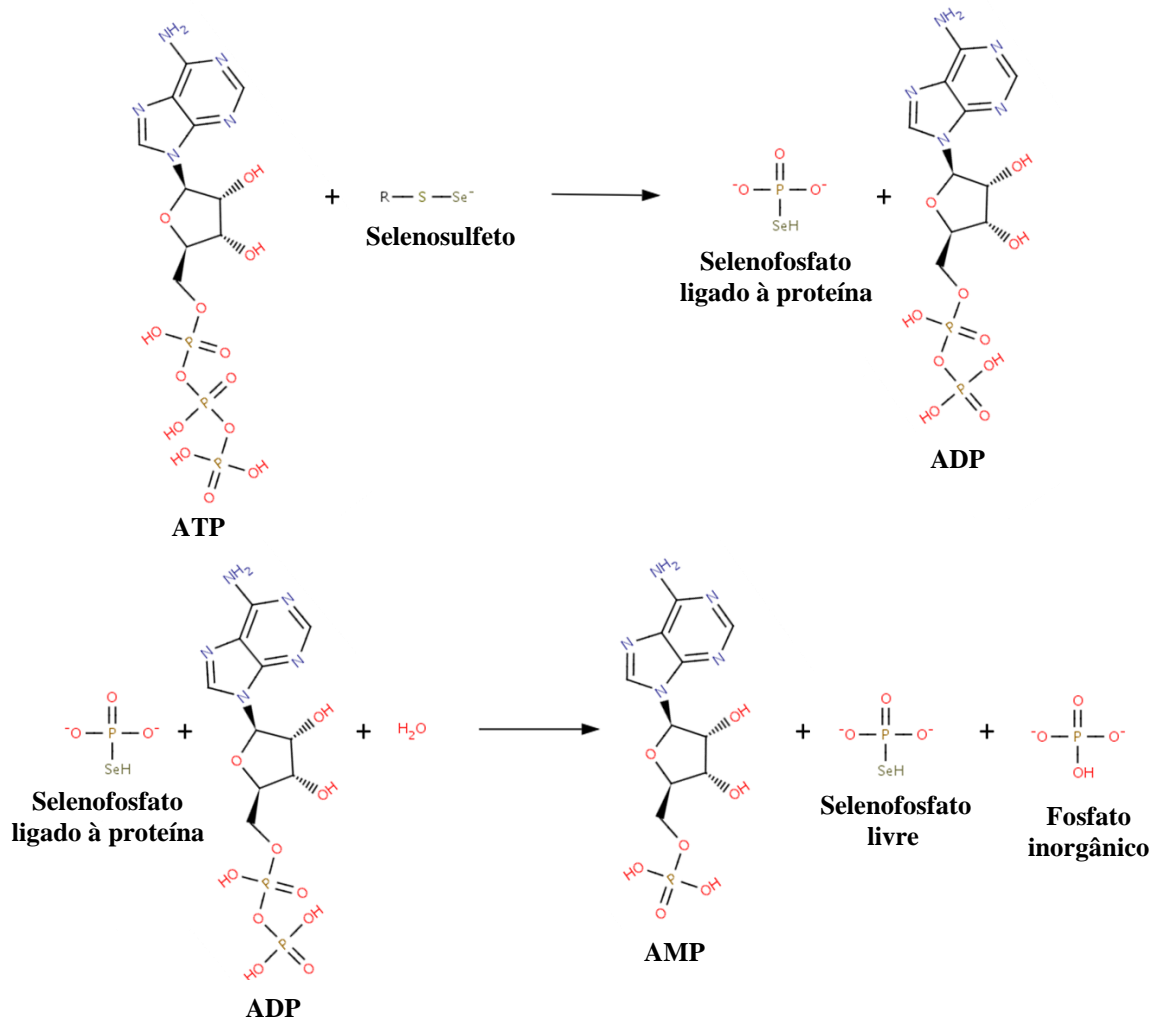


Figura 14 – Representação das duas etapas da reação enzimática catalisada pela selenofosfato sintetase.
Fonte: Elaborado pelo Autora

Atualmente, outras estruturas cristalográficas das SPSs foram reportadas. A estrutura da SPS de *Aquifex aeolicus* (*Aa*SPS) inteira na forma apo e em complexo com AMPCPP (α,β -methyleneadenosine 5'-triphosphate), um análogo de ATP não hidrolisável⁷⁸, SPS1 humana (*hs*SPS1) em complexo com análogo de ADP, AMPCP (α,β -methyleneadenosine 5'-diphosphate) e ambos produtos ADP e Pi⁷⁹ e a SPS mutante C17S de *E. coli* (*Ec*SPS) na forma apo⁸⁰.

Nas estruturas da AaSPS, ambas formas aberta e fechada do *loop* rico em glicina do N-terminal foram observadas mostrando que essa região é altamente flexível⁷⁸. A AaSPS em complexo com AMPCPP (código PDB 2YYE), revelou dois sítios de ligação a ATP, formados na interface de dimerização do homodímero⁷⁸. Quatro resíduos de ácido aspártico coordenam quatro íons Co^{2+} que se ligam aos grupamentos fosfato do AMPCPP. Os íons Co^{2+} devem ser substituídos *in vivo* pelos íons Mg^{2+} , essenciais para a atividade catalítica da SPS. Na estrutura apo, as regiões N-terminal do sítios de ligação do ATP estão desordenadas e nenhum metal associado é observado⁷⁸. Isto mostra que a ligação do ATP, dos metais e a formação de seus sítios são interdependentes.

A mobilidade do N-terminal, sua importância no mecanismo catalítico e o entendimento de sua desordem estrutural vem sendo investigada desde 1992, quando Kim e colaboradores demonstraram que o aminoácido cisteína na posição 17 da estrutura primária da SPS de *E. coli*, localizada na volta N-terminal rica em glicina, é essencial para sua atividade catalítica⁸⁰. As estruturas cristalográficas da selenofosfato sintetase da bactéria *Aquifex aeolicus* mostram que o resíduo de cisteína/selenocisteína catalítico no N-terminal móvel pode apontar tanto para o solvente, em condições para aceitar seleneto (na forma “aberta” da proteína), formando perseleneto (Sec-Se^-), quanto para o ATP ligado ao sítio catalítico (na forma “fechada”), podendo entregar o seleneto, quando em forma de perseleneto (Sec-Se^-), para formação de monoselenofosfato.

Em todas as estruturas reportadas nenhuma evidencia o sítio de ligação do produto selenofosfato. Especula-se na estrutura da AaSPS em complexo com AMPCPP um possível sítio de ligação na qual está ligado o íon sulfato, porém esse sítio fica muito distante do γ -fosfato do AMPCPP o que impediria o ataque nucleofílico.

A estrutura da SPS1 humana em complexo com ADP e seu análogo AMPCP (código PDB 3FD5 e 3FD6), mostra que o íon K^+ deve catalisar a hidrólise do ADP no sítio ativo da enzima, posicionando o grupamento β -fosfato para ataque nucleofílico por uma molécula de água⁷⁹.

Small-Howard e colaboradores⁶⁷, em 2006, mostraram que a proteína SPS1 interage *in vitro* e *in vivo* com a selenofosfato sintetase (SepSecS) humana, que catalisa a formação do selenocisteil-tRNA^{Sec}, a partir do monoselenofosfato produzido na reação catalisada pela SPS2. Tanto a SepSecS quanto a selenocisteína liase possuem um enovelamento do tipo I de proteínas que se ligam ao piridoxal-5'-fosfato. Desta forma, se a SPS2 também é capaz de se ligar a SepSecS, então o monoselenofosfato sintetizado pela SPS2 pode ser entregue à

Capítulo 1 - Introdução

SepSecS, como denominado por Itoh e colaboradores⁷⁸. Estudos realizados por alunos de doutorado do nosso grupo apontam uma possível função do N-terminal na formação destes complexos proteicos. Especula-se que poderia ocorrer a formação destes complexos para evitar a difusão de compostos reativos de selênio, resultando em uma eficiência da biossíntese de selenocisteína, porém não se sabe se esses complexos são transientes ou permanente.

Capítulo 2- Objetivos



Capítulo 2- Objetivos

Este trabalho tem por objetivo caracterizar estruturalmente e funcionalmente as proteínas selenofosfato sintetases de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. Esta caracterização fornecerá informações relevantes para o entendimento do mecanismo de catálise da enzima e portanto, para via de síntese de Sec em eucariotos.

Capítulo 2- Objetivos

2 OBJETIVOS

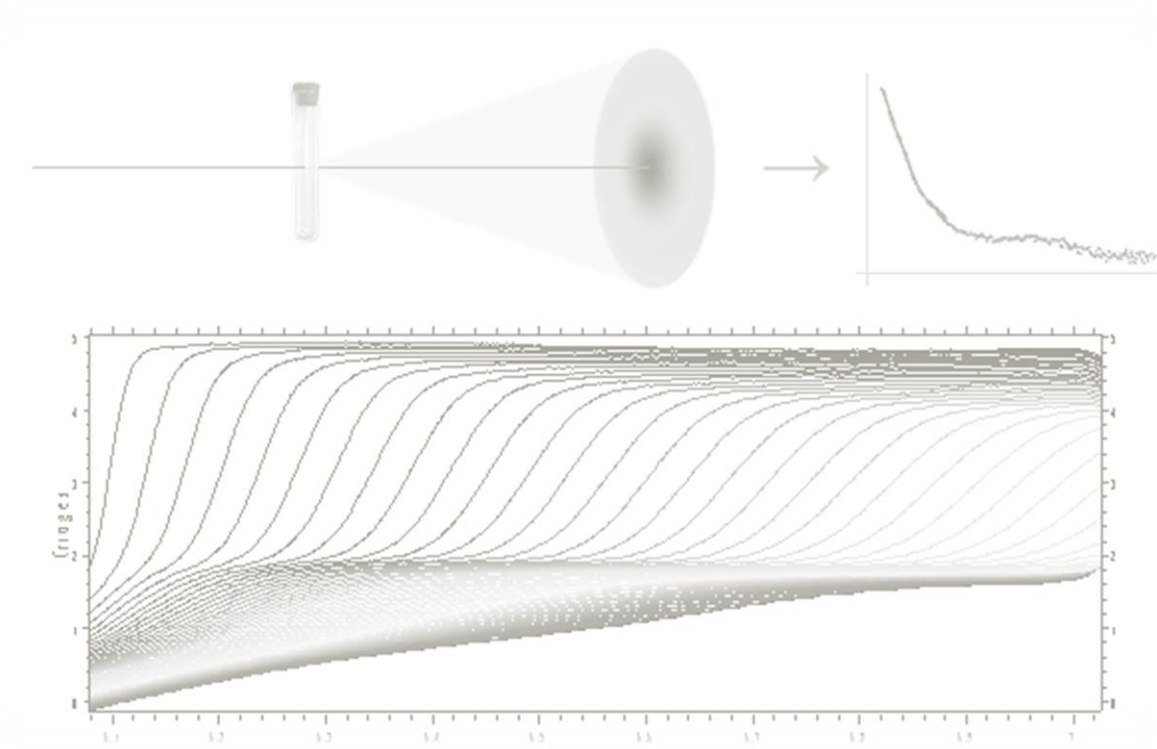
O objetivo geral do trabalho é realizar estudos biofísicos, estruturais e funcionais da proteína selenofosfato sintetase (SPS2) de *Trypanosoma brucei* (TbSPS2) e *Leishmania major* (LmSPS2) com intuito de entender melhor o mecanismo de ação desta enzima na via de biossíntese de selenoproteínas.

2.1 Objetivos Específicos

- 1 - Produzir as proteínas SPS2 de *T. brucei* e *L. major* de forma homogênea;
- 2 - Realizar estudos bioquímicos e biofísicos;
- 3 – Desenvolver o protocolo de cristalização das proteínas SPS2 de *T. brucei* e *L. major*;
- 4 – Resolver a estrutura cristalográfica das proteínas, comparar com as estruturas de proteínas homólogas;
- 5 - Realizar estudos funcionais das proteínas selvagens, truncadas e mutadas pontualmente;

Capítulo 2- Objetivos

Capítulo 3- Estudos Bioquímicos e Biofísicos



Capítulo 3- Estudos Bioquímicos e Biofísicos

Este capítulo reporta a clonagem, expressão e o novo protocolo de purificação estabelecido para as selenofosfato sintetases. Além disso, são elucidados aqui estudos bioquímicos e biofísicos utilizando diversas técnicas para avaliação do enovelamento e do estado oligomérico da selenofosfato sintetase.

3.1 METODOLOGIA

3.1.1 Estudos iniciais das Selenofosfato sintetases

A construção dos clones com os genes que codificam para as selenofosfato sintetases de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, isto é, a amplificação da fase aberta de leitura (ORF), clonagem foram realizadas como descrito por Sculaccio e colaboradores⁷³. O protocolo de expressão e purificação das selenofosfato sintetases foram estabelecidos para a realização de ensaios funcionais como reportado por Sculaccio e colaboradores⁷³. Entretanto, a proteína estava em diferentes formas oligoméricas e não foi possível a realização do estudo estrutural. Assim, para a caracterização estrutural e biofísica foi necessária adaptação do protocolo de purificação inicial.

As etapas descritas em 3.1.2 e 3.1.3 foram realizadas por Sculaccio e colaboradores⁷³.

3.1.2 Clonagem do gene *sps2* de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*

Os genes da *sps2* de *T. brucei* (número de acesso: XP_823164.1) e *sps2* de *L. major* (número de acesso: AAG35734.3) foram obtidos pela técnica de PCR (Reação em cadeia da DNA Polimerase) a partir do DNA genômico de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. Os genes foram clonados ao vetor pET28a(+) (Novagen) que possui marca de resistência ao antibiótico canamicina⁷³.

3.1.3 Transformação da construção em células competentes de *Escherichia coli*

A construção recombinante pET28a-SPS2 de *T. brucei* e *L. major* foram submetidos à transformação de células competentes de *E. coli* (BL21(DE3)) preparadas pelo método do cloreto de cálcio. Aliquotas de 100 μ L de células foram retiradas do freezer -80 °C e descongeladas no gelo. Após o descongelamento, foi adicionado 10 μ L da construção e homogeneizado cuidadosamente. As construções pET28a-TbSPS2 e pET28a-LmSPS2 foi adicionada nas células competentes de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente, a mistura foi colocada em banho térmico a 42 °C por 2 minutos e em seguida no gelo onde permaneceu por 5 minutos. Após os 5 minutos, foi adicionado a mistura, 1000 μ L de meio Luria-Bertani (LB), ficando sob agitação (250 rpm) por 1 hora a 37 °C. Terminado esse tempo, as células foram sedimentadas por centrifugação e ressuspensas em 100 μ L de meio LB e plaqueadas em meio sólido LB-ágar e o antibiótico canamicina.

3.1.4 Expressão da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*

Para a expressão da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*, fez-se um pré-inóculo de 5 mL contendo cepas *E. coli* BL21(DE3) transformadas com a construção pET28a-TbSPS2 e pET28a-LmSPS2 cultivadas em meio de cultura líquido LB contendo antibiótico canamicina (50 μ g/mL) por aproximadamente 14 horas sob agitação a 250 rpm a 37 °C.

Uma alíquota de 500 μ L de cada um dos pré-inóculos foi transferida para um erlenmeyer com 500 mL de meio LB (razão 1:100) contendo (50 μ g/mL) de canamicina, que ficou sob agitação de 250 rpm a 37 °C até atingir a D.O._{600nm} (densidade óptica a 600 nm) de aproximadamente 0,6. Depois de atingida esta D.O, induziu-se a expressão da proteína adicionando 1 mM do agente indutor IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). A cultura foi colocada sob agitação de 150 rpm a 20 °C por 12 horas. Decorridas as 12 horas de expressão, as células foram centrifugadas por 15 minutos a 8.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensado em 50 mL por litro de cultura em tampão A (25

mM Tris pH 8, 300 mM de NaCl e 1 mM β -mercaptoetanol) contendo 1 μ M Pepstatina, 1 μ M Leupeptina, 1 mM PMSF e 5% de glicerol. As células foram então submetidas à lise celular por ultrassonicação com 6 pulsos de 30 segundos cada e intervalos entre eles de 60 segundos no equipamento 550 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, USA). As células, após a lise, foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos para a separação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e submetido à purificação.

3.1.5 Purificação da SPS2 de *T. brucei* e *L. major* por Cromatografia de Afinidade

Como as fases abertas de leitura (ORFs) que expressam as proteínas SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* foram clonados no vetor pET-28a(+) (Novagen, USA), a proteína recombinante expressa possui uma cauda de 6XHis no N-terminal que tem capacidade de ligação a metal divalente como Ni^{2+} e Co^{2+} . Portanto, a purificação das proteínas foi realizada em coluna de cromatografia de afinidade, utilizando a resina Ni Sepharose HisTrap HP (GE Healthcare, USA). Na cromatografia de afinidade as proteínas são separadas por especificidades de ligação. A resina Ni Sepharose HisTrap HP (GE Healthcare, USA) possui íons Ni^{2+} imobilizados que se ligam reversivelmente à cauda de 6XHis.

Neste tipo de purificação, utiliza-se o composto imidazol para realizar a eluição da proteína, pois o anel imidazólico é parte integrante da estrutura da histidina, assim, esse composto compete com a histidina pela ligação aos íons níquel que estão imobilizados na matriz da coluna.

A coluna de afinidade, Ni Sepharose HisTrap HP (5 mL de resina) foi equilibrada com 5 volumes de coluna do tampão A contendo 5 mM de Imidazol e, posteriormente, o sobrenadante obtido da centrifugação do produto de lise celular (correspondente a 1 L de cultura de células) foi aplicado à coluna. Em seguida, aplicou-se um gradiente linear de 10 a 500 mM de Imidazol (Sigma, USA) em tampão A para eluição da proteína recombinante da coluna de afinidade. Foram retiradas alíquotas das frações eluídas da coluna para análise em gel de SDS-PAGE (15%).

3.1.6 Clivagem da cauda de Histidinas das SPS2 com a protease Trombina

As alíquotas correspondentes à eluição da proteína foram concentradas e submetidas a um teste de clivagem da cauda N-terminal de seis histidinas das proteínas recombinantes de *T. brucei* e *L. major* com a protease Trombina (Amersham Biosciences, USA). Foi adicionada a cada amostra a proporção de 1 unidade de protease Trombina para cada 100 µg de proteína recombinante. A reação foi mantida por 14 horas a 20 °C e interrompida com a adição de 1 mM de PMSF, que atua como inibidor de serino-proteases. Foram retiradas alíquotas a cada 2 horas até 14 horas e misturadas em tampão de amostra para análise em gel SDS-PAGE (15%).

3.1.7 Purificação da SPS2 de *T. brucei* e *L. major* por Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Na cromatografia de exclusão por tamanho, as moléculas são separadas de acordo com diferenças em seus tamanhos e formas moleculares. A matriz da coluna é um polímero com poros de tamanho selecionados. Proteínas com maior massa molecular migram mais rápido, pois tendem a passar direto pela matriz sem penetrar nos poros da resina, enquanto que moléculas com menor massa molecular tendem a penetrar nos poros da resina e migram vagarosamente através da coluna. A purificação por cromatografia de exclusão molecular foi realizada utilizando a coluna Superdex™ 200 10/300 (GE, USA) de 24 mL de volume de coluna acoplada ao sistema automatizado de cromatografia AKTA Purifier 10 (Amersham Pharmacia Biotech).

Decorrido o tempo de 14 horas de reação de clivagem da cauda 6XHis, a proteína já concentrada foi aplicada na coluna previamente equilibrada com tampão A com 5 mM de Imidazol. Utilizou-se um fluxo de 0,5 mL/min e o andamento da purificação foi monitorado absorção de luz em comprimento de onda de 280 nm.

3.1.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Uma solução com moléculas orientadas aleatoriamente será opticamente ativa se as moléculas são assimétricas. Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos são compostos de muitas unidades opticamente ativas, ou seja, compostos quirais com centros assimétricos⁸¹.

A atividade óptica de macromoléculas está intimamente relacionada à sua conformação. Deste modo, Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica poderosa para estudar as estruturas de proteínas em solução, bem como, mudanças conformacionais que podem ocorrer quando proteínas se ligam a ligantes, desnaturação e reenaturação de proteínas e estimativa de conteúdo de estruturas secundárias. Como as proteínas estão repletas de centros quirais (como o carbono α e o carbono β da treonina e isoleucina) distribuídos ao longo das suas estruturas secundárias (α -hélices, folhas- β , voltas- β), estas estruturas podem ser identificadas e quantificadas por meio da técnica de CD. Espectros de CD de proteínas exibem bandas na região de 250-260 nm e 180-250 nm que correspondem a ligações dissulfeto e ligações peptídicas, respectivamente.. A **Figura 15** mostra os diferentes espectros de CD descritos.

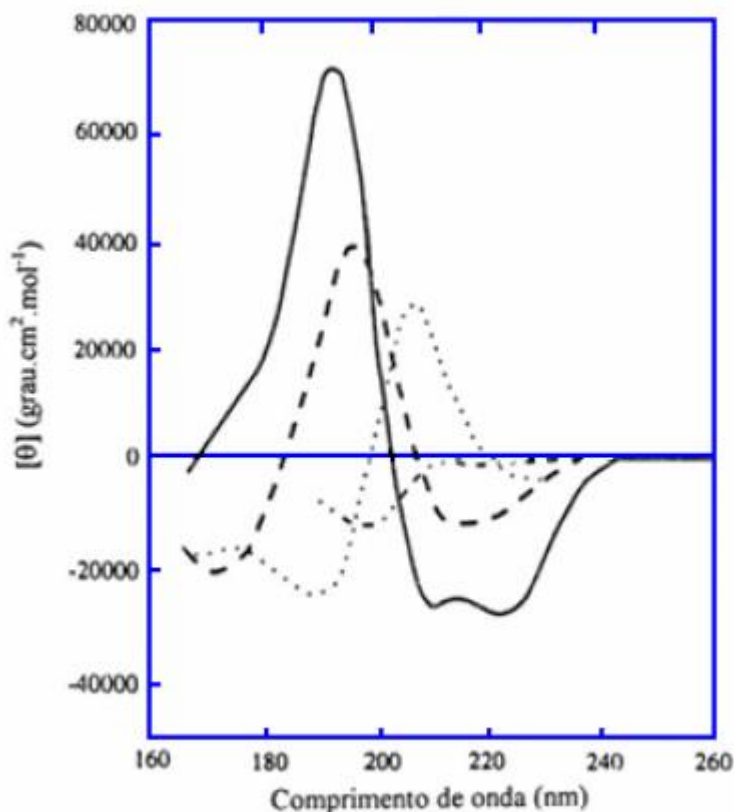


Figura 15 – Espectro de CD no UV distante de vários tipos de estrutura secundária: (—) α -hélice; (--) folha antiparalela; (.....) volta- β (-·-·-·) estrutura irregular.

Fonte: Extraído e Modificado de CANTOR

Os espectros de Dicroísmo Circular das proteínas SPS2 de *T. brucei*, *L. major* foram obtidos utilizando um espectropolarímetro JASCO J-810 (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan) equipado com um sistema de controle de temperatura do tipo *PELTIER PTC 423S/15* do laboratório de Espectrometria e Calorimetria (LEC) do LNBio, Síncronon, Campinas, Brasil. Os espectros foram coletados na região do UV distante, no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm, com resolução de 0,5 nm, utilizando uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm. A sensibilidade foi mantida em 100 miligras e a velocidade de 50 nm/min. As amostras foram medidas na concentração de 0,2 mg/mL em tampão B (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0). Os espectros finais foram obtidos a partir da média de oito acumulações já com as correções das linhas de base utilizando o programa *Spectra Manager* (JASCO, USA). A deconvolução do espectro de Dicroísmo circular foi realizada através do programa *CDNN*⁸². Este programa analisa o espectro de CD e compara com banco de dados de espectros referências de proteínas com estruturas conhecidas. Assim,

através do espectro de CD de uma proteína é possível determinar as porcentagens de suas estruturas secundárias.

3.1.9 Estimativa da Massa Molecular e do raio hidrodinâmico por cromatografia de exclusão por tamanho

Para determinação da massa molecular e raio hidrodinâmico (raio de Stokes) das *TbSPS2* e *LmSPS2* em seu estado oligomérico em solução utilizou-se a coluna SuperdexTM 200 10/300 (GE, USA). O método de estimativa de massa e raio hidrodinâmico foi equilibrado com proteínas-padrão com diferentes massas moleculares (*Gel filtration HMW/LMW calibration* (GE, USA)) seguindo as orientações do fabricante e as mesmas condições da cromatografia de exclusão de tamanho realizada para a *TbSPS2* e *LmSPS2*. A partir do volume de eluição (V_e) de cada amostra padrão e conhecendo-se a massa molecular e raio hidrodinâmico destas moléculas, foi possível obter uma curva de calibração através do programa Origin 6.1 (*"Data Analysis and Technical Graphics"*) e assim determinar a massa molecular e o raio hidrodinâmico das proteínas em estudo.

3.1.10 Eletroforese em gel não desnaturante (Gel Nativo)

Os estados de oligomerização das proteínas SPS2 de *L. major*, SPS2 de *T. brucei* foram analisados através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Do inglês, *"Native PAGE"* (*Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) é uma das técnicas utilizadas para o estudo da composição e estrutura de proteínas nativas, uma vez que conformação e a atividade biológica das mesmas permanecem intactas durante essa técnica. Essa metodologia separa as proteínas com base em tamanhos, cargas resultantes e conformações das mesmas. Para proteínas nativas globulares de tamanho entre 50 a 750 kDa,

o gradiente de 8-25 % de poliacrilamida é adequado para resultar uma relação linear entre a distância de migração da proteína e o logaritmo de seu peso molecular.

Com alíquotas de 4 μL das amostras das proteínas SPS2 de *T. brucei*, SPS2 de *L. major* na concentração de 5 mg/mL foi realizado um experimento de gel nativo através do sistema *PhastGel* (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), com concentração de poliacrilamida variando em um gradiente de 8 a 25%.

Após passagem na coluna de exclusão por tamanho as proteínas *TbSPS2* e *LmSPS2* foram submetidas a eletroforese nativa. A proteína foi aplicada juntamente com um padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas (Kit de calibração de eletroforese GE-alto peso molecular contendo tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (140 kDa) e BSA (66 kDa)). Os géis foram corados com 0,1% da solução *PhastGel Blue 350* (GE, USA) e descorados em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. A partir da medida de distância relativa de migração no gel das proteínas padrões e o logaritmo das massas moleculares das mesmas foi construído um gráfico no qual se obteve a equação da reta pela regressão linear dos dados experimentais. Essa equação foi utilizada para determinação da massa molecular das amostras em estudo.

3.1.11 Espalhamento Dinâmico de Luz

O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) é uma técnica capaz de analisar biomoléculas de interesse em solução. Esta técnica mede a intensidade de luz espalhadas por macromoléculas em solução, que, correlacionada no tempo, fornece uma medida do coeficiente de difusão translacional das espécies oligoméricas da macromolécula em estudo. Na prática, as macromoléculas encontram-se hidratadas e o raio hidrodinâmico calculado a partir do seu coeficiente de difusão oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula com sua camada de solvatação. Desta forma, essa técnica é considerada uma ferramenta importante na caracterização de proteínas, pois pode fornecer informações sobre a homogeneidade estrutural da amostra, em relação à presença ou ausência de agregados e

também uma estimativa do peso molecular das moléculas espalhadoras de luz e o seu estado oligomérico⁸³.

Para a realização do experimento, utilizou-se o equipamento *Protein Solutions DynaPro™*. Aliquotas de 30 µl da SPS2 de *T. brucei* e da SPS2 de *L. major* a 5 mg/mL em tampão B foram centrifugadas por 10 min a 10.000 g e, então, aplicadas em cubeta de quartzo para realização de várias medidas de raio hidrodinâmico (R_H). O programa *DYNAMICSTM* seleciona as medidas mais representativas e as mostra na forma de um histograma. A partir do valor médio de raio hidrodinâmico calculado pelo programa é possível estimar o peso molecular da proteína e seu grau de homogeneidade.

Para o cálculo da massa molecular a partir do coeficiente de sedimentação (s) (ultracentrifugação analítica – seção 3.1.13) foi necessária a obtenção do coeficiente de difusão (D) medido pelo experimento de DLS. Assim, foram realizadas mais medidas em diferentes concentrações das proteínas (0,6 mg/mL; 0,8 mg/mL; 1 mg/mL; 1,2 mg/mL; 1,5 mg/mL). Foram feitas 100 aquisições para cada medida.

3.1.12 Espalhamento de Raios X a baixo ângulo

O espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) é uma ferramenta fundamental no estudo estrutural de macromoléculas biológicas em solução. Esta técnica é uma das principais e das mais utilizadas na determinação do estado oligomérico de proteínas em solução.

Em particular, a técnica indica mudanças estruturais em resposta a variações nas condições externas, interações proteína-proteína, proteína-ligante e cinética estrutural de associação/ dissociação e enovelamento/desenovelamento⁸⁴.

Em um experimento de SAXS, as ondas eletromagnéticas com comprimento de onda de Raios-X são incididas sobre amostras diluídas de proteínas e provocam oscilações dos elétrons dos átomos que as compõem. Se a energia dos fótons incidentes é bem diferente da energia de ligação dos elétrons nos átomos, estes elétrons podem ser tratados como se fossem

livres. Partículas carregadas livres e oscilantes produzem ondas eletromagnéticas em todas as direções, coerentes com a onda incidente e de mesmo comprimento de onda.

A intensidade $I(q)$ produzida por um sistema monodisperso (isto é, existe somente um tipo de população em solução) diluído de macromoléculas em solução é proporcional ao quadrado da amplitude de espalhamento da macromolécula em todas as direções. No espalhamento de partículas em solução, considera-se a amostra como isotrópica, ou seja, partículas estão em movimento browniano e podem assumir todas as orientações possíveis em relação ao feixe incidente. Assim, temos acesso experimental somente à média espacial para as possíveis orientações da macromolécula⁸⁵.

Os parâmetros moleculares obtidos por SAXS mais usados para caracterização da macromolécula estudada são raio de giro, peso molecular, volume da macromolécula, diâmetro máximo e forma.

O raio de giro (R_g) de uma partícula é um dos mais importantes e mais precisos parâmetros obtidos por SAXS e pode ser determinado por muitos caminhos diferentes. O método mais comum usa a aproximação de Guinier. Assumindo o caso ideal de partículas esféricas não interagentes em solução, Guinier mostrou que para $q \rightarrow 0$, a curva de intensidade pode ser descrita como uma função exponencial⁸⁶:

$$I(q) = I(0) \cdot \exp\left(\frac{-q^2 \cdot R_g^2}{3}\right) \text{ (Equação 1)}$$

onde q é o vetor espalhamento dado por $q = (4\pi \cdot \sin\theta/\lambda)$, 2θ é o ângulo de espalhamento, λ é o comprimento de onda do raios X e $I(0)$ é a amplitude de espalhamento.

R_g corresponde à distância média quadrática dos elétrons da partícula até o seu centro de gravidade, analogamente o R_g pode ser visto como o raio de inércia na Mecânica Clássica. Para um sistema monodisperso, o gráfico de Guinier, $\ln I(q) \cdot q^2$ demonstra uma linha reta que intercepta $I(0)$ em $q = 0$, cuja inclinação é proporcional ao R_g . Contudo deve-se ter em mente que a aproximação de Guinier é válida somente para ângulos próximos de 0, respeitando a equação $q < \frac{1,3}{R_g}$ ⁸⁷.

É possível também determinar o R_g a partir da função de distribuição de distâncias ($p(r)$) pela transformada de Fourier da curva de espalhamento. Este método tem a vantagem da curva de espalhamento inteira ser usada para a determinação do raio de giro e não somente a porção interna como é o caso com o método de Guinier. Assim, o programa GNOM⁸⁸ calcula o R_g a partir da $p(r)$, este pode ser comparado com o R_g obtido pelo método de Guinier.

A função de distribuição de distâncias, ou função de distribuição de pares, $p(r)$, para partículas homogêneas representa o histograma de distâncias entre todos pares de pontos (elementos de volume) da $p(r)$. Esta função contém toda informação estrutural que é possível ser obtida a partir de uma curva de SAXS. Com esta função (definida no espaço real) ou com a curva de espalhamento (espaço recíproco), pode-se construir *ab initio* um envelope molecular da proteína.

Os dados de SAXS foram coletados na linha de SAXS do laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) localizado em Campinas (SP – Brasil)⁸⁹. O comprimento de onda do feixe de raios-X incidente utilizado foi $\lambda = 1,488\text{\AA}$ e a distância amostra detector foi de 1534,457 mm. Para aquisição dos dados utilizou-se um detector bidimensional tipo CCD. Assim, após as medidas serem adquiridas foi necessária a integração do padrão bidimensional de espalhamento para se chegar à uma curva unidimensional de espalhamento. Essa integração foi realizada pelo programa Fit2D⁹⁰.

As amostras de SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* foram submetidas a espalhamento de raios X a baixo ângulo nas concentrações de 2, 4 e 6 mg/mL. A análise de Guinier foi realizada pelo programa AutoRg⁹¹. O raio de giro (R_g) foi avaliado pelos métodos de Guinier e GNOM^{85,88}. O cálculo do peso molecular foi realizado pelo programa Heranza⁹² a partir do arquivo de saída do GNOM. Reconstruções da forma foram feitas pelo programa DAMMIN⁹³ utilizando os parâmetros *default*.

Os modelos de átomos dummy (usados para definir geometrias e otimizações de estrutura) resultantes de dez execuções individuais do DAMMIN foram alinhados, realizada a média e ranqueados de acordo com a diferença estrutural normalizada (NSD) usando o pacote de programas do DAMAVER⁹⁴. Modelos com NSD_k superior a $\langle NSD \rangle + 2 \cdot \Delta(NSD)$ foram rejeitados. Comparações e análises foram executadas com o programa SUPCOMB⁹⁴. Visualização gráfica foi realizada pelo PYMOL⁹⁵.

3.1.13 Modelagem Molecular da *Tb*SPS2 e *Lm*SPS2 para tentativa de validação do envelope de SAXS

A modelagem molecular das estruturas quaternárias das selenofosfato sintetases foi realizada em colaboração com o aluno de doutorado Ivan Rosa e Silva. Para validação dos envelopes de SAXS, foram executadas construções do modelo através da modelagem por homologia usando o programa *Modeller 9.10*⁹⁶ e como template o PDB 3FD5 (SPS1 humana). Os modelos gerados de estrutura terciária foram visualizados e analisados utilizando os programas *PYMOL*⁹⁵ e *UCSF Chimera*²⁵. A modelagem do homodímero foi feita a partir do alinhamento 3D de dois monômeros com as cadeias A e B da estrutura de código PDB 3FD5, por meio do programa *UCSF Chimera*²⁵, seguida de minimização de energia pelo servidor *ROSETTA DOCK*⁹⁷. Os modelos dos homodímeros foram encaixados no envelope de SAXS utilizando o programa *SupComp*⁹³. Para comparação com a curva experimental de SAXS, foi gerada a curva de espalhamento para o modelo através do programa *Crysol*⁹⁸.

3.1.14 Ultracentrifugação Analítica (AUC)

Ultracentrifugação analítica (AUC) é uma ferramenta útil para o estudo de proteínas. Monitoramento da sedimentação de macromoléculas submetidas a campo centrífuga permite a caracterização hidrodinâmica e termodinâmica em solução. Existem dois tipos básicos de experimento com ultracentrifuga analítica: velocidade de sedimentação (SV, em inglês) e sedimentação em equilíbrio (SE, em inglês)⁹⁹.

Velocidade de sedimentação (SV) (Figura 16) pode ser usada na identificação do estado oligomérico e estequiometria de interações heterogêneas. Este é o método de escolha para determinações de massa molecular e o estudo de auto-associação e interações heterogêneas, tais como proteína-proteína, proteína-ácido nucléico e proteína-ligação de molécula pequena⁹⁹.

Capítulo 3 - Estudos Bioquímicos e Biofísicos

A aplicação de uma força causa a depleção de macromoléculas no menisco e a formação de um limite de concentração que se move seguindo ao fundo da célula da centrífuga como uma função do tempo. A definição do coeficiente de sedimentação de uma macromolécula, s , e os parâmetros moleculares que determinam o valor de s são dados pela equação de Svedberg:

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} = \frac{MD(1 - \bar{v}\rho)}{RT} \quad (1)$$

onde u é a velocidade radial observada da macromolécula, ω é a velocidade angular do rotor, r é a posição radial, $\omega^2 r$ é o campo centrífuga, M é a massa molar, \bar{v} é o volume parcial específico, ρ é a densidade do solvente, N_A é o número de Avogadro, f é o coeficiente friccional, D é o coeficiente de Difusão, R é a constante universal dos gases e T é a temperatura⁹⁹.

O coeficiente de difusão das selenofosfato sintetase foi obtido por DLS (seção 3.1.11). D é relacionado ao coeficiente friccional pela equação de Einstein, que foi utilizada para obter o termo da direita da equação de Svedberg:

$$D = \frac{RT}{N_A f} \quad (2)$$

O valor de s é reportado em unidades de Svedberg (S), o qual corresponde a 10^{-13} s. f para uma proteína esférica compacta de raio de Stokes conhecido (R_0) pode ser obtido aplicando a equação de Stokes:

$$f_0 = 6\pi\eta R_0 \quad (3)$$

onde f_0 é o coeficiente friccional da partícula esférica, η é a viscosidade da solução, e R_0 é o raio da esfera. Podemos combinar a equação de Svedberg e Stokes, no qual R_0 da esfera é expresso como:

$$R_0 = \left(\frac{3M_w \bar{v}}{4\pi N_A} \right)^{1/3} \quad (4)$$

Para obter:

$$s_{esfera} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A 6\pi\eta \left(\frac{3M\bar{v}}{4\pi N_A} \right)^{1/3}} \quad (5)$$

Substituindo os valores para todas as constantes (η para água à 20 °C) resulta equação 6, o valor de s para uma esfera em termos de M , \bar{v} e ρ somente (onde M é unidade de daltons, s em unidades Svedberg, \bar{v} em milímetros por gramas, e ρ em gramas por milímetros).

$$s_{esfera} = 0,012 \frac{M^{2/3} (1 - \bar{v}\rho)}{\bar{v}^{-1/3}} \quad (6)$$

Usando a equação 6, podemos prever os coeficientes de velocidade de sedimentação para proteínas esféricas compactas em água a 20 °C. Este valor de s_{esfera} é o valor máximo que pode ser obtido para uma proteína de uma dada massa, porque uma esfera compacta tem a área superficial mínima em contato com o solvente e conseqüentemente a proteína teria um coeficiente friccional mínimo, f_0 . Uma correção do valor de s experimental para o estado padrão da água à 20 °C é necessária para propostas comparativas de dados obtidos a partir de diferentes laboratórios sob diferentes condições experimentais. A correção padrão é dada por:

$$s_{20,w} = s_{T,B} \left(\frac{\eta_{T,B}}{\eta_{20,w}} \right) \frac{(1 - \bar{v}\rho)_{20,w}}{(1 - \bar{v}\rho)_{T,B}} \quad (7)$$

A mesma correção é feita para o coeficiente de difusão:

$$D_{20,w} = D_{obs} \left(\frac{293,2}{T} \right) \frac{(\eta_{T,w}) \eta_s}{(\eta_{20,w}) \eta_w} \quad (8)$$

T e B designam os valores nesta temperatura e sob condições de tampão do experimento, e o índice $20,w$ indica condições padrões. A razão do valor máximo de s para o valor de s observado, $\frac{s_{esfera}}{s_{20,w}}$ é igual a razão do coeficiente friccional experimental para o coeficiente friccional mínimo $\left(\frac{f}{f_0}\right)$, o qual mede a forma assimétrica máxima a partir de uma esfera.

Assim, o peso molecular (MW) de uma partícula pode ser calculado pelo coeficiente de sedimentação e de difusão pela equação seguinte:

$$M_w = \frac{s_{20,w}^0 RT}{D_{20,w}^0 (1 - v\rho)} \quad (9)$$

O software SEDNTERP¹⁰⁰ foi usado para estimar as propriedades hidrodinâmicas das selenofosfato sintetases a partir da sequência primária: volume parcial específico (\bar{v}), coeficiente de sedimentação máxima (s_{esfera}) e o coeficiente de difusão máxima (D_{esfera}) para uma proteína globular de mesma massa molecular (MW). Estas predições foram realizadas aplicando as equações de Stokes e Svedberg como descrita acima. O SEDNTERP também estimou a viscosidade (η) e a densidade (ρ) do tampão à 20 °C. Para todas as amostras o tampão utilizado foi: 25 mM de Tris-HCl (pH 8), 50 mM de NaCl, 1 mM β -Mercaptoetanol com $\rho = 1,00101$ g/mL e $\eta = 0,01014$ poise.

Para a execução do experimento, utilizamos uma ultracentrifuga analítica (Beckman Optima XL – A analytical ultracentrifuge, Beckman Coulter, Palo Alto, USA) do laboratório de Espectrometria e Calorimetria (LEC) do LNBio, Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS), Campinas, Brasil. As condições experimentais e os parâmetros (SEDNTERP) para cada selenofosfato sintetase estão mostrados na **Tabela 3** e **Tabela 4**.

Tabela 3 - Condições experimentais e parâmetros obtidos pelo SEDNTERP para a SPS2 de *T. brucei*

Vbar (\bar{v}): 0,7390 mL/g

Concentrações: 0,150 mg/mL; 0,300 mg/mL; 0,450 mg/mL; 0,600 mg/mL; 0,800 mg/mL; 1,00 mg/mL

Velocidade: 30.000 RPM

Temperatura: 20 °C

Comprimento de onda: 232 nm e 241 nm

Número de aquisições: 120

Rack	MM (Da)	$S_{\text{esfera}} (10^{-13} \text{ S})$	$D_{\text{esfera}} (x 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$
Monômero	43265,9	4,32	9,19
Dímero	86531,8	6,85	7,30
Trímero	129797,7	8,98	6,38
Tetrâmero	173063,6	10,88	5,79

Dados para condições de água e 20°C calculados pelo programa SEDNTERP (usando Vbar Method).

Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 4 - Condições experimentais e parâmetros obtidos pelo SEDNTERP para a SPS2 de *L. major*

Vbar (\bar{v}): 0,7369 mL/g

Concentrações: 0,150 mg/mL; 0,300 mg/mL; 0,450 mg/mL; 0,600 mg/mL; 0,800 mg/mL; 1,00 mg/mL

Velocidade: 30.000 RPM

Temperatura: 20 °C

Comprimento de onda: 235 nm e 239 nm

Número de aquisições: 120

Rack	MM (Da)	$S_{\text{esfera}} (10^{-13} \text{ S})$	$D_{\text{esfera}} (x 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s})$
Monômero	42968,48	4,30	9,22
Dímero	85936,95	6,82	7,32
Trímero	128905,40	8,94	6,39
Tetrâmero	171873,90	10,83	5,81

Dados para condições de água e 20°C calculados pelo programa SEDNTERP (usando Vbar Method).

Fonte: Elaborado pela Autora

O software SedFit¹⁰¹ foi aplicado afim de ajustar os dados da absorbância *versus* raio da célula. Este software resolve a equação de Lamm (que descreve a sedimentação e difusão de um soluto sobre ultracentrifugação) a fim de discriminar difusão a partir dos limites de sedimentação espalhados^{101,102}.

O experimento de sedimentação em equilíbrio (SE) (Figura 16) é um método clássico baseado em princípios termodinâmicos e é sensível a massa, mas, não a forma da partícula. O experimento é realizado a velocidades baixas suficientes para que as forças de sedimentação e difusão opostas alcancem o equilíbrio. No estado estacionário, é possível obter a informação: da massa molecular (M) independentemente da forma da partícula, da constante de associação (K_A) e na estequiometria (n) de um sistema associativo. Foi realizado o experimento de SE para as *TbSPS2* e *LmSPS2* com intuito de observar o equilíbrio entre diferentes espécies encontradas nestas proteínas. Os experimentos de sedimentação em equilíbrio para as *TbSPS2* e *LmSPS2* foram realizados a 20 °C, em velocidades de 8.000 rpm, 10.000 rpm e 12.000 rpm com o rotor AN – 60Ti. A *TbSPS2* e *LmSPS2* estavam em tampão 25 mM Tris (pH 8), 50 mM NaCl e 1 mM de β -mercaptoetanol e foram testadas nas seguintes concentrações: 0,5 mg/mL; 0,75mg/mL e 1 mg/mL. A análise dos dados foi feita utilizando o programa SEDPHAT (*Self – Association*). Os experimentos de AUC foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Júlio Cesar Borges (IQSC).

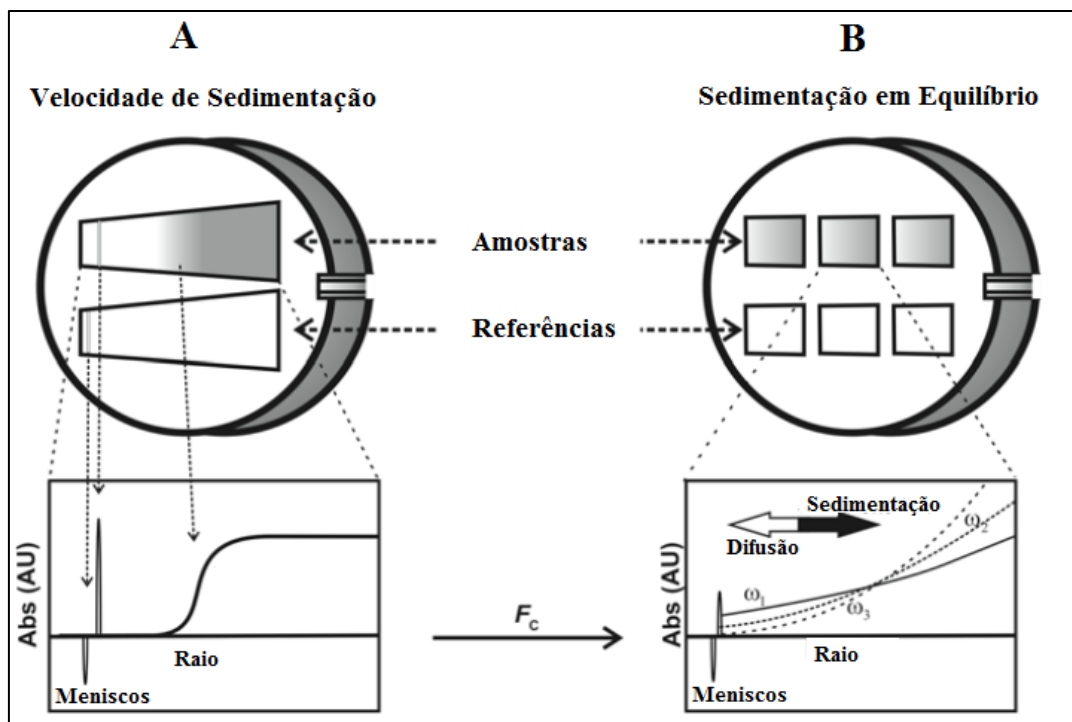


Figura 16 - Experimentos de Ultracentrifugação analítica. (A) SV. (B) SE. Amostras e referências são carregadas nos setores no centro da cela ou nas partes centrais. O setor da referência é preenchido ligeiramente mais do que o setor da amostra para gerar sinais claros de absorbância a partir do menisco (fundo).

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Preparo das amostras da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*

Cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com as construções recombinante *TbSPS2*-pET28a e *LmSPS2*-pET28a, como descrito na seção 3.1.3, foram inoculadas em 1 L de meio de cultura LB à temperatura de 37°C e, após atingir a DO_{600nm} de 0,6, foram induzidas com 1 mM de IPTG por 12 horas à temperatura de 20 °C. As amostras contendo as proteínas *TbSPS2* e *LmSPS2* foram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade utilizando a coluna de níquel. As proteínas *TbSPS2* e *LmSPS2* foram eluídas da coluna utilizando um tampão A com um gradiente de Imidazol. As alíquotas eluídas da coluna podem ser visualizadas em gel SDS-PAGE 15% (Figura 17).

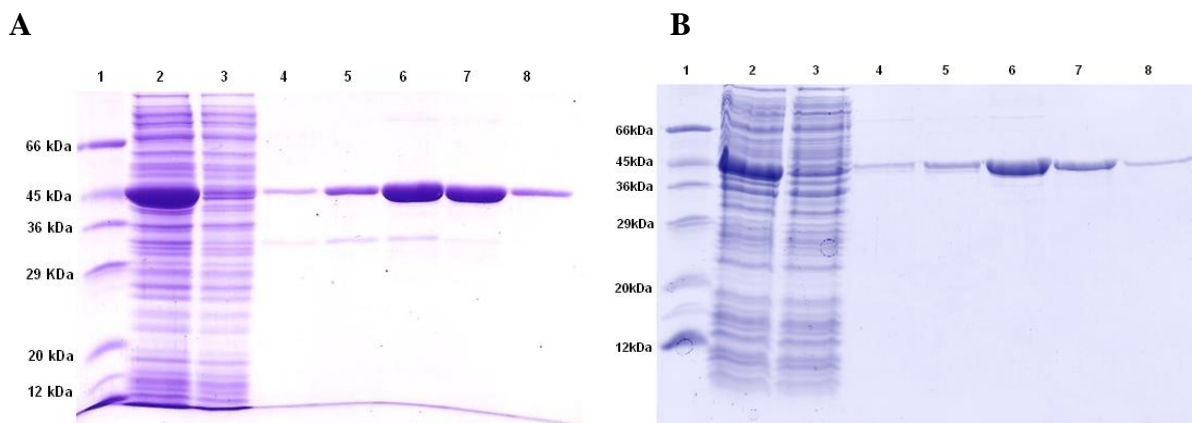


Figura 17- Análise em gel SDS-PAGE 15% do resultado da purificação da proteína SPS2 através da cromatografia de afinidade: **(A)** SPS2 de *T. brucei* **(B)** SPS2 de *L. major*. 1- padrão de massa molecular com suas respectivas massas moleculares indicadas. 2 - Fração solúvel (entrada na coluna). 3- Eluato. 4, 5, 6, 7 e 8- representam as frações eluídas da coluna com tampão A contendo 1μM Pepstatina, 1μM Leupeptina, 1mM PMSF e um gradiente de concentração de imidazol de 10mM, 20mM, 50mM, 200mM e 500mM, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela Autora

O protocolo inicial de purificação até a cromatografia de afinidade da *TbSPS2* e *LmSPS2* foi estabelecido por Sculaccio e colaboradores⁷³, porém a análise estrutural não era

possível pela presença de diferentes formas oligoméricas em solução. Assim, com a finalidade de obter um maior grau de homogeneidade estrutural da proteína em estudo foi realizada a clivagem da cauda de 6xHis com a protease trombina seguida de mais um passo de purificação utilizando a cromatografia de exclusão de tamanho.

A clivagem da cauda de Histidina com a protease Trombina pode ser visualizado na Figura 18.

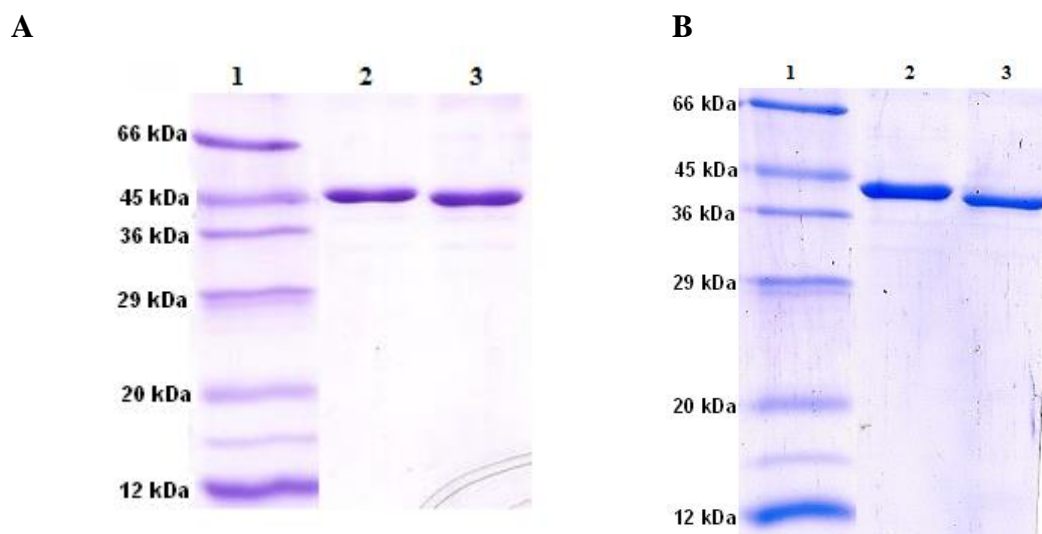


Figura 18 - Clivagem da cauda 6XHIS da proteína SPS2 com Trombina analisada em SDS-PAGE 15%. **(A)** SPS2 de *T. brucei*. **(B)** SPS2 de *L. major*. 1 - padrão de massa molecular. 2 - Amostra controle não submetida à clivagem. 3 – Amostra submetida a reação de clivagem.

Fonte: Elaborado pela Autora

A partir da observação da Figura 18 **A** e **B** é possível notar que as bandas correspondentes a amostras submetidas à reação com Trombina têm um maior deslocamento no gel do que o controle, o que indica clivagem, já que a perda da cauda de histidinas leva a diminuição da massa molecular, resultando em maior distância de migração da proteína no gel.

A próxima etapa foi a purificação das *TbSPS2* e *LmSPS2* por cromatografia de exclusão molecular usando a coluna SuperdexTM 200 10/300 (GE). O pico de eluição das proteínas esta mostrados no cromatograma da Figura 19 e Figura 20.

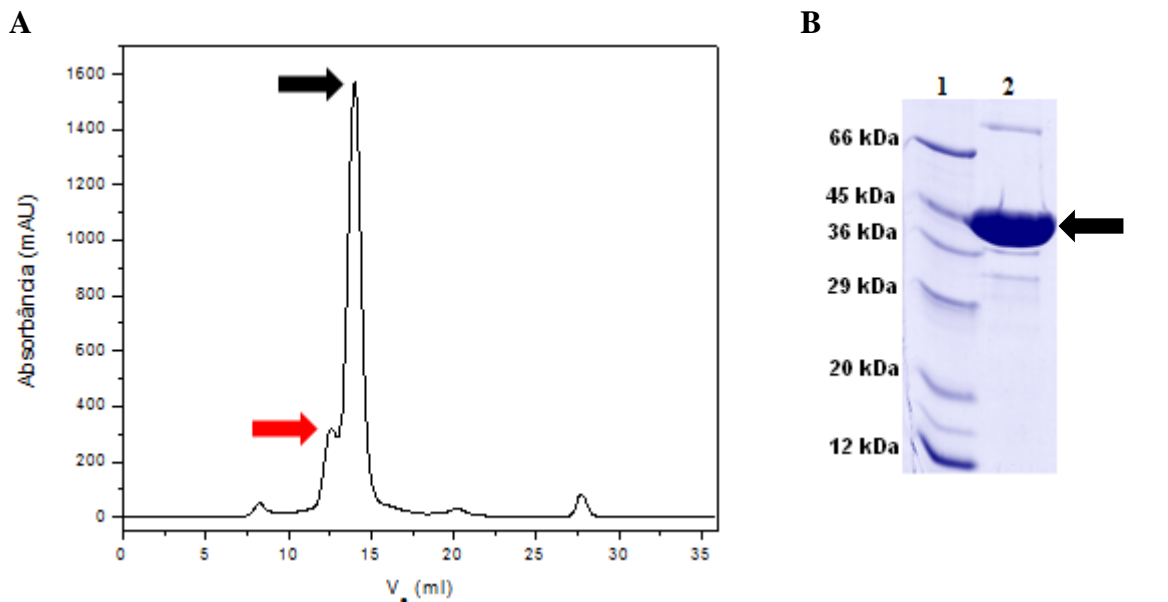


Figura 19 - Purificação da proteína SPS2 de *Trypanosoma brucei* por cromatografia de exclusão de tamanho. (A) Perfil cromatográfico indicando o volume de eluição da proteína (14,50 mL) (seta preta) e a pequena saliência (seta vermelha) que possivelmente corresponde a outra forma oligomérica. (B) Gel de SDS – PAGE 15%: 1- Marcador de massa molecular, 2- Eluição da SPS2 de *T. brucei*.
Fonte: Elaborado pela Autora

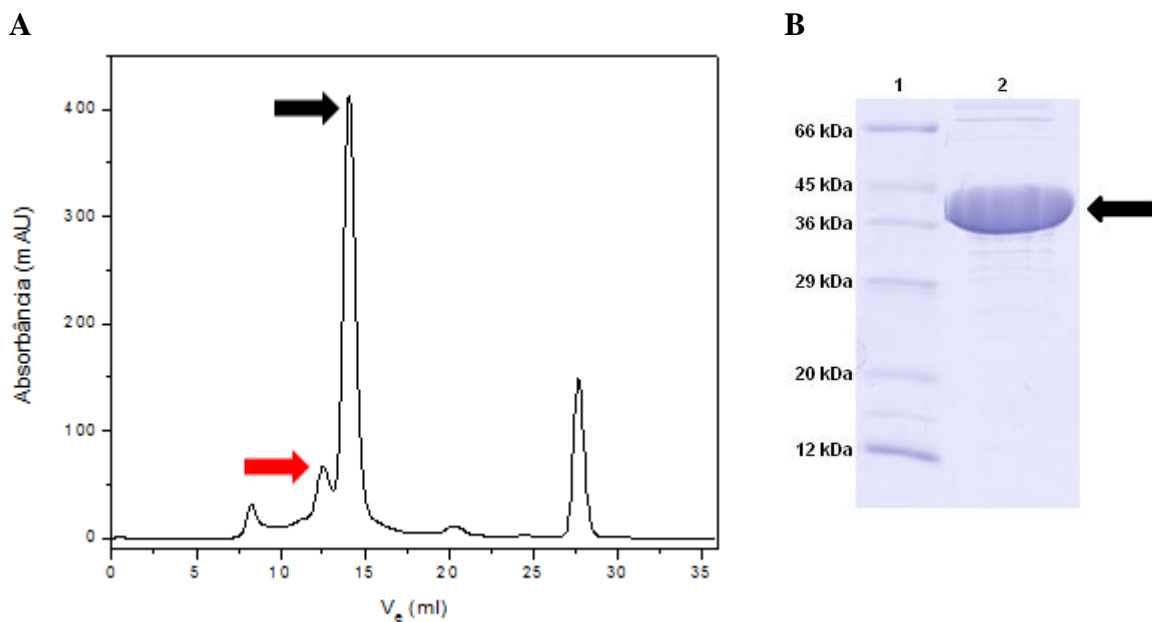


Figura 20 - Purificação da proteína SPS2 de *Leishmania major* por cromatografia de exclusão de tamanho. (A) Perfil cromatográfico indicando o volume de eluição da proteína (14,00 mL) (seta preta) e a pequena saliência (seta vermelha) que possivelmente corresponde a outra forma oligomérica. (B) Gel de SDS-PAGE 15%: 1- Marcador de massa molecular, 2- Eluição da SPS2 de *L. major*.
Fonte: Elaborado pela Autora

A presença de mais um pico no perfil cromatográfico das **Figura 19** e **Figura 20** (seta vermelha) corresponde a forma oligomérica de tetrâmero.

3.2.2 Caracterização Biofísica

3.2.2.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular para a SPS2 de *T. brucei*, SPS2 de *L. major* estão mostrados na Figura 21.

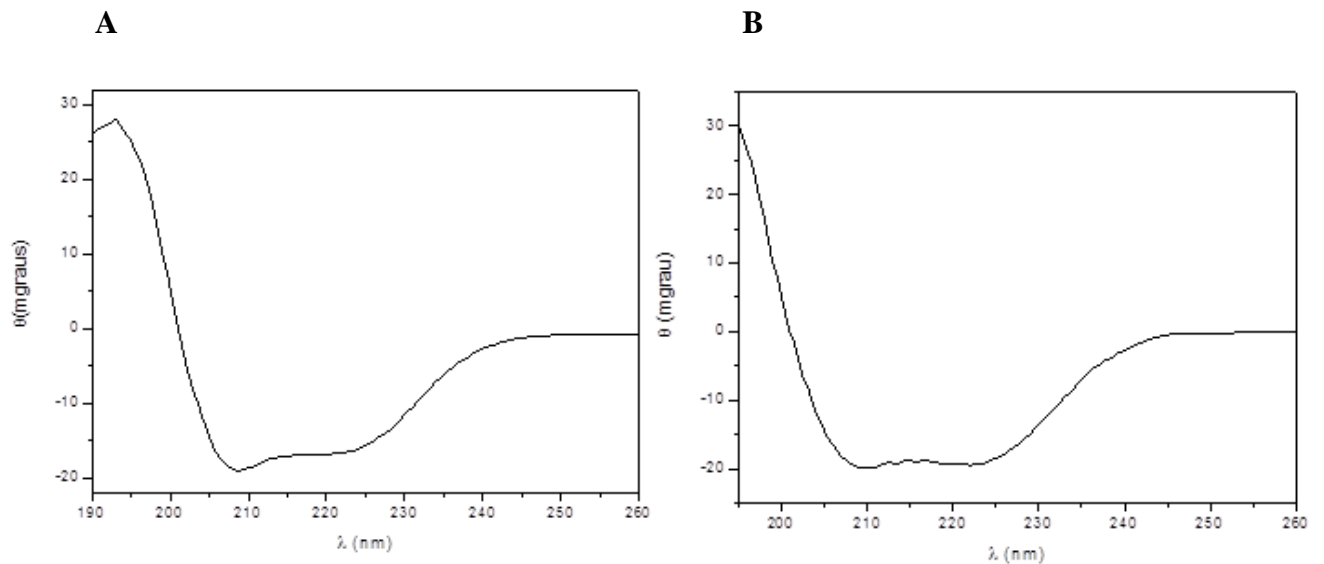


Figura 21 - Espectro de Dicroísmo circular das selenofosfato sintetases. **(A)** SPS2 de *Trypanosoma brucei*. **(B)** SPS2 de *Leishmania major*. As proteínas estavam a 0,2 mg/mL em 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,0 a 25 °C.

Fonte: Elaborado pela Autora

As porcentagens de estrutura secundárias obtidas por deconvolução do espectro de CD pelo programa *CDNN* (base de dados com 13 proteínas) estão mostradas na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Deconvolução dos espectros de CD das selenofosfato sintetase de *T. brucei* e *L. major*, mostrando a porcentagem de estrutura secundária.

	Hélices- α (%)	Fitas- β (%)	Voltas (%)	Região Desordenada (%)
<i>TbSPS2</i>	31,4	19,6	17,5	31,9
<i>LmSPS2</i>	32,8	18,2	17,0	31,9

Fonte: Elaborado pela Autora

Através dos espectros da Figura 21 e do resultado de deconvolução da **Tabela 5** é possível observar que as duas selenofosfato sintetases são caracterizadas pelo enovelamento α/β , a qual as estruturas correspondentes à α -hélice são caracterizadas pela presença da banda negativa em 208 nm e 222 nm e as fitas β pelas bandas positivas em 190 - 200 nm. Na comparação das duas proteínas pode se notar que são muito semelhantes estruturalmente com porcentagens muito próximas de estruturas secundárias, porém, o alcance do espectro no caso da SPS2 de *L. major* foi bem menor que da SPS2 de *T. brucei*, possivelmente por ultrapassar o limite de sinal do detector. Assim, no caso da SPS2 de *L. major* não houve deconvolução da banda por volta de 195 nm correspondente as estruturas de fitas - β , o que possivelmente resulta em menor porcentagem dessa estrutura na deconvolução.

3.2.2.2 Estimativa da Massa Molecular e do raio hidrodinâmico por cromatografia por exclusão por tamanho

Além do intuito de aumentar a homogeneidade da proteína e a pureza da amostra, o experimento de cromatografia de exclusão de tamanho foi realizado com o objetivo de verificar os estados oligoméricos das proteínas e a estimativa de massa molecular destes estados.

O método de estimativa de massa e raio hidrodinâmico foi calibrado a partir dos padrões de massa molecular mostrados na **Tabela 6** (Sigma Aldrich (USA)). Utilizando o volume de eluição (V_e) de cada proteína padrão (**Tabela 6**), os valores de K_{av} foram determinados e plotados em um gráfico contra o logaritmo das massas moleculares ou raio hidrodinâmico de cada uma dessas proteínas. Assim, a partir do V_e das *TbSPS2* e *LmSPS2* e da equação da reta obtido do ajuste linear, foi determinada a massa molecular e o raio

hidrodinâmico para cada proteína. As curvas de calibração da massa molecular (MM) x Kav e raio hidrodinâmico x Kav estão mostradas na **Figura 22**. E os resultados para cada uma das proteínas em estudo estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 6 – Padrões de diferentes massas moleculares e raios hidrodinâmicos utilizados para a calibração da Superdex™ 200 10/300 com seus respectivos volumes de eluição (Ve) e o cálculo do Kav.

Padrões	MM (KDa)	Rh (nm)	Ve (mL)	Kav*
Citocromo c equino	12,14	1,70	18,44	0,66
Anidrase carbônica	29,00	2,36	16,82	0,56
BSA	66,00	3,39	14,48	0,42
Álcool Desidrogenase (levedura)	150	4,60	13,19	0,34
β-amilase (batata doce)	200	5,04	12,47	0,29
Dextran	2000	-	7,74	-

* $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, onde V_e é o volume de eluição, V_o é o volume morto (volume de eluição do dextran azul) e o V_t , é o volume total da coluna (24 mL).

Fonte: Elaborado pela Autora

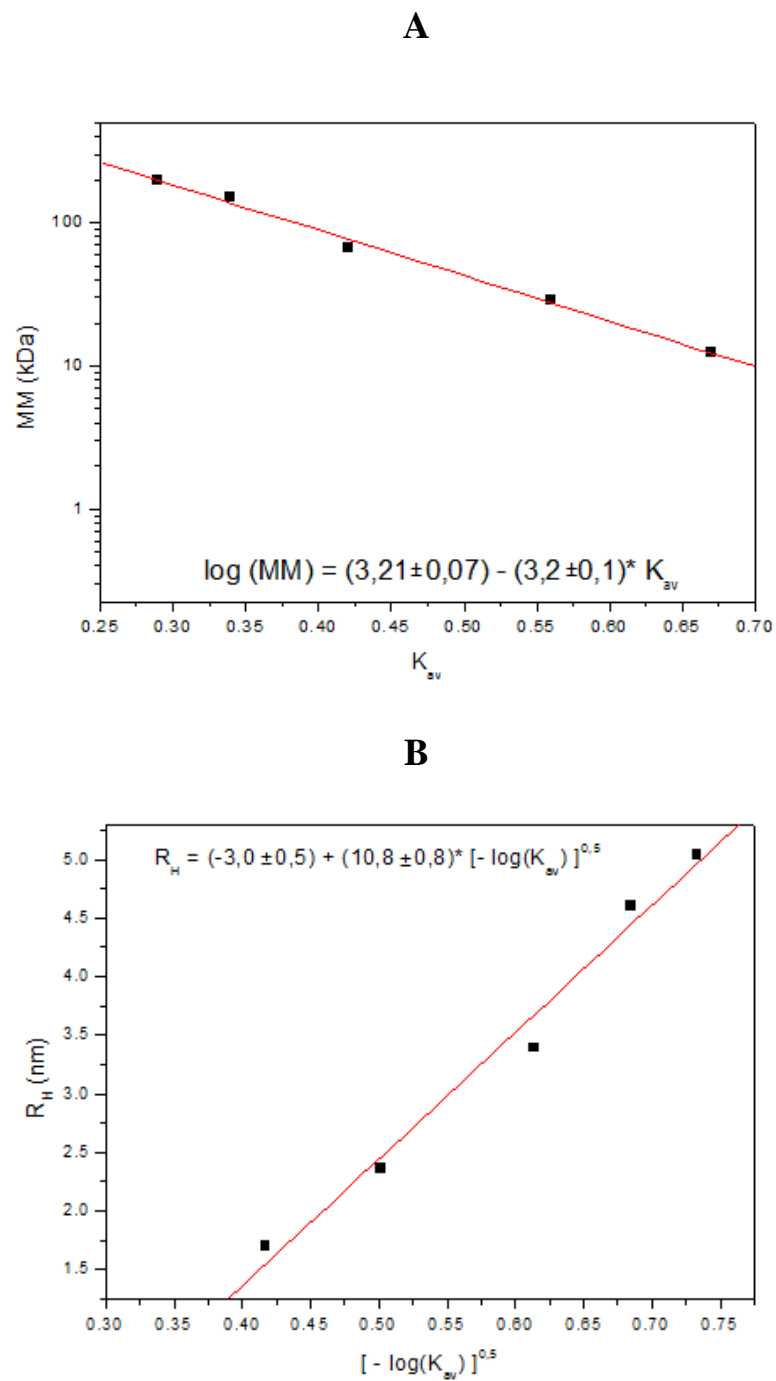


Figura 22 - Curvas de calibração da superdexTM 200 10/300. (A) Massa molecular. (B) Raio hidrodinâmico.

Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 7– Resultados de massa molecular e raio hidrodinâmico dos picos correspondentes as diferentes estados oligoméricos da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*.

	MM (KDa)	MM _{teórica} (kDa)	Erro relativo (%)	Raio hidrodinâmico (nm)
<i>Tb</i>SPS2				
Pico 1	187,6	173,06 (tetrâmero)	8,40	4,89
Pico 2	75,8	86,53 (dímero)	12,40	3,66
<i>Lm</i>SPS2				
Pico 1	187,6	171,88 (tetrâmero)	9,15	4,89
Pico 2	95,1	85,94 (dímero)	10,66	3,95

Fonte: Elaborado pela Autora

3.2.2.3 Eletroforese de Gel Não Desnaturante

Para os experimentos de caracterização estrutural das selenofosfato sintetases de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* são necessárias amostras de proteínas puras e monodispersas (sem nenhum estado de agregação). Assim, para verificar o estado oligomérico das proteínas realizamos o experimento de eletroforese de gel nativo. Foi aplicado no gel 4 μ L das amostras de cada proteína à 5 mg/mL. O resultado do experimento de gel nativo pode ser visualizado na Figura 23 **A**.

Utilizando a distância de migração de cada proteína padrão no gel e o Log da massa molecular construiu-se gráfico no qual a partir da equação da reta (Figura 23 **B**) foi obtido o valor da massa molecular para as duas enzimas.

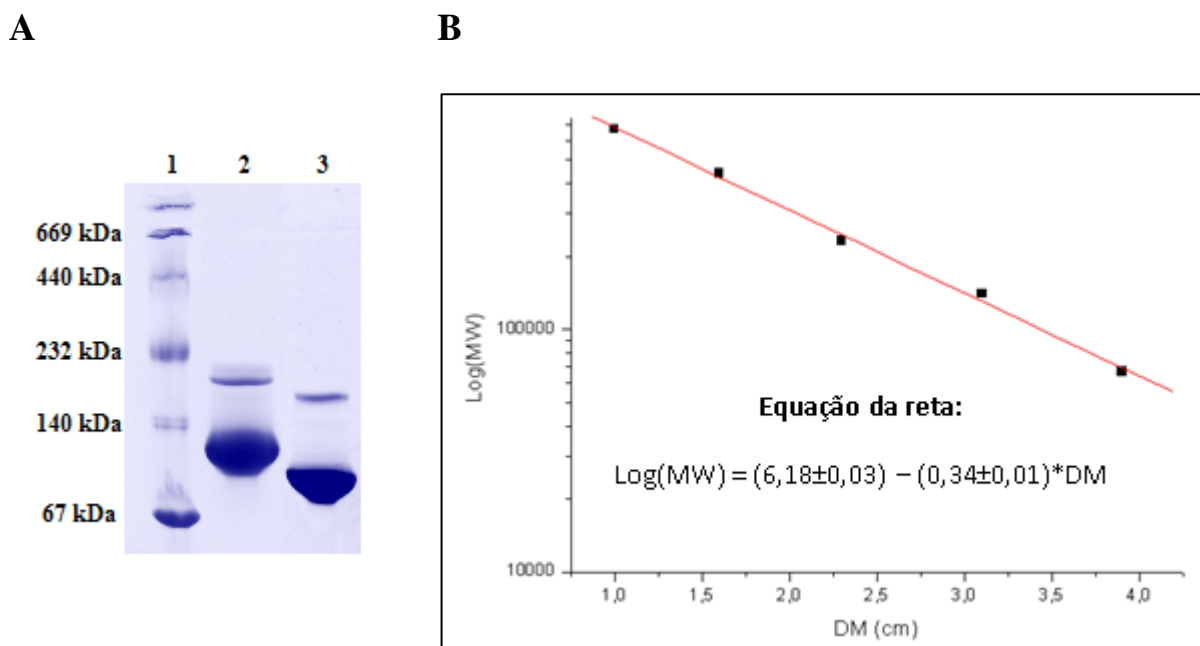


Figura 23 - Eletroforese em gel nativo. (A) Coluna 1- Padrão de massa molecular. Colunas 2 e 3- Selenofosfato sintetase de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, respectivamente. (B) Gráfico da DM (distância de migração) em função do log da massa molecular.

Fonte: Elaborado pela Autora

Pela análise do gel nativo podemos notar que as proteínas estão majoritariamente em um estado oligomérico. O cálculo do peso molecular pela migração da amostra no gel apontou os valores de 112 ± 21 kDa e 108 ± 5 kDa para SPS2 de *T. brucei* e SPS2 *L. major*, respectivamente. A banda acima da majoritária corresponde a outra forma oligomérica da proteína, possivelmente a tetramérica revela pesos moleculares de 219 ± 28 kDa para *TbSPS2e* 189 ± 35 kDa para *LmSPS2*, respectivamente. Visto que o experimento de gel nativo não considera somente a massa molecular, mas também a carga e a forma da macromolécula, os resultados do cálculo da massa molecular não são tão precisos. Assim, as análises deste experimento são mais qualitativas que quantitativas.

Pela análise da Figura 23 é notável as diferenças na migração das duas enzimas no gel nativo, possivelmente por elas possuírem carga (diferentes pIs, $pI=6,34$ para *TbSPS2* e $pI=6,05$ para *LmSPS2*) como já reportado por Sculaccio e colaboradores⁷³ e formas distinta. É provável que a SPS2 de *T. brucei* por ter uma massa molecular um pouco maior, um ponto isoelétrico maior ou uma forma estrutural diferente, tem uma distância menor de migração no gel em relação à SPS2 de *L. major*. Porém, a massa molecular e o ponto isoelétrico das duas

SPS2 são muito semelhantes. Já o fator forma pode ser melhor analisado nos experimentos de SAXS e AUC.

3.2.2.4 Espalhamento Dinâmico de luz (DLS)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foi utilizada para analisar como as amostras de proteínas se apresentam, verificando a homogeneidade bem como as possíveis formas oligoméricas em solução. Na

Figura 24, são mostrados os histogramas que representam medidas do raio hidrodinâmico (R_H) das proteínas SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* na concentração de 5 mg/mL no tampão contendo 25 mM de Tris (pH 8,0), 50 mM de NaCl e 1 mM de β -mercaptoetanol. O resultado indica um raio hidrodinâmico igual a 3,7 nm para SPS2 de *T. brucei*, enquanto que para SPS2 de *L. major* encontrou-se um raio hidrodinâmico igual a 3,9 nm. Estes resultados mostram que ambas proteínas se apresentam monodispersas, isto é, com somente uma população correspondente a forma dimérica em solução. A forma dimérica das SPS2 visualizadas aqui corrobora com os resultados da cromatografia de exclusão molecular e gel nativo.

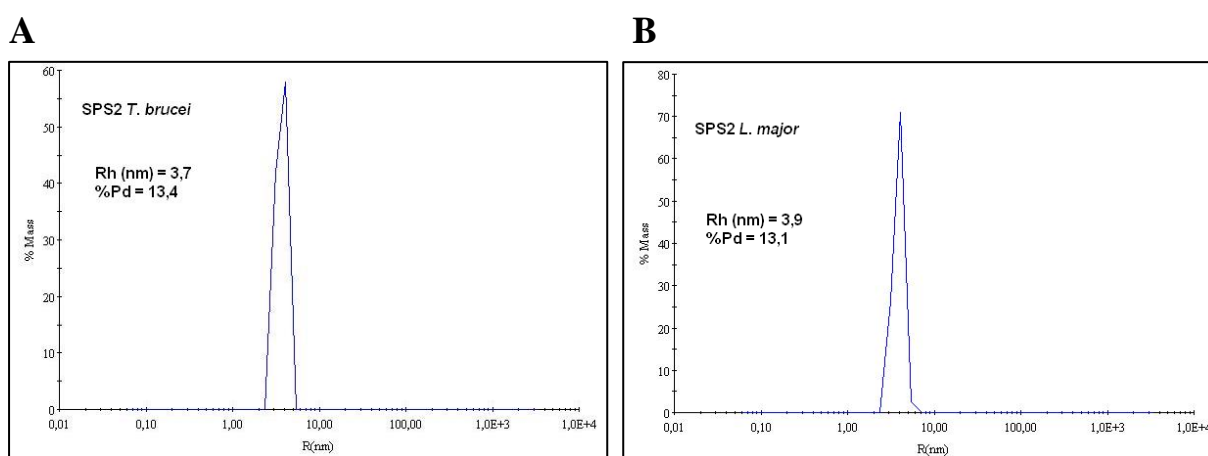


Figura 24 - Histograma representando medidas do raio hidrodinâmico (R_H) das proteínas SPS2 de *T. brucei*. e SPS2 de *L. major*. **(A)** Histograma referente a SPS2 de *T. brucei* com $R_H = 3,7$ nm. **(B)** Histograma referente a SPS2 de *L. major* com $R_H = 3,9$ nm.

Fonte: Elaborado pela Autora

Para analisar a dependência da concentração com a oligomerização, foram realizadas medidas de coeficiente de difusão (D) das SPS2 em diferentes concentrações de proteína. Foi calculado $D_{20,w}$ para o modelo 1 (a partir dos coeficientes de difusão obtidos experimentalmente) e para o modelo 2 (pelos valores de D obtidos pelo programa Sedfit¹⁰¹ de ultracentrifugação analítica) (equação 8: $D_{20,w} = D_{obs} \left(\frac{293,2}{T} \right) \frac{(\eta_{T,w}) \eta_s}{(\eta_{20,w}) \eta_w}$). A **Tabela 8** aponta os valores obtidos para o coeficiente de difusão translacional experimental ($D_{20,w}$) corrigido para o estado padrão da água e a Figura 25 apresenta $D_{20,w}$ em função da concentração da proteína.

Tabela 8 - Coeficiente de difusão (D) para cada selenofosfato sintetase em cinco diferentes concentrações de proteína

[] (mg/ml)	SPS2 <i>T. brucei</i> D (10^{-7} cm ² /s)	SPS2 <i>T. brucei</i> D _{20,w} (10^{-7} cm ² /s)	SPS2 <i>L. major</i> D (10^{-7} cm ² /s)	SPS2 <i>L. major</i> D _{20,w} (10^{-7} cm ² /s)
0,6	4,81	4,87	5,19	5,26
0,8	4,80	4,86	5,27	5,33
1,0	4,97	5,03	5,53	5,60
1,2	5,08	5,14	5,18	5,24
1,5	5,09	5,15	5,20	5,26

Fonte: Elaborado pela Autora

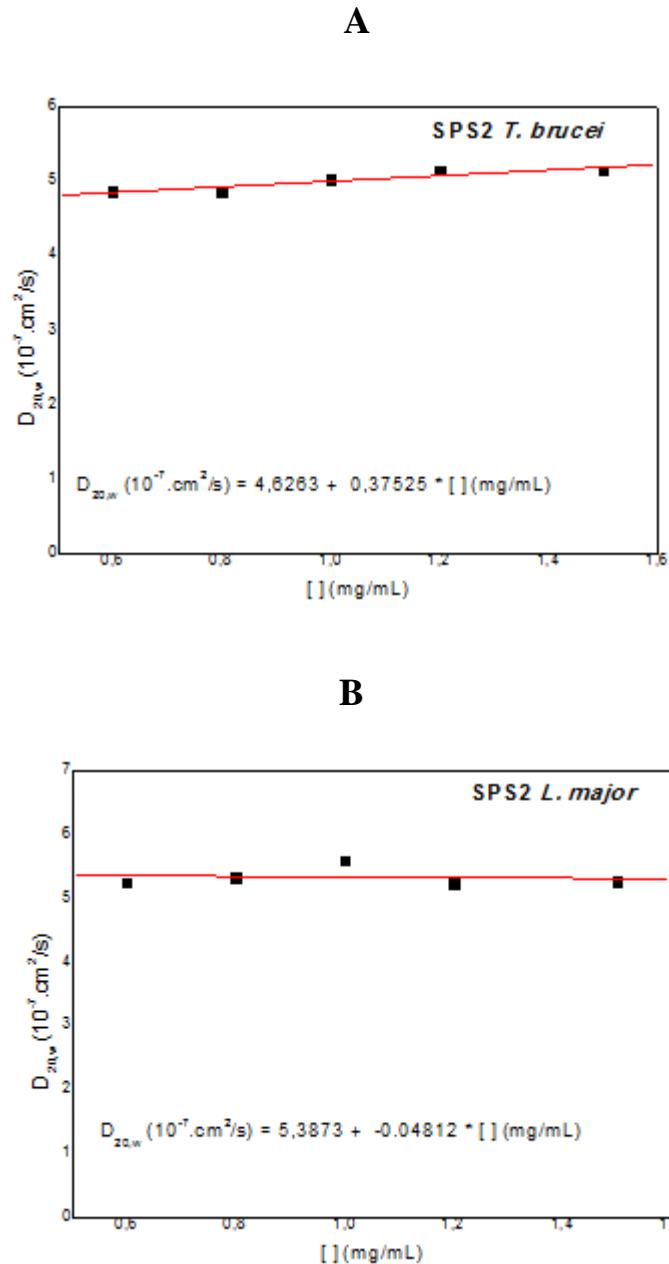


Figura 25 - Gráficos de $D_{20,w}$ versus concentração da proteína para as duas selenofosfato sintetases. **(A)** SPS2 de *T. brucei* e **(B)** SPS2 de *L. major*. $D_{20,w}$ (calculada por DLS versus concentração da proteína ajustado com uma regressão linear para calcular o $D_{20,w}^0$).

Fonte: Elaborado pela Autora

Os gráficos da Figura 25 mostram a partir do coeficiente linear de cada equação da reta que o coeficiente de difusão translacional da *TbSPS2* e da *LmSPS2* é igual a $D_{20,w}^0 = (4,63 \pm 0,09) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $D_{20,w}^0 = (5,39 \pm 0,26) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectivamente. Estes valores quando comparados com o coeficiente de difusão de uma esfera ($D_{\text{esfera}}/D_{20,w}^0$) resultam em uma razão friccional igual a 1,58 e menor coeficiente de difusão para a *TbSPS2*, apontando

esta proteína como uma partícula levemente alongada e com mais resistência para se difundir. Já no caso da *LmSPS2* (1,36) tem se uma proteína mais globular, isto é, com maior coeficiente de difusão com maior facilidade de se mover no solvente.

3.2.2.5 Espalhamento de Raios X a baixo ângulo (SAXS)

Com o objetivo de investigar melhor o estado oligomérico da *TbSPS2* e *LmSPS2*, analisar o envelope molecular de cada enzima e suas diferenças foi realizado o experimento de SAXS. As análises foram feitas com a junção dos dados a baixa concentração 2 mg/mL (início da curva) e a alta concentração 6 mg/mL (final da curva) para *TbSPS2* e na concentração de 6 mg/mL para *LmSPS2*.

As Figura 26, Figura 27 e

Figura 28 ilustram a curva de espalhamento, o gráfico de Guinier e o gráfico da função de distribuição de distâncias da proteína SPS2 de *T. brucei* e *L. major*. O envelope molecular gerado pelo cálculo *ab initio* pode ser visualizado na Figura 29.

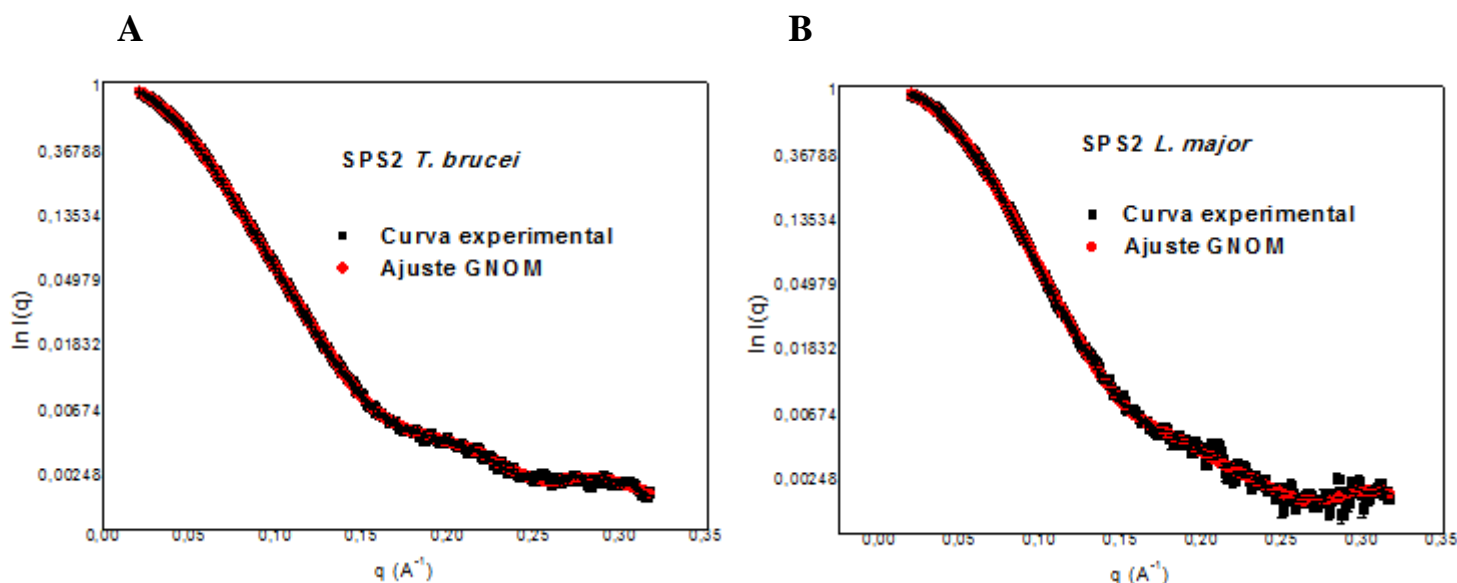


Figura 26 - Curva de espalhamento ($\ln I(q) \times q$) para a proteína: (A) SPS2 de *Trypanosoma brucei*. (B) SPS2 de *Leishmania major*.

Fonte: Elaborado pela Autora

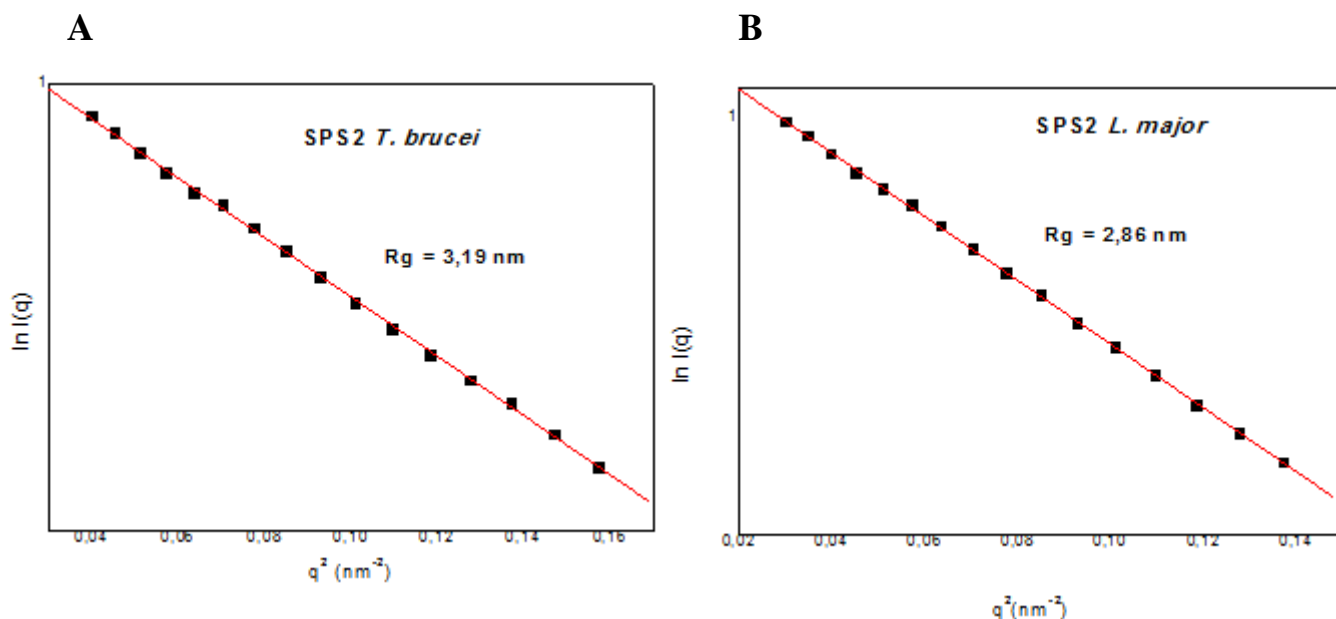


Figura 27 - Gráfico de Guinier ($\ln I \times q^2$), mostrando a região de Guinier ($q \rightarrow 0$) utilizada no ajuste para o cálculo do R_g e $I(0)$ das proteínas: (A) SPS2 de *T. brucei*. (B) SPS2 de *L. major*.

Fonte: Elaborado pela Autora

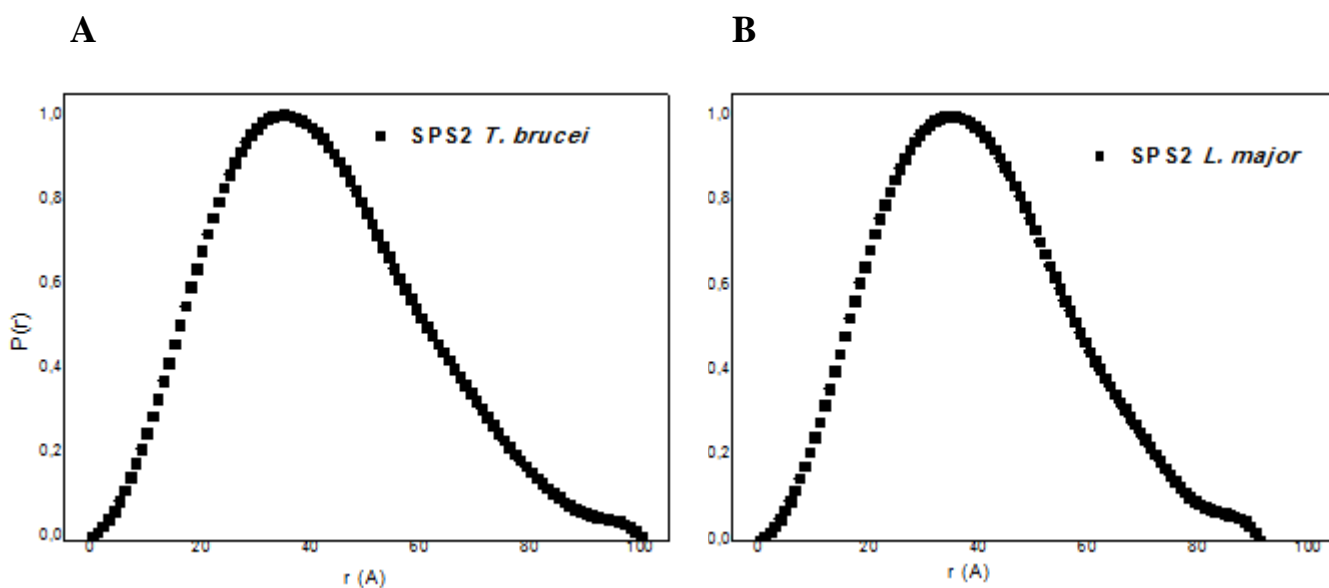


Figura 28 - Gráfico da função de Distribuição de Distâncias para: (A) SPS2 de *T. brucei*. (B) SPS2 de *L. major*. A $p(r)$ foi calculada utilizando o programa GNOM a partir dos dados experimentais.

Fonte: Elaborado pela Autora

As medidas de SAXS da SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* demonstraram que as proteínas na forma nativa encontram-se diméricas. O R_g calculado pelo método de Guinier (Figura 27) está de acordo com obtido pela $p(r)$ (GNOM) e é linear na região de $q \cdot R_g < 1,3$ (as

amostras encontram – se sem estado de agregação). Além disso, a função de distribuição de distâncias sugere que a *TbSPS2* é um pouco mais alongada e a *LmSPS2* é globular de acordo com os resultados obtidos por cromatografia de exclusão molecular, DLS e gel nativo (Figura 29).

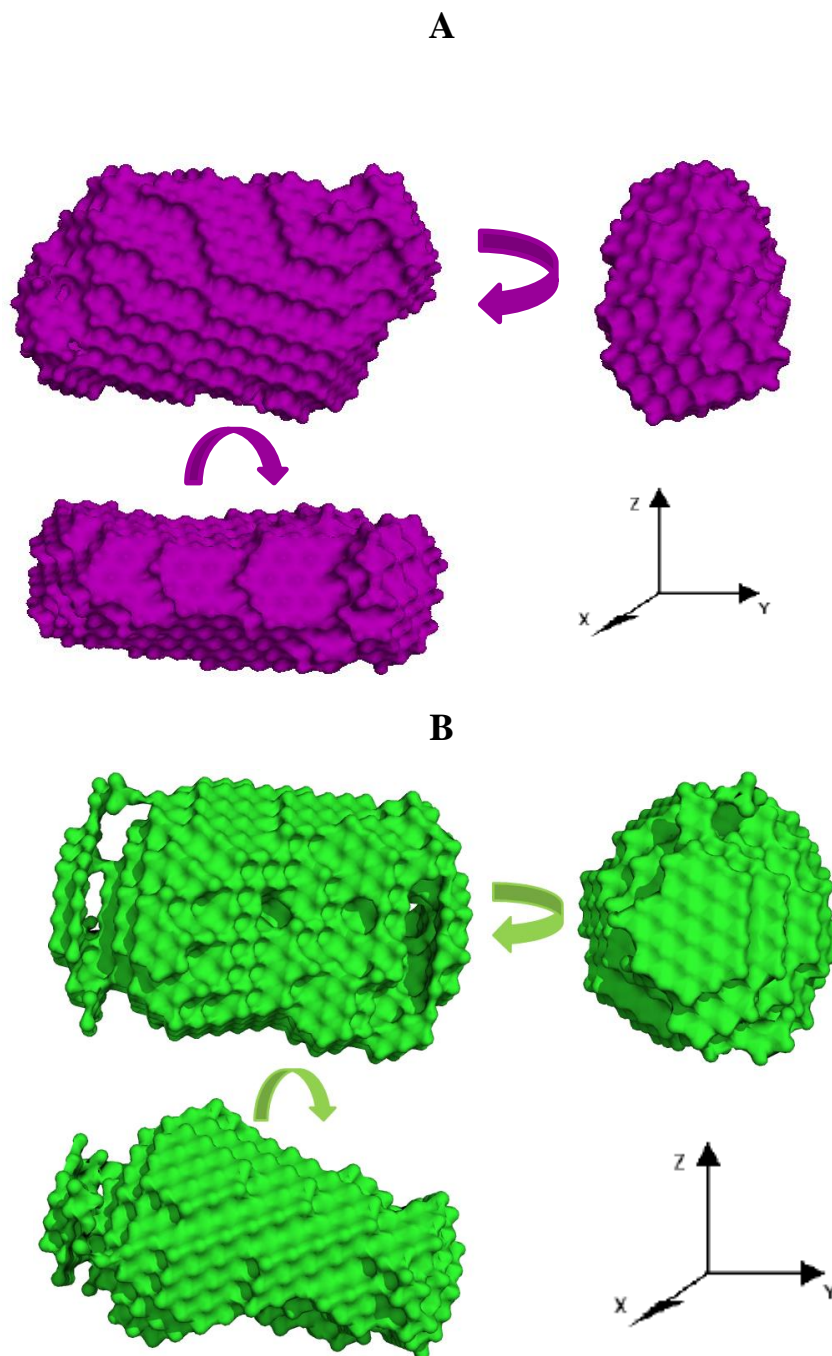


Figura 29 - Médias dos envelopes moleculares das proteínas derivado do cálculo *ab initio*. (A) SPS2 de *T. brucei*. (B) SPS2 de *L. major*.

Fonte: Elaborado pela Autora

A Figura 30 mostra o encaixe da estrutura modelada por homologia no envelope de SAXS e o ajuste da curva experimental com a curva teórica do modelo.

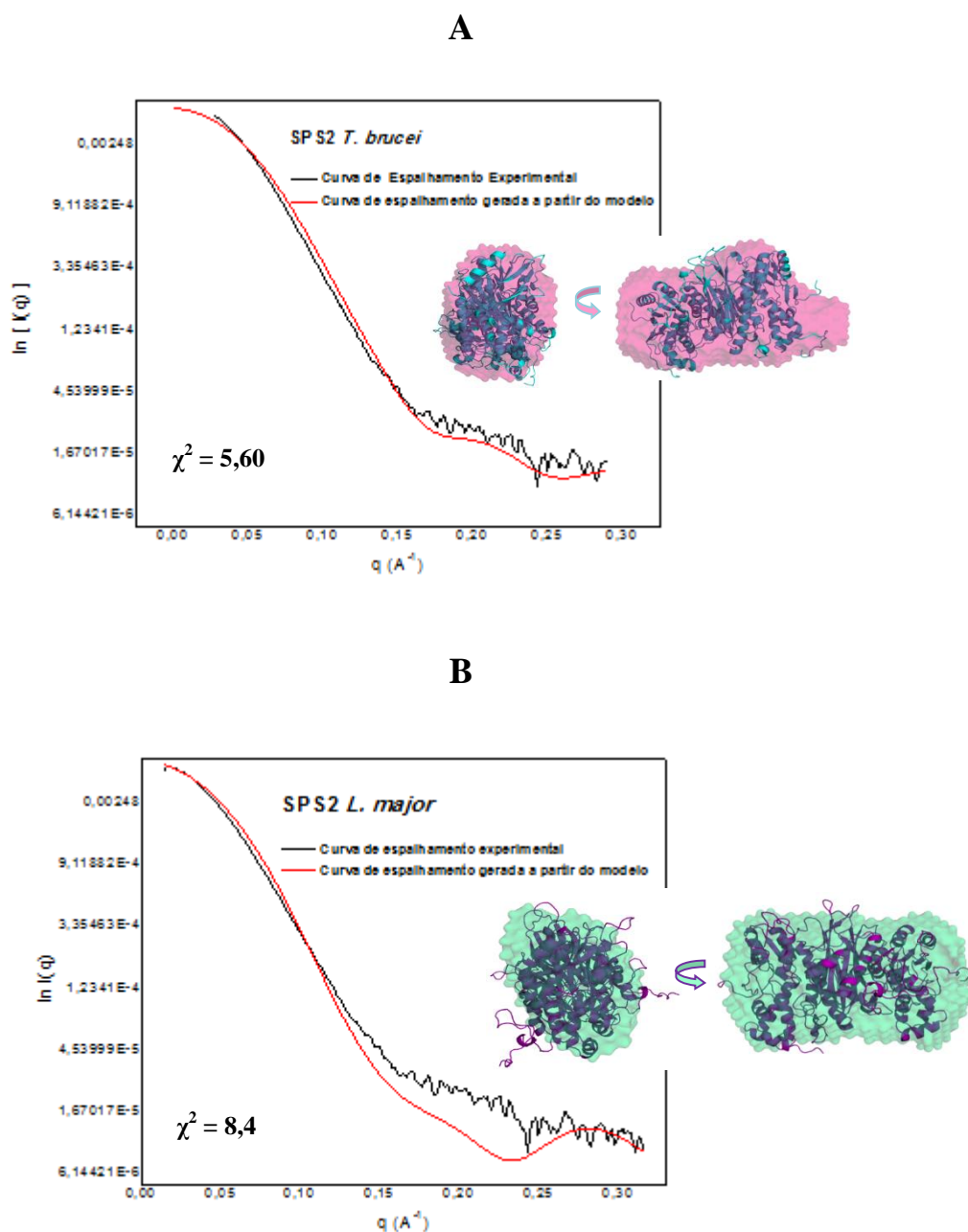


Figura 30- Médias dos envelopes moleculares das proteínas derivado do cálculo *ab initio*. (A) SPS2 de *T. brucei*. (B) SPS2 de *L. major*.

Fonte: Elaborado pela Autora

O ajuste da curva experimental com o modelo do homodímero modelado por homologia aponta alto valor do parâmetro discrepância (χ^2) para as duas proteínas (Figura 30) o que pode sugerir que a curva experimental tenha mistura de dímeros e tetrâmeros em

solução ou possivelmente pela proteína ter um N-terminal altamente flexível. Observando o encaixe do modelo no envelope de SAXS pode se concluir que os espaços no envelope de SAXS correspondem às extremidades, onde a proteína é mais flexível e possivelmente por esse fato não foram preenchidos no modelo. A análise da flexibilidade das proteínas foi feita pela construção do gráfico de *KratKy-Plot* a partir dos dados de SAXS (Figura 31).

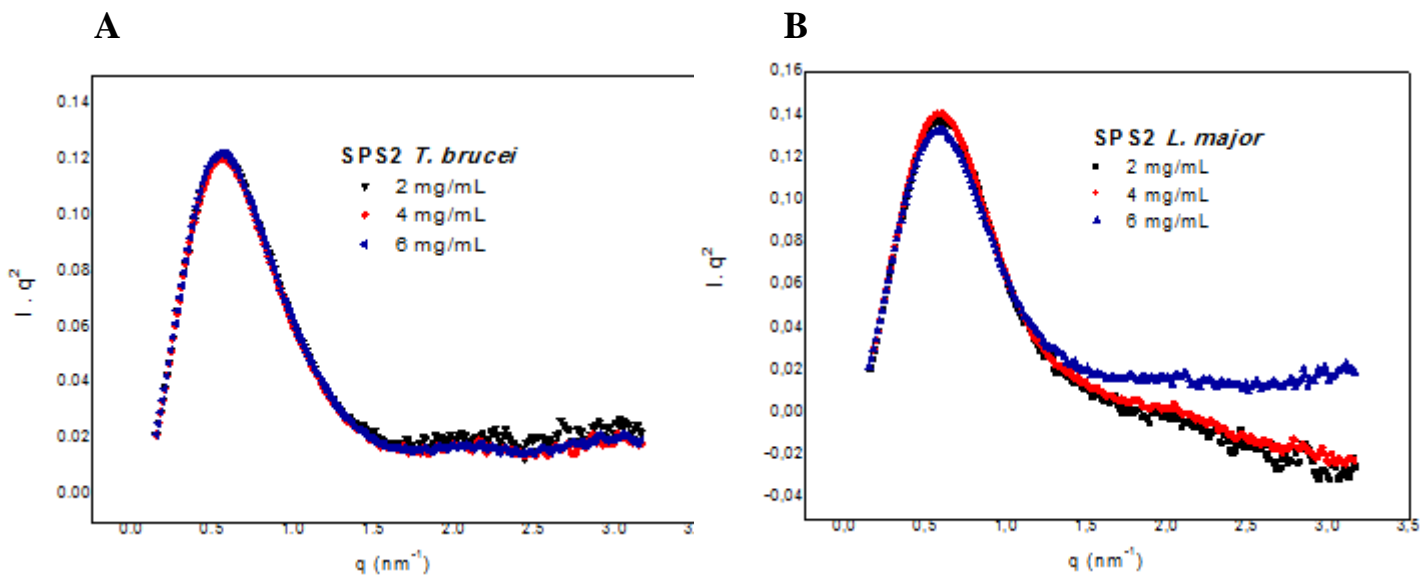


Figura 31 - Médias dos envelopes moleculares das proteínas derivado do cálculo *ab initio*. (A) SPS2 de *T. brucei*. (B) SPS2 de *L. major*.

Fonte: Elaborado pela Autora

O perfil do gráfico de *KratKy* aponta as selenofosfato sintetases como proteínas não flexíveis. Assim, as regiões flexíveis das proteínas podem não influenciar nos dados de SAXS. Os parâmetros estruturais obtidos do experimento de SAXS estão mostrado na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Resumo dos dados obtidos pelo experimento de SAXS para a SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major*

Amostra / Parâmetros	SPS2 <i>T. brucei</i>		SPS2 <i>L. major</i>	
	Exp. ^a	DAM ^b	Exp. ^a	DAM ^b
Dmáx (nm)	10,0	9,89	9,1	9,08
Rg (nm) (Gnom)	(3,20±0,015)	3,19	(3,03±0,018)	3,02
Rg (nm) (Guinier)	(3,19±0,021)	-	(2,86±0,032)	-
Discrepância Daminn χ	-	1,60	-	1,80
Discrepância Crysol χ^2	5,60	-	8,40	-
Resolução (nm)	1,99	-	1,99	-
Massa Molecular a partir do programa Heranza (kDa)	92,4±6,8	-	94,1±10,2	-

^aExp, calculado a partir dos dados experimentais.

^bDAM, parâmetros do modelo de átomos *Dummy* (DAM).

Fonte: Elaborado pela Autora

A não validação dos envelopes de SAXS quando comparados com os modelos validados por modelagem por homologia levaram a hipótese que existem diferentes estados oligoméricos em solução que foram melhor avaliados através do experimento de ultracentrifugação analítica.

3.2.2.6 Ultracentrifugação analítica (AUC)

Foram utilizados dois modelos para o cálculo da distribuição do coeficiente de sedimentação: Modelo 1: Distribuição $c(s)$ padrão simulando valores para razão friccional $\frac{f}{f_0}$ o qual fita melhor com os dados experimentais; modelo 2: Distribuição $c(s)$ com conhecimento a priori, utilizando o valor de D estimado pelo DLS e simulando valores de D para ajustar com os dados de velocidade de sedimentação experimental.

Os coeficientes de sedimentação aparente (s) foram encontrados como o máximo do ajuste da Gaussiana das curvas $c(s)$ (Figura 32). O valor de s aparente contém interferências causadas pela temperatura, viscosidade e densidade do tampão, então nos calculamos o coeficiente de sedimentação padrão a 0 mg/mL de concentração de proteína ($s_{20,w}^0$), o qual é um parâmetro intrínseco da partícula. Mudanças no $s_{20,w}$ induzidas por pH, força iônica, ligantes, temperatura são devido à mudanças conformacionais¹⁰⁰. Nos calculamos o $s_{20,w}$ (equação 7, seção 3.1.13) para o modelo 1 e para o modelo 2 para cada concentração de proteína a partir de s , e, por regressão linear, foi estimado o $s_{20,w}^0$ (Figura 33).

A massa molecular (MW) de uma partícula foi calculado pelo coeficiente de sedimentação e de difusão pela equação 9.

O $\frac{f}{f_0}$ foi também estimado pela razão $\frac{s_{esfera}}{s_{20,w}^0}$. Os valores para $s_{20,w}^0$, e $\frac{f}{f_0}$ e MW

podem ser visualizados nas **Tabela 10** e **Tabela 11**.

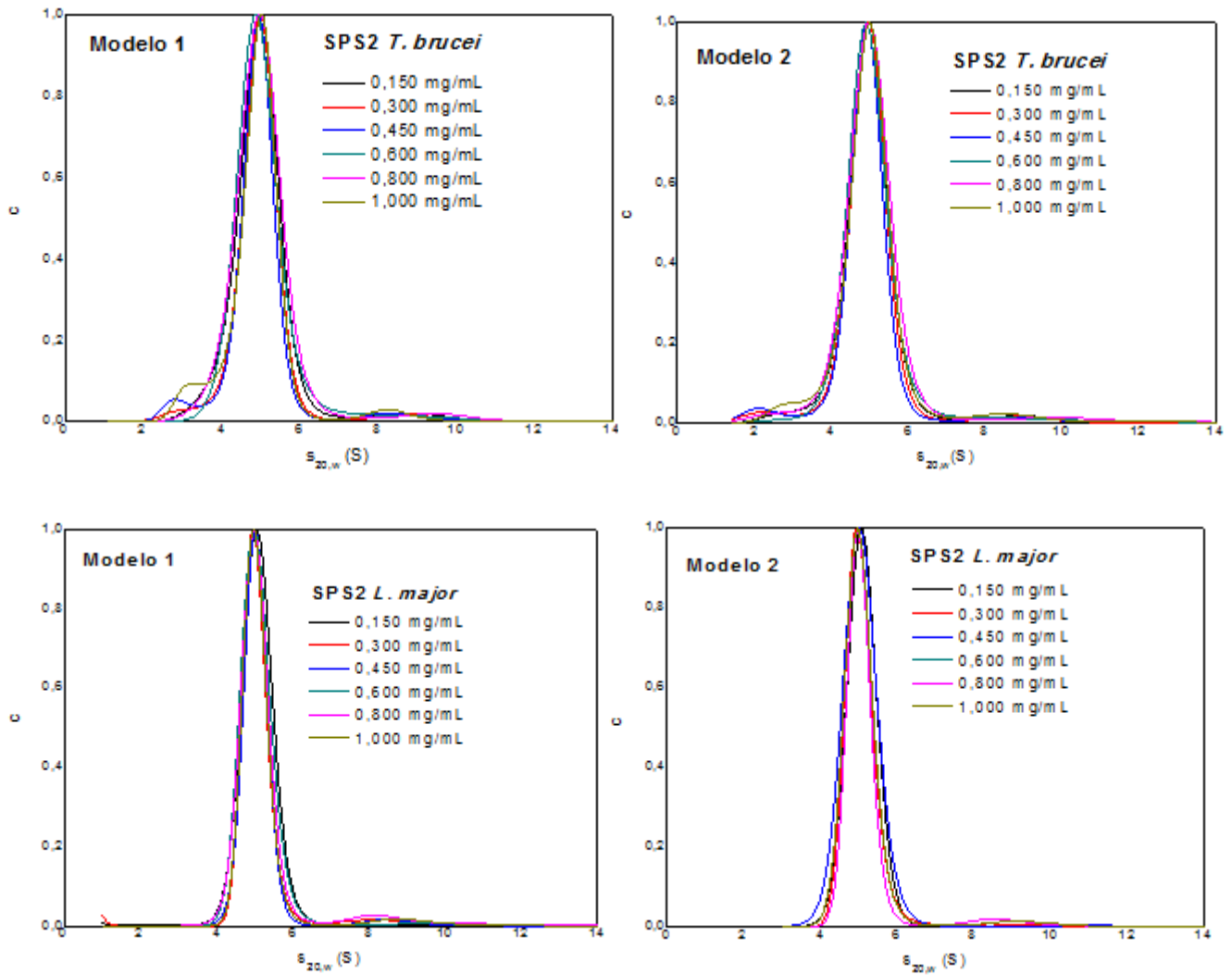


Figura 32- Gráficos de distribuição do coeficiente de sedimentação $c(s)$ em seis diferentes concentrações para a SPS2 de *T. brucei*, SPS2 de *L. major*. Nessas análises preliminares, foi utilizado o modelo 1 (sem conhecimento a priori) e o modelo 2 (com conhecimento a priori utilizando o valor inicial de D obtido pelo DLS).

Fonte: Elaborado pela Autora

Capítulo 3 - Estudos Bioquímicos e Biofísicos

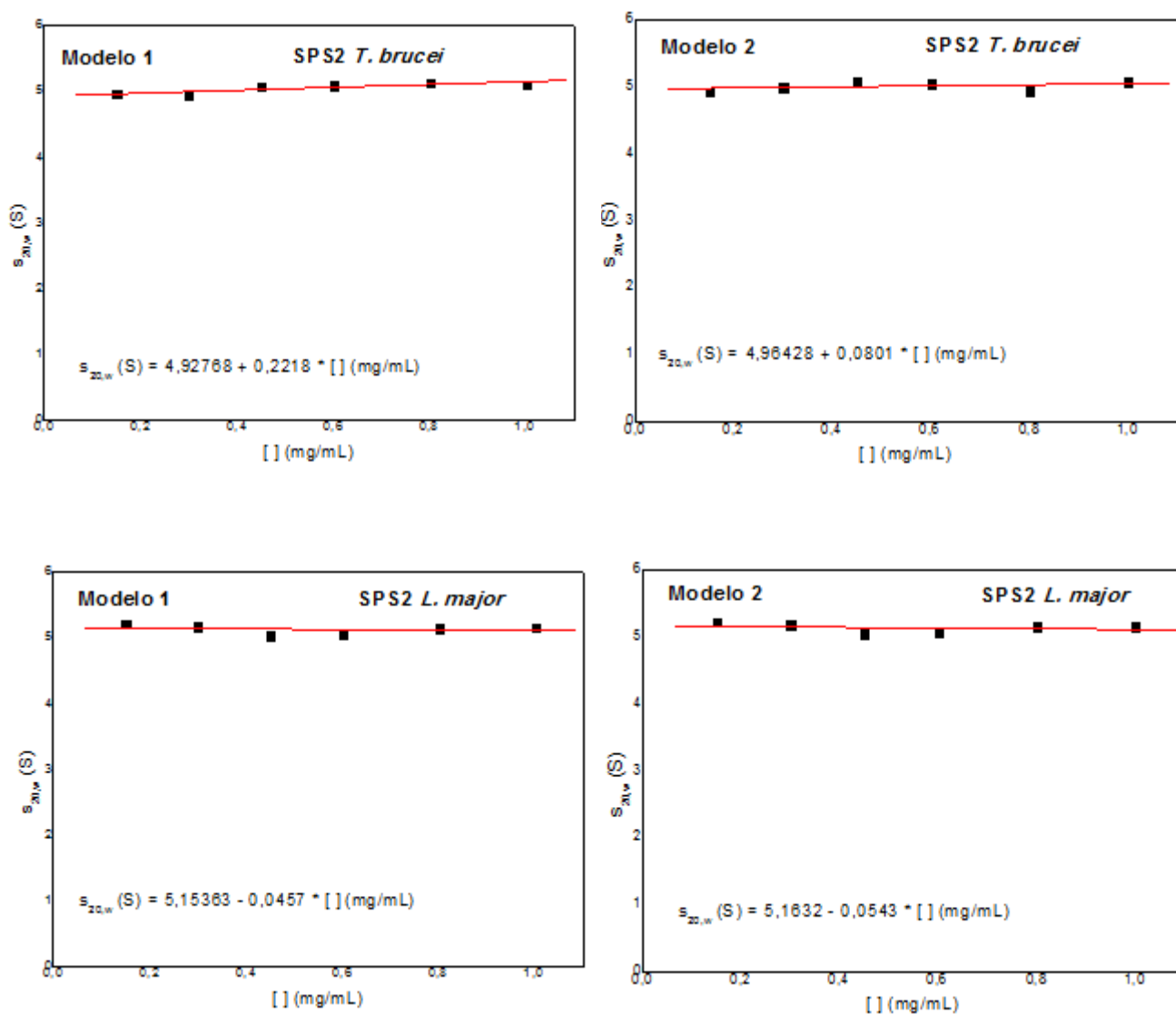


Figura 33 - Gráficos de $S_{20,w}$ versus concentração da proteína para as duas selenofosfato sintéticas. $S_{20,w}$ (calculada pelo AUC velocidade de sedimentação) versus concentração da proteína ajustado com uma regressão linear para calcular o $S_{20,w}^0$.

Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 10 - Resultados do experimento de SV para a SPS2 de *T. brucei* para os dois modelos utilizados no tratamento dos dados

SPS2 <i>T. brucei</i>	Modelo 1	Erro relativo %	Modelo 2	Erro relativo %
	Espécie 1 (%c ⁰ = 94,67 ± 2,89)*		Espécie 1 (%c ⁰ = 94,67 ± 2,89)*	
$s_{20,w}^0$ (S)	4,93±0,04	-	4,96 ± 0.06	-
$D_{20,w}^0$ (10 ⁻⁷ cm ² /s)	4,62± 0,10	-	5,5 ± 0,2	-
$f / f_0 = (s_{esfera(dímero)} / s_{20,w}^0)$	1,39	-	1,38	-
\overline{M}_w (kDa) (Sedfit)	88,1 ± 6,8	1,81	84,29 ± 2,86	2,66
M_w (kDa) (eq. 9)	99,96	15,51	84,47	2,38
SPS2 <i>T. brucei</i>	Modelo 1	Erro relativo %	Modelo 2	Erro relativo %
	Espécie 2 (%c ⁰ = 3,32 ± 0,26)*		Espécie 2 (%c ⁰ = 3,32 ± 0,26)*	
$s_{20,w}^0$ (S)	8,95± 0.44	-	9,11± 0,46	-
$f / f_0 = (s_{esfera(tetrâmero)} / s_{20,w}^0)$	1,21	-	1,19	-
\overline{M}_w (kDa) (Sedfit)	208,4 ± 11,9	18,81%	166,13± 10.72	11.57
M_w (kDa) (eq. 9)	**	-	**	-

*Porcentagem da espécie extrapolada para concentração 0 mg/mL;

**Não foi calculado o D para o tetrâmero, assim não foi possível calcular o \overline{M}_w para a espécie 2;

Fonte: Elaborado pela Autora

Capítulo 3 - Estudos Bioquímicos e Biofísicos

Tabela 11 - Resultados do experimento de SV para a SPS2 de *L. major* para os dois modelos utilizados no tratamento dos dados

SPS2 <i>L. major</i>	Modelo 1	Erro relativo %	Modelo 2	Erro relativo %
	Espécie 1 (%c ⁰ = 99,04 ± 1,87)*		Espécie 1 (%c ⁰ = 99,64 ± 1,73)*	
$s_{20,w}^0$ (S)	5,15 ± 0,07	-	5,16 ± 0,07	-
$D_{20,w}^0$ (10 ⁻⁷ cm ² /s)	5,39 ± 0,30	-	5,68 ± 0,09	-
$f / f_0 = (s_{esfera(dímero)} / s_{20,w}^0)$	1,32	-	1,32	-
\overline{M}_w (kDa) (Sedfit)	86,88 ± 2,57	1,10	84,29 ± 2,20	1,95
M_w (kDa) (eq. 9)	88,78	3,27	84,41	1,77
SPS2 <i>L. major</i>	Modelo 1	Erro relativo %	Modelo 2	Erro relativo %
	Espécie 2 (%c ⁰ = 3,78 ± 1,45)*		Espécie 2 (%c ⁰ = 1,2 ± 2,6)*	
$s_{20,w}^0$ (S)	8,62 ± 0,54	-	8,83 ± 0,57	-
$f / f_0 = (s_{esfera(tetrâmero)} / s_{20,w}^0)$	1,26	-	1,23	-
\overline{M}_w (kDa) (Sedfit)	207,35 ± 17,23	20,64	158,29 ± 10,89	7,69
M_w (kDa) (eq. 9)	**	-	**	-

*Porcentagem da espécie extrapolada para concentração 0 mg/mL; **Não foi calculado o D para o tetrâmero, assim não foi possível calcular o \overline{M}_w para a espécie 2;

Fonte: Elaborado pela Autora

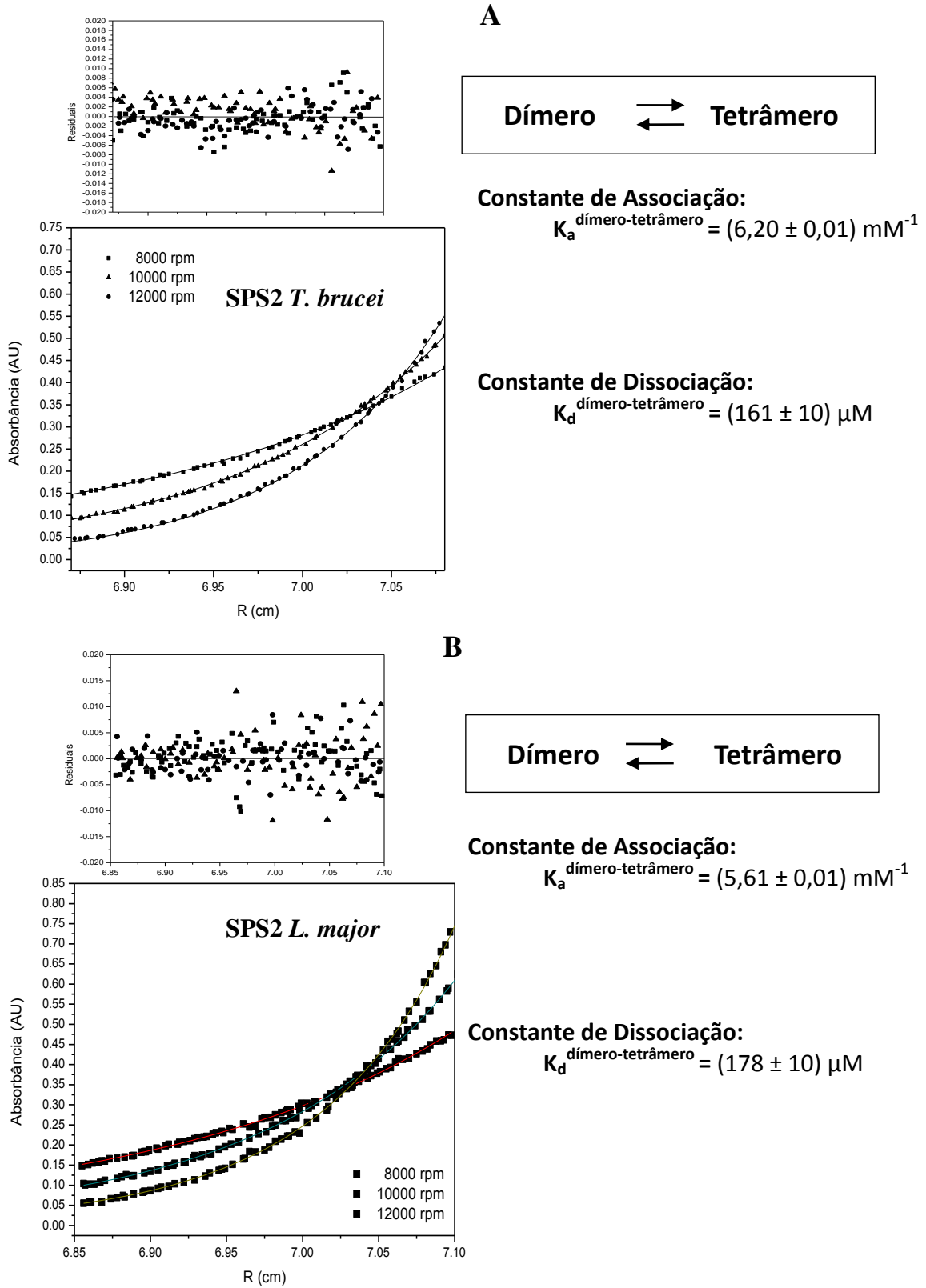
A Figura 32 mostra a distribuição do coeficiente de sedimentação $c(s)$ das duas selenofosfato sintetases em diferentes concentrações de proteína, onde o máximo das curvas Gaussianas resulta no s . Através dessas Figuras e analisando os erros relativos das massas moleculares calculadas, podemos dizer que o segundo modelo é melhor para nosso sistema. Lembrando que este modelo não utiliza o coeficiente de difusão calculado experimentalmente. Assim, nossas análises serão baseadas no segundo modelo. Os resultados sugerem que as duas selenofosfato sintetases se comportam como um sistema de duas espécies, porém a segunda espécie tem baixa porcentagem (Tabela 10 e Tabela 11).

O valor de $s_{20,w}$ extrapolado para 0 mg/mL (Figura 33 – Tabela 10 e Tabela 11) para a espécie 1 (predominante) nas duas selenofosfato sintetases foi maior que s_{esfera} do monômero e menor que o s_{esfera} dîmero (Tabela 3 e Tabela 4). A partir disso e dos valores obtidos de MW podemos indicar que a espécie majoritária nas duas proteínas é dimérica.

Analisando da mesma forma, mas para o s_{esfera} das formas oligoméricas maiores (trímero e tetrâmero – **Tabela 3** e **Tabela 4**), apontamos a segunda espécie como tetramérica.

Os valores para $s_{20,w}^0$ e $D_{20,w}^0$ estimado para as proteínas sugerem que a SPS2 de *T. brucei* apresenta forma assimétrica ($f / f_0 = 1,4$) e a SPS2 *L. major* é mais globular ($f / f_0 = 1,3$). Estes resultados obtidos em concentrações protéicas fisiológicas corroboram com os dados em alta concentração (SAXS) para a SPS2 *T. brucei* e SPS2 *L. major*.

Como foram observadas duas espécies dímero e tetrâmero para as selenofosfato sintetases, resolveu-se analisar se essas espécies se encontram em equilíbrio em solução e quais são suas constantes de dissociação. Para isso foi realizado o experimento de equilíbrio por sedimentação. As curvas SE estão mostradas na Figura 34.



B

Dímero \rightleftharpoons Tetrâmero

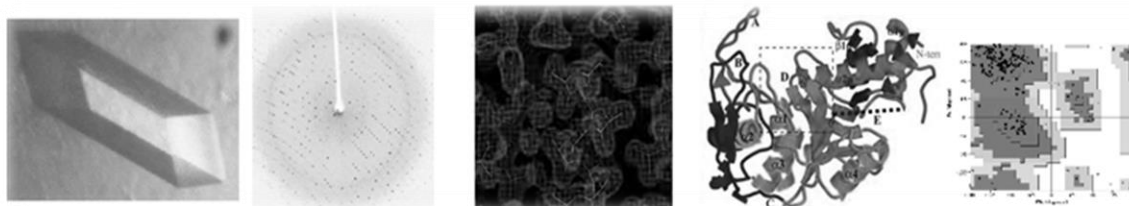
Constante de Associação:
 $K_a^{\text{dímero-tetrâmero}} = (5,61 \pm 0,01) \text{ mM}^{-1}$

Constante de Dissociação:
 $K_d^{\text{dímero-tetrâmero}} = (178 \pm 10) \mu\text{M}$

Figura 34 - Resultados do experimento de sedimentação por equilíbrio (SE) das selenofosfato sintetases **(A)** *TbSPS2* e **(B)** *LmSPS2*. As curvas mostradas correspondem à absorbância da amostra x raio da célula e os residuais do ajuste do modelo utilizado do programa SEDPHAT.

Fonte: Elaborado pela Autora

A distribuição aleatória dos gráficos residuais (Figura 34) mostra que o modelo ajusta bem aos dados experimentais para as duas proteínas. O ajuste ao modelo de equilíbrio termodinâmico entre as diferentes espécies observadas no SE resultou em constantes de associação dímero-tetrâmero ($6,20 \pm 0,01$) mM^{-1} ; ($5,61 \pm 0,01$) mM^{-1} para a SPS2 de *T. brucei*, SPS2 de *L. major*, respectivamente. É interessante notar que os valores das constantes de associação das duas proteínas estão muito próximos e apontam um equilíbrio fraco entre as diferentes espécies (Dímero/Tetrâmero), o que condiz com o fato de observarmos a predominância de dímeros em solução nos dois casos.



Capítulo 4 - Cristalização, Métodos de melhoria da difração e Estudos Estruturais

Este capítulo reporta as diversas técnicas utilizadas para cristalização das selenofosfatos sintetase de *T. brucei* e *L. major*. Também, são abordados aqui a resolução da estrutura cristalográfica e os estudos estruturais.

4.1 METODOLOGIA

Os Experimentos de Cristalização, técnicas para melhoria da difração, coleta de dados de difração de raios X foram executados no laboratório do Professor Doutor Tom Blundell, no Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge, Inglaterra durante os seis meses de doutorado sanduiche (Março de 2011 a Setembro de 2011).

4.1.1 Cristalização

4.1.1.1 Triagem Inicial

SPS2 de *T. brucei*, SPS2 de *L. major* foram purificadas conforme descrito no capítulo 3. Para cristalização, as proteínas foram concentradas à 10 mg/mL em um tampão A composto de 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 50 mM NaCl e 1mM β - mercaptoetanol. As triagens foram executadas com as proteínas na forma nativa e em complexo com 2 mM AMPCPP e 4 mM MgCl₂. O robô CRYSTAL PHOENIX (Art Robbins Instruments, Inc) foi utilizado para os ensaios iniciais de cristalização. A triagem foi realizada utilizando kits QIAGEN (PEGs, PEGs II, Classic lite, Classics, Classics II, pH Clear and pH Clear II), aplicando o método de difusão de vapor, gota sentada. O princípio deste método é o processo de equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor num meio fechado. A solução menos concentrada poderá perder seu solvente volátil até que os potenciais químicos das duas sejam iguais. Uma gota contendo a macromolécula biológica a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização em uma concentração mais alta que a da gota. O equilíbrio prossegue por meio

da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale aquela do reservatório. Se o equilíbrio ocorre por meio de troca de água (da gota para o reservatório), isto leva a uma diminuição do volume da gota, e conseqüentemente a um aumento na concentração de todos os constituintes da gota de cristalização podendo formar precipitados proteicos cristalinos.

4.1.1.2. Método de Cristalização *Microbatch*

Óleos são frequentemente usados para otimizar cristalização pelo controle da taxa de nucleação e crescimento dos cristais. A cristalização *Microbatch* é essencialmente um método no qual a molécula a ser cristalizada é misturada com agentes de cristalização no início do experimento¹⁰⁴. A condição de supersaturação é alcançada imediatamente na mistura, portanto a composição e o volume do ensaio permanecem constantes e os cristais irão se formar somente se as condições precisas forem escolhidas corretamente. A água evapora em taxas diferentes através de diferentes óleos. Parafina permite somente que uma quantidade insignificante de água evapore, enquanto óleo silicone permite que a água evapore livremente. É possível também controlar a evaporação pela mistura de óleo de parafina e silicone em taxas diferentes.

O experimento de *microbatch* ilustrado na Figura 35 foi realizado para a SPS2 de *T. brucei* em placas Greiner (Hampton Research) (Figura 35 **B**). As placas foram preparadas com 2 µL de *TbSPS2* a 10 mg/mL em tampão A misturada com 2 µL de solução de cristalização na qual foram obtidos os cristais iniciais de *TbSPS2* (0,1M Tri – citrato de sódio (pH 5,6), 17% Peg 3350). Foi adicionado 20 µL de óleo de parafina em cada poço e incubado a 18 °C.

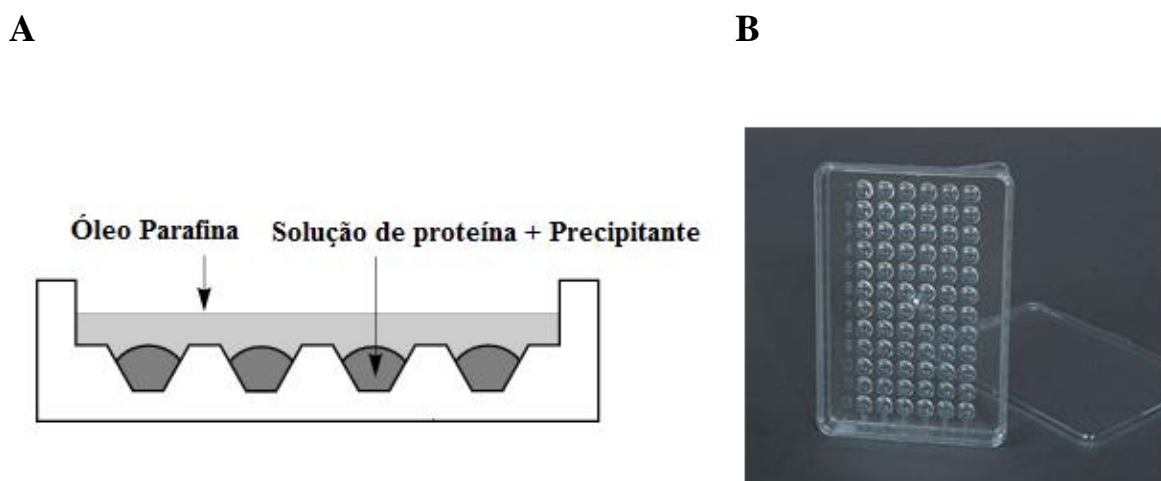


Figura 35 – Método de Cristalização *microbatch*. (A) Poços nos quais são adicionadas a solução de cristalização juntamente com a proteína e o óleo de interesse. (B) Placa Greiner de *microbatch* (Hampton Research).

Fonte: Extraído e Modificado de BERGFORS¹⁰⁴

4.1.1.3. Método de Cristalização de *microSeeding* Automatizado

D'Arcy e colaboradores^{105,106} recentemente implementaram uma nova abordagem de *seeding* automatizado. A idéia de *microseeding* automatizado é baseada no *screening* de cristalização da matrix esparsa tradicional. Este método é funcional a partir da mistura da solução de reservatório, a solução da proteína e a solução de sementes (núcleos) em uma proporção de 2:3:1. Foi observado que tal triagem apresenta um aumento positivo nas condições de cristalização. Este novo método permite *microseeding* abrange novas condições – condições nas quais cristais não se formariam na ausência de núcleos de cristais. Além disso, a qualidade dos cristais obtidos é geralmente melhor.

Foram realizadas triagens de *microseeding* para a SPS2 de *T. brucei* usando o robô Oryx6 (Douglas Instruments Ltda) e kits comerciais da QIAGEN (Peg Suite, Peg II Suite, Classic, Classic II, pH Clear). A proteína estava à 5 mg/mL e 10 mg/mL na forma apo e em complexo com AMPPCP e MgCl₂. As sementes usadas foram obtidas através de microcristais crescidos previamente de condições de cristalização utilizando o método de gota suspensa e

preparadas para *microseeding* por esmagamento dos cristais usando “*Seed Bead*” (Hampton Research).

4.1.1.4 Primeira Coleta de Dados e Análise Preliminar de Difração de Raios X da SPS2 de *Trypanosoma brucei*

Os cristais iniciais da SPS2 de *T. brucei* crescidos pelo método de difusão de vapor gota suspensa e pelo método de *microbatch* foram coletados no feixe de linha I02 na fonte de Luz de Diamond, Reino Unido em condições criogênicas (condição de cristalização com 25% (v/v) de 2-Metil-2,4-pentanodiol (MPD)).

4.1.2 Métodos de melhoria de cristais e da qualidade de Difração

Com intuito de obter cristais melhores de SPS2 de *T. brucei* e apropriados para determinação da estrutura cristalográfica, nos tentamos aplicar diferentes métodos pós-cristalização e pré-cristalização. No caso da proteína SPS2 de *L. major*, a qual não teve indícios de cristais foi aplicado somente métodos pré-cristalização com o objetivo de aumentar a probabilidade da proteína cristalizar.

4.1.2.1 Métodos Pós-cristalização

4.1.2.1.1 Cristal *Annealing*

Cristal *annealing* pode ajudar a superar o aumento da mosaicidade associado com criocristalografia¹⁰⁷⁻¹⁰⁸. Existem três tipos de *annealing*: “*Macromolecular Crystal Annealing*” (MCA), “*Flash annealing*” (FA) e *annealing no loop* (AL). Nos aplicamos MCA e AL para os cristais de SPS2 de *T. brucei*. No caso do procedimento de MCA, o cristal foi removido do nitrogênio e colocado em uma gota grande de volume de 10 µL da solução crio a partir da qual o cristal foi originalmente montado. O cristal foi deixado incubando na gota por três minutos e posteriormente congelado novamente. Para *annealing no loop*, foi aplicado um intervalo variável de tempo para bloquear o fluxo de nitrogênio até que a gota no *loop* ficasse clara.

4.1.2.1.2 Desidratação de Cristais

Desidratação é um tratamento pós-cristalização que tem mostrado efeitos benéficos na difração de raios X de cristais macromoleculares. Os diferentes efeitos que podem ser observados durante a desidratação são: mudanças no grupo espacial, redução da cela unitária, alterações na mosaicidade, melhoramento do perfil do *spot* e um aumento no limite de resolução da difração. Existem muitos métodos para desidratação de cristais de proteína. A desidratação física consiste na secagem do cristal ao ar com umidade relativa controlada e a desidratação química na qual ocorre difusão de vapor dos cristais usando sais e aumentando a concentração de precipitante¹⁰⁹.

Proteínas geralmente permanecem ativas e normalmente se reorganizam a curto e longo alcance dentro da rede cristalina¹¹⁰. Esta reorganização é muitas vezes prejudicial para a qualidade de difração do cristal, mas em certos casos, pode levar a uma maior ordem interna,

menor conteúdo de solvente ou uma mudança no grupo espacial que pode resultar em uma melhora na difração e conseqüentemente uma maior qualidade no conjunto de dados.

4.1.2.1.2.1 Desidratação com umidade relativa controlada

O dispositivo mostrado na Figura 36 proporciona um fluxo de ar de umidade relativa do ar controlada que é utilizado para alterar a quantidade de água nos cristais macromoleculares.

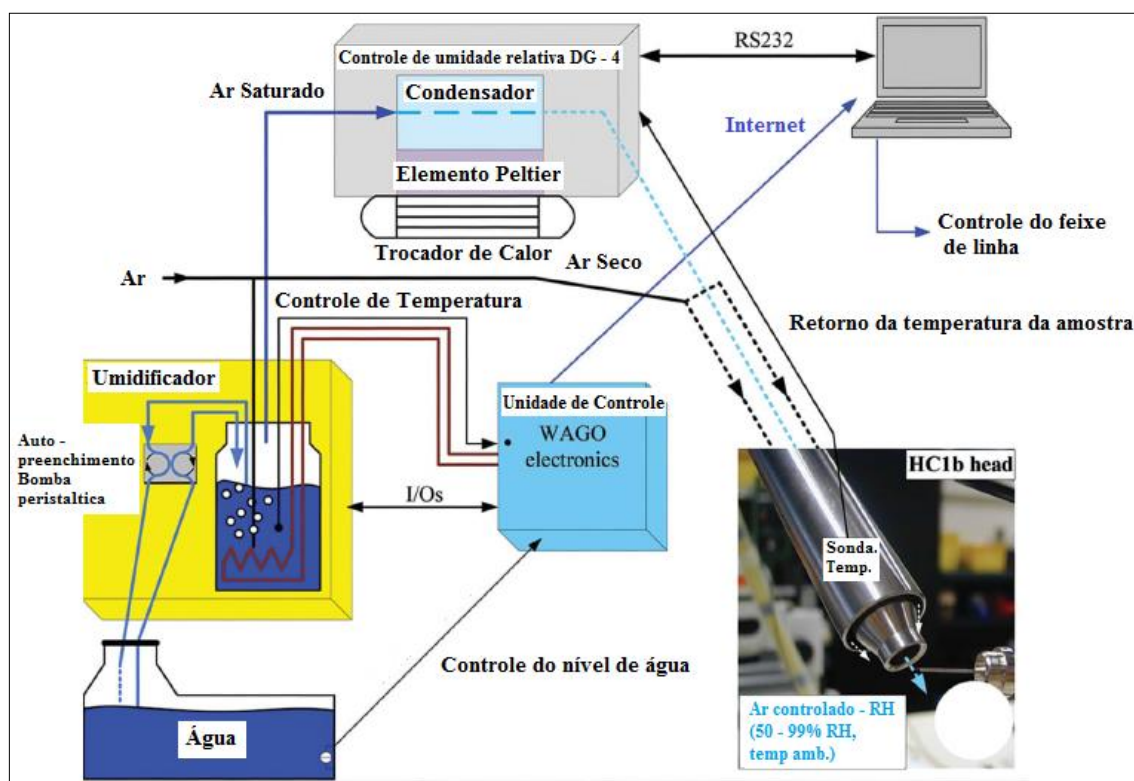


Figura 36 – Aparato experimental para realização do experimento de desidratação dos cristais com umidade relativa controlada.

Fonte: Extraído e Modificado de SANCHEZ-WEATHERBY¹¹¹

As amostras são montadas em *loops* de malha (Mitegen®) e o progresso da desidratação pode ser monitorado ambos ópticamente e pela aquisição de imagens de

difração. Uma vez que o nível de hidratação ideal é obtido, o crio congelamento dos cristais é realizado para posterior coleta. Os experimentos de desidratação com umidade relativa controlada foram realizados no feixe de linha I02 em Diamond Light Source (DLS), Reino Unido. Os cristais de SPS2 de *T. brucei* (altamente anisotrópicos) já montados nos *loops* específicos foram colocados a temperatura ambiente e submetidos a um gradiente de umidade relativa (UR) descendente (95% - 80%).

4.1.2.1.2.2 Desidratação Química

Experimentos de desidratação química foram realizados para os cristais de SPS2 de *T. brucei* seguindo os quatro diferentes métodos ilustrados na Figura 37.

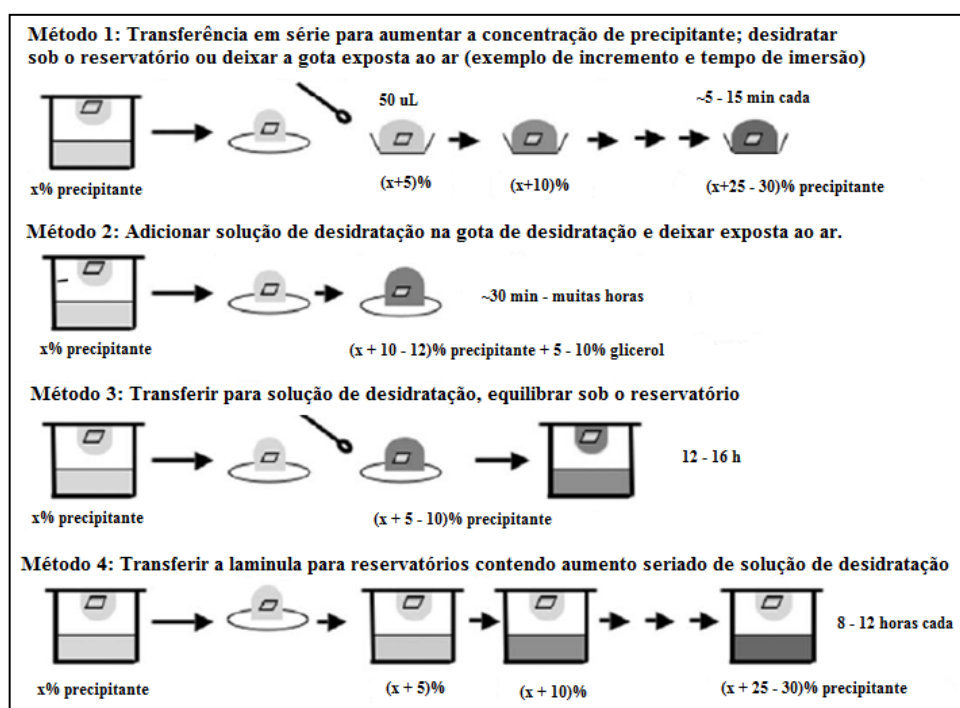


Figura 37 – Métodos aplicados para o experimento de desidratação química.

Fonte: Extraído e Modificado de HERAS¹⁰⁹

Foram utilizados os cristais de SPS2 de *T. brucei* crescidos nas condições de cristalização consistindo de 0,1M Tri – citrato de sódio (pH 5,6), 17% Peg 3350. Assim, o

precipitante utilizado para o incremento foi o Peg 3350. Após a desidratação, os cristais foram congelados utilizando com o protetor criogênico (25% de MPD) e sem protetor criogênico. Os cristais foram submetidos a experimentos de difração de raios X no feixe de linha I02 em Diamond Light Source (DLS), Reino Unido.

4.1.2.1.2.3 *Crosslinking*

Alguns resíduos de aminoácidos como a lisina contribuem para o aumento da entropia de superfície de macromoléculas. Um aumento da entropia de superfície desfavorece contatos cristalinos e altera a cinética do processo de cristalização de macromoléculas. Através da modificação de lisinas, como sua metilação, é possível alterar significativamente as propriedades de superfície de muitos sítios da macromolécula, o qual pode resultar em novos contatos cristalinos ou mudança na cinética de cristalização. Assim, o glutaraldeído age como um agente reticulante, isto é, ele reage com as amins de lisinas, formando ligações cruzadas. O experimento de *crosslinking* foi realizado para os cristais da SPS2 de *T. brucei* como mostrado na Figura 38.

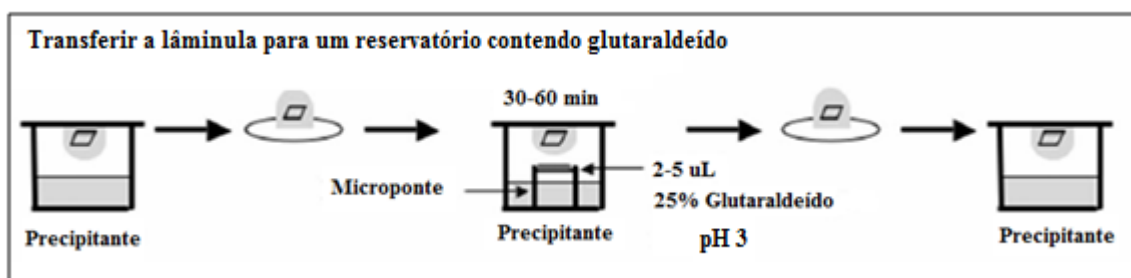


Figura 38 – Etapas para realização do experimento de *crosslinking*.

Fonte: Extraído e Modificado de HERAS¹⁰⁹

4.1.2.2 Métodos Pré-Cristalização

4.1.2.2.1 Novas Construções da proteína SPS2 de *T. brucei*

Uma predição de desordem estrutural da SPS2 de *T. brucei* foi realizada a partir da sequência de aminoácidos da proteína e utilizando o servidor DISOPRED server¹¹².

Com o objetivo de melhorar a difração, truncamentos foram introduzidos nessas regiões preditas como desordenadas. Duas novas construções foram desenhadas retirando os 25 e 70 primeiros resíduos do N-terminal da SPS2 de *T. brucei*, baseado na predição de desordem e na análise visual do modelo construído por modelagem por homologia. A construção original possui cauda de 6 Histidinas no N-terminal (pET28a) (Novagen) e estas construções foram desenhadas para a clonagem no vetor pET20b (Novagen) com a cauda de 6 Histidinas no C-terminal.

4.1.2.2.1.1 Amplificação e Clonagem das novas construções de SPS2 de *T. brucei*

As novas construções da SPS2 foram amplificadas pela reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) a partir do gene inteiro em pET28a e dos oligonucleotídeos com sítio de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI* (Biolabs) (**Tabela 12**). A reação de amplificação das construções está descrita na Tabela 13.

Tabela 12 - Sequência dos oligonucleotídeos empregados na montagem e amplificação das novas construções. $\Delta 25$ -TbSPS2 e $\Delta 70$ -TbSPS2 – correspondem aos oligonucleotídeos para a construção da SPS2 de *T. brucei* sem os 25 e 70 resíduos de aminoácidos iniciais, respectivamente

Oligodesoxirribonucleotídeos	Sequência (5' - 3')
<i>$\Delta 25$-TbSPS2 sense</i>	AGCATATGGGTCTACCGGAAGAGTTTACCTTAACTGAC
<i>$\Delta 25$-TbSPS2 reverse</i>	AGCTCGAGAATAATCTTATCATTACCTTCGCTCCACCTC
<i>$\Delta 70$-TbSPS2 sense</i>	AGCATATGGATTGCAGCATTGTGAAACTGCAG
<i>$\Delta 70$-TbSPS2 reverse</i>	AGCTCGAGAATAATCTTATCATTACCTTCGCTCCACCTC

Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 13- Mistura da reação em Cadeia da DNA Polimerase

Mistura da Reação	Quantidade final da reação
Oligo da fita sense (Fermentas) [50 pmol]	[1 pmol] 1 uL
Oligo da fita reverse (Fermentas) [50 pmol]	[1 pmol] 1 uL
Template (SPS2 em pET28a)	1 uL
Tampão Taq Polimerase HiFi [10x] (Invitrogen)	[1x] 5 uL
MgSO ₄ [50 mM]	[1 mM] 1 uL
dNTPs [10 mM]	1 uL
Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen) [1 U/uL]	0,2 uL [0,2 U]
H ₂ O	39,8 uL
Total	50 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

Os ciclos de amplificação das construções foram:

95°C por 2 minutos	} 30x
95°C por 30 segundos	
50°C por 30 segundos	
72°C por 2 min	
72°C por 10 min	

As construções amplificadas e já adeniladas foram ligadas ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega). A ligação do inserto ao vetor foi realizada obedecendo à proporção 3:1 (inserto: vetor), conforme descrito no manual do vetor pGEM-T. A reação de ligação (**Tabela 14**), foi incubada à 4 °C por 16 horas.

Tabela 14 - Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem pGEM-T

Mistura da Reação	Quantidade final da reação
Inserto	1,5 uL
pGEM – T (Promega) [50 ng/uL]	[25 ng] 0,5 uL
Tampão T4 DNA ligase [2x] (Promega)	[1x] 5 uL
T4 DNA ligase (Promega) [1U/uL]	[1U] 1 uL
H ₂ O	2 uL
Total	10 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

O produto da ligação em pGEMT foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 α . Após transformadas as cepas de *E. coli*, selecionamos colônias das duas construções ligação 1 (Δ 25-*TbSPS2*) em pGEMT e ligação 2 (Δ 70-*TbSPS2*) em pGEMT, fizemos o inóculo em 5 mL de meio LB contendo [100 μ g/mL] carbenicilina. Após uma noite de crescimento a 37 °C, a 250 rpm, 200 μ L de cultura foram estocados a -80 °C. Do restante da cultura fez-se a extração do DNA plasmidial utilizando o kit “Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit” (Fermentas) para analisar se as colônias selecionadas adquiriram o plasmídeo recombinante. As análises das colônias recombinantes foram realizadas pela análise de restrição do plasmídeo extraído utilizando enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I (Biolabs) que flanqueiam o gene conforme descrito na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Reação de digestão para análise das colônias recombinantes

Mistura da Reação de Digestão	Quantidade final da reação
Ligaçãox – pGEMT/ pET20b	40 uL
<i>Nde</i> I [20 U/uL] (Biolabs)	1 uL
<i>Xho</i> I [20 U/uL] (Biolabs)	1 uL
BSA [100x] (Biolabs)	1 uL
Tampão 2 [10x] (Biolabs)	5 uL
H ₂ O	2 uL
Total	50 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

Os insertos correspondentes à construção 1 (Δ 25-*TbSPS2*) e 2 (Δ 70-*TbSPS2*) foram purificadas (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)) do gel e ligados ao vetor

de expressão pET20b já linearizado com as enzimas de restrição conforme a reação descrita na **Tabela 16**.

Tabela 16 - Reação de ligação do inserto ao vetor de expressão pET20b

Mistura da Reação	Quantidade final da reação
Inserto [22 ng/uL]	[22 ng] 1 uL
pET20b (Novagen) [20 ng/uL]	[40 ng] 2 uL
Tampão T4 DNA ligase [2x] (Promega)	[1x] 5uL
T4 DNA ligase (Promega) [1 U/uL]	[1U] 1 uL
H ₂ O	1 uL
Total	10 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

A reação de ligação foi incubada por 16 °C por 16 horas e posteriormente transformada em células *E. coli* DH5 α . Após transformada, colônias crescidas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo [100 μ g/mL] carbenicilina. Para análise dos transformantes, o plasmídeo foi extraído e digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I (Biolabs®) (**Tabela 15**).

4.1.2.2.1.2 Expressão e Purificação das Novas Construções da SPS2 de *Trypanosoma brucei*

Depois da confirmação dos clones a partir do sequenciamento, as construções foram transformadas na linhagem de células competentes BL21(DE3). Para expressão, fez-se um pré-inóculo de 5mL contendo cepas BL21(DE3) transformadas com as construções e foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250 rpm a 37 °C com seu respectivo antibiótico carbenicilina [100 μ g/mL]. Após as 14 horas de crescimento das células no meio de cultura uma alíquota de 500 μ L (1:100) de cada um dos pré-inóculos foi transferida para um erlenmeyer de LB + 100 μ g/mL carbenicilina que ficou sob agitação de 200 rpm a 37°C até atingir a D.O.600nm de aproximadamente 0,5, para

adição de 1 mM de IPTG (isopropyl- β -thiogalactopyranoside). Após a indução as células foram mantidas à 20 °C por 12 h.

Decorridas 12 horas, as células foram centrifugadas a 4000 rpm por 1 hora, para a separação do meio da massa celular, e posteriormente, o precipitado ressuspendido em tampão A (25 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, coquetel de inibidores de Protease (Roche)). Após a lise por pressão usando EmulsiFlex-C5 (Avestin, Europe) e centrifugação por 1 hora à 10.000 rpm (para remover o lixo celular), o sobrenadante foi carregado na coluna de Ni (GE Bioscience). A proteína ligada na coluna foi eluída com um gradiente de imidazol.

As frações eluídas a partir da cromatografia por afinidade foram concentradas e aplicadas na coluna Superdex 200 16/60 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada com o tampão A. O pico correspondente a eluição da proteína foi concentrado a 10 mg/mL usando filtro Millipore com corte de 30 kDa.

4.1.2.2.1.3 Ensaio de Cristalização das Novas Construções de SPS2 de *T. brucei*

Ensaio de cristalização das novas construções foram realizados usando kits comerciais (QIAGEN). As gotas foram feitas a partir do método de difusão de vapor, gota apoiada, em placas de 96 poços usando o robô de cristalização CRYSTAL PHOENIX (Art Robbins Instruments, Inc). As construções Δ N25-*Tb*SPS2 e Δ N70-*Tb*SPS2 estavam à 10 mg/mL e a triagem foi realizada contra oito diferentes kits de cristalização: PEG suite, PEG suite II, pH clear I, pH clear II, Classic suite, Classic lite, Pro-Complex, JCSG.

4.1.2.2.2 Proteólise *in situ*

Já é bem estabelecido que domínios estáveis cristalizam mais rapidamente e frequentemente resultam em cristais que difratam melhor^{113,114,115}. A probabilidade de obter sucesso em experimentos de cristalização de proteínas são maiores quando proteínas são expressas em muitas variações. Estas variações incluem a expressão domínios mais estáveis da proteína, truncamento de poucos resíduos no N-terminal ou C-terminal, isto é, construções que diminuem a flexibilidade proteica, aumentam a estabilidade e conseqüentemente a chance de cristalização.

Para investigar quais são as regiões mais estáveis das *TbSPS2* e *LmSPS2* foi aplicada a estratégia de proteólise *in situ*. A proteólise *in situ* supera em eficácia a técnica de metilação de resíduos de lisina na superfície quando o objetivo é o resgate da cristalização. Estudos mostraram que metilação de lisina recuperou 6% de um conjunto de proteínas que não produzia cristais^{116,117}, por outro lado, proteólise *in situ* teve 14,5% de taxa de sucesso em resgatar proteínas que não tinham cristais ou possuíam cristais que difratavam pobremente, ou produzia dados de difração ruins. A abordagem de proteólise realizada no laboratório do Professor Doutor Tom Blundell (Universidade de Cambridge, Reino Unido) foi identificar qual a região clivada pela protease e realizar novas construções baseadas no truncamento dessa região. Isso foi feito para certificarmos de que está sendo produzida uma solução monodispersa protéica e não proteínas truncadas e não truncadas.

Após inúmeras tentativas não bem sucedidas de obter cristais da SPS2 de *Leishmania major* e cristais melhores da SPS2 de *Trypanosoma brucei*, foi utilizada a técnica de proteólise limitada. Novos ensaios de Proteólise *in situ* para as proteínas SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* foram realizados usando o kit *JBS Floppy-Choppy* (Jena Bioscience), o qual possui uma grande variedade de proteases para ensaios de proteólise (α -Quimotripsina, Tripsina, Subtilisina e Papaina). Concentrações diferentes de proteases foram testadas para gerar um fragmento estável e examinadas por gel de SDS-Page. As amostras nas quais obtivemos o melhor resultado já digeridas e aplicadas no gel SDS-Page foram transferidas para uma membrana de PVDF. O N-terminal foi sequenciado para determinação da região exata de clivagem. Assim, após o experimento de proteólise limitada e análise da região truncada por sequenciamento do N-terminal (degradação de Edman – instalação do

departamento de Bioquímica da universidade de Cambridge, Reino Unido) foram realizadas novas construções das selenofosfato sintetases.

4.1.2.2.1 Construções a partir da proteólise *in situ*

Os oligonucleotídeos foram construídos baseados no sequenciamento do N – terminal e na investigação das regiões truncadas impondo como restrição que a região a ser excluída não cortasse um elemento de estrutura secundária como α -hélice ou fita- β que foi predito. Os sítios de restrição utilizados foram *NdeI* e *XhoI* e os oligos foram construídos para clonagens em pET28a (com cauda de His no N- terminal) (construção A) e em pET20b (com cauda de His no C – terminal) (construção B). Assim, os oligos foram desenhados como mostrados na Tabela 17.

Tabela 17 - Desenho dos oligos para as diferentes construções planejadas a partir da proteólise *in situ*

Número de resíduos/ vetor	Oligo	Sequência (5' - 3')
46 resíduos/pET28a/ pET20b	<i>$\Delta 46$-TbSPS2 sense</i>	AGCATATGTGCCACAACCAGAACTTCTAGCACTTCTGC
46 resíduos/ pET28a	<i>$\Delta 46$-TbSPS2_R28</i>	AGCTCGAGTTAAATAATCTTATCATTTACCTTCGCTCCCACCTC
46 resíduos/ pET20b	<i>$\Delta 46$-TbSPS2_R20</i>	AGCTCGAGAATAATCTTATCATTTACCTTCGCTCCCACCTC
69 resíduos/peT28a/ pET20b	<i>$\Delta 69$-LmSPS2 sense</i>	AGCATATGTGCGCAACGCCTGGGCAGAAG
69 resíduos/ pET28a	<i>$\Delta 69$-LmSPS2_R28</i>	AGCTCGAGTCACACCTCCACAATTTTCATACCCGTC
69 resíduos/pET20b	<i>$\Delta 69$-LmSPS2_R20</i>	AGCTCGAGTCACACCTCCACAATTTTCATACCCGTC

Fonte: Elaborado pela Autora

4.1.2.2.1.1 Amplificação e clonagem das construções

As novas construções da SPS2 foram amplificadas pela reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) a partir do gene inteiro de cada organismo em pET28a e dos primers com sítio de restrição para as endonucleases *NdeI* e *XhoI* (Biolabs). A reação de amplificação das construções está descrita na Tabela 18.

Tabela 18 - Mistura da reação em Cadeia da DNA Polimerase

Mistura da Reação	Quantidade final da reação
Oligo da fita sense (Fermentas) [50 pmol]	[1 pmol] 1uL
Oligo da fita reverse (Fermentas) [50 pmol]	[1 pmol] 1uL
Template (SPS2 em pET28a)	1 uL
Tampão Taq Polimerase HiFi [10x] (Invitrogen)	[1x] 5 uL
MgSO ₄ [50 mM]	[1 mM] 1 uL
dNTPs [10 mM]	1 uL
Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen) [1 U/uL]	0,2 uL [0,2U]
H ₂ O	39,8 uL
Total	50 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

Os ciclos de amplificação das construções foram:

95°C por 2 minutos	} 30x
95°C por 30 segundos	
50°C por 30 segundos	
72°C por 2 min	
72°C por 10 min	

As construções amplificadas e já adeniladas foram ligadas ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega). A ligação do inserto ao vetor foi realizada obedecendo à proporção 3:1 (inserto: vetor), conforme descrito no manual do vetor pGEM-T. A reação de ligação foi incubada à 4 °C por 16 horas (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Reação de ligação do inserto ao vetor de clonagem pGEM – T

Mistura da Reação	Quantidade final da reação
Inserto	1,5 uL
pGEM – T (Promega) [50 ng/uL]	[25 ng] 0,5 uL
Tampão T4 DNA ligase [2x] (Promega)	[1x] 5 uL
T4 DNA ligase (Promega) [1 U/uL]	[1 U] 1 uL
H ₂ O	2 uL
Total	10 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

O produto da ligação em pGEMT foi transformada em células competentes de *E. coli* DH5 α . Após transformadas, as cepas de *E. coli*, selecionamos colônias de cada construção e fizemos o inóculo em 5 mL de meio LB contendo 100 μ g/mL ampicilina. Após uma noite de crescimento a 37 °C, a 250 rpm, 200 μ L de cultura foram estocados a -80°C. Do restante da cultura fez-se a extração do DNA plasmideal utilizando o kit “Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit” (Fermentas) para analisar se as colônias selecionadas adquiriram o plasmídeo recombinante. A verificação das colônias recombinantes foram realizadas pela análise de restrição do plasmídeo extraído utilizando enzimas *Nde* I e *Xho* I (Biolabs) que flanqueiam o gene (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Reação de digestão para análise das colônias recombinantes

Mistura da Reação de Digestão	Quantidade final da reação
Ligaçãox – pGEMT/ pET20b	40 uL
<i>Nde</i> I [20 U/uL] (Biolabs)	1 uL
<i>Xho</i> I [20 U/uL] (Biolabs)	1 uL
BSA [100x] (Biolabs)	1 uL
Tampão 2 [10x] (Biolabs)	5 uL
H ₂ O	2 uL
Total	50 uL

Fonte: Elaborado pela Autora

Após a clonagem no pGEM-T, prosseguimos apenas com as construções que obtivemos sucesso na subclonagem ao vetor de expressão (pET28a/ pET20b). Essa construção foi SPS2 de *Leishmania major* com 69 resíduos truncados N-terminalmente (Δ N-LmSPS2) resultando em massa molecular de 36,0 kDa.

O inserto Δ NN-LmSPS2 digerido do pGEM-T pelas enzimas de restrição *Nde* I (Biolabs) e *Xho* I (Biolabs) foi ligado ao vetor pET-28a(+) já linearizado (**Tabela 21**).

Tabela 21 - Reação de ligação do inserto ao vetor de expressão pET28a

Mistura da Reação	Quantidade final da reação
Inserto [28,8 ng/uL]	[40,32 ng] 1,40 μ L
pET28a (Novagen) [24 ng/uL]	[72 ng] 3,0 μ L
Tampão T4 DNA ligase [10x] (Fermentas)	[1x] 1,0 μ L
T4 DNA ligase (Fermentas) [1U/uL]	[1U] 1,0 μ L
H ₂ O	3,60 μ L
Total	60,0 μL

Fonte: Elaborado pela Autora

A reação de ligação foi incubada por 16 °C por 16 horas e posteriormente transformada em células *E. coli* DH5 α . Após transformada, colônias crescidas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 30 μ g/mL canamicina. Para análise dos transformantes, o plasmídeo foi extraído usando o kit “GeneJET Plasmid Miniprep” (Fermentas) e digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I (Biolabs).

4.1.2.2.1.2 Expressão e Purificação da Δ N69-LmSPS2

Depois da confirmação dos clones a partir do sequenciamento, as construções foram transformadas na linhagem de células competentes BL21 (DE3). Para expressão fez-se um pré-inóculo de 5mL contendo cepas BL21(DE3) transformadas com as construções e foram

cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250 rpm a 37 °C com seu respectivo antibiótico canamicina 30 µg/mL. Após as 14 horas de crescimento das células no meio de cultura, uma alíquota de 500 µL (1:100) de cada um dos pré-inóculos foi transferida para um erlenmeyer de LB contendo 30 µg/mL canamicina que ficou sob agitação de 200 rpm a 37 °C até atingir a D.O._{600nm} de aproximadamente 0,5, para adição de 1 mM de IPTG. Após a indução, as células foram mantidas à 20 °C por 12 h e alíquotas de 2, 4, 6 e 12 horas de indução foram retiradas para análise em gel de SDS-PAGE. Decorridas 12 horas, as células foram centrifugadas à 4000 rpm por 1 hora, para a separação do meio da massa celular, e posteriormente, o precipitado ressuspenso em tampão A (25 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl, 1mM β-mercaptoethanol, coquetel de inibidores de Protease (Roche)). As amostras foram sonicadas com 6 pulsos de 30 segundos cada com intervalos de 60 segundos utilizando o aparelho “550 Sonic Dismembrator” (Fisher Scientific). Após a lise, as células foram centrifugadas por 1 hora à 9 000 rpm (para remover o lixo celular), o sobrenadante foi inserido na coluna de afinidade (Níquel (GE Bioscience)). A proteína ligada na coluna foi eluída com um gradiente de 0-500 mM de imidazol.

As frações eluídas a partir da cromatografia por afinidade foram concentradas e aplicadas na coluna de Superdex 200 10/30 (Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada com o tampão A. O pico correspondente a eluição da proteína foi concentrado a 10 mg/mL usando filtro Millipore com corte de 30 kDa.

4.1.2.2.1.3 Ensaios de Cristalização ΔN69-*Lm*SPS2

Triagens de cristalização da proteína truncada ΔN69-*Lm*SPS2 foi realizado contra seis diferentes kits comerciais: Peg Suite, Peg Suite II, Classic I, Classic II, SaltRX e Classic Lite (QIAGEN). As proteínas estavam à 10 mg/mL e 15 mg/mL no tampão A. As gotas foram feitas a partir do método de difusão de vapor, gota apoiada, em placas de 96 poços usando o robô de cristalização Honeybee (Digilab). Cristais da ΔN-*Lm*SPS2 foram observados nas condições E9, F6 e H6 em PEG II suite; E9 do Classics lite, B5 do Classics II e G7 e G10 de SaltRX. Otimização de cada uma das condições foi realizada utilizando placas de 24 poços e o método de difusão de vapor técnica da gota suspensa com 1 µl de solução do poço

misturado com 1µl de solução de proteína à 10 mg/mL. Para melhoria dos cristais foram realizadas variações no pH do tampão, concentração de agente precipitante e concentração proteica.

4.1.2.2.2.1.4 Coleta de Dados de Difração de Raios X e Resolução da estrutura da Δ N69-*Lm*SPS2

Os cristais da Δ N69-*Lm*SPS2 foram resfriados e estocados em nitrogênio líquido depois de rápida transferência para solução crioprotetora consistindo da solução de cristalização e 25% de etilenoglicol (v/v). Dados de difração de raios X foram coletados em um comprimento de onda de 0,92 Å usando fonte de radiação Síncrotron na linha I04-1 do Diamond Light Source (DLS), Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, UK. Os dados de difração de raios X foram processados utilizando o programa MOSFLM¹¹⁸ e as intensidades escalonadas e reduzidas no programa SCALA¹¹⁹.

As fases da Δ N69-*Lm*SPS2 foram determinadas através do método de substituição molecular usando o programa PHASER¹²⁰. O modelo de busca foi à estrutura da SPS1 humana (PDB entry 3FD5⁷⁹) a qual compartilha aproximadamente 40% de identidade sequencial com a Δ N69-*Lm*SPS2. Após a substituição molecular, foi feito refinamento de corpo rígido, anelamento simulado utilizando o programa PHENIX¹²¹. Foram realizados ciclos alternados de refinamento no espaço real (modificações manuais do modelo através da análise dos mapas de densidade eletrônica usando a visualização gráfica do programa COOT¹²²) e no espaço recíproco para o refinamento de posições atômicas, restrições geométricas e de contato, refinamento de fator de temperatura isotrópico individual para todos os átomos e minimização de função de energia e TLS (“*Translation/ Libration/Screw*”) pelo programa PHENIX¹²¹. O bom acordo do modelo gerado a cada ciclo de refinamento com os dados experimentais foi checado pela observação da variação e coerência dos valores de R_{work} e R_{free} . O refinamento deu-se por encerrado quando não foi mais possível a melhora dos valores de R-factor, R-free e estes assumiram valores compatíveis com a resolução da estrutura.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Cristalização Inicial da SPS2 de *Trypanosoma brucei*, coleta de dados de difração de Raios X

Cristais da SPS2 de *T. brucei* na forma apo foram obtidos e otimizados. Os melhores cristais cresceram a 18 °C em uma solução contendo: 0,1 M Tri-citrato de sódio (pH 5,6) e 17% Peg 3350 (Figura 39 A). Co-cristais da SPS2 de *T. brucei* em complexo com AMPCPP foram também obtidos, em uma solução contendo 0,02 M Tri-citrato de sódio, 12% Peg 6000, pelo método de difusão de vapor, gota pendurada (Figura 39 B).

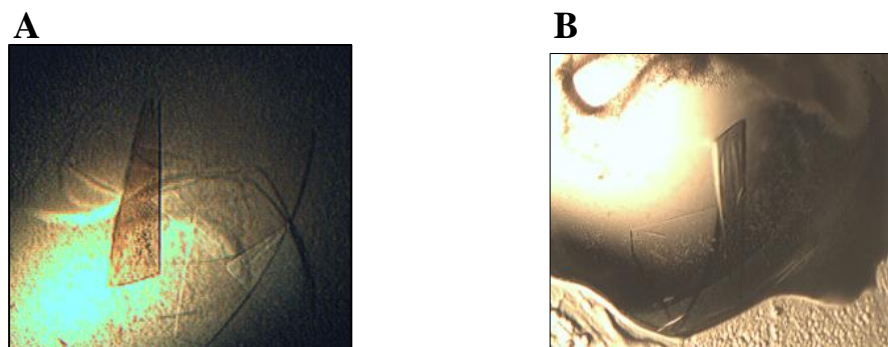


Figura 39 - Cristais de SPS2 de *T. brucei*: (A) Apo: 0,1M Tri – citrato de sódio (pH 5,6), 17% Peg 3350. (B) em complexo com AMPCPP e $MgCl_2$ – 0,02M Tri-citrato de sódio, 12% Peg 6000.

Fonte: Elaborado pela Autora

Cristalização da SPS2 de *T. brucei* foi realizada usando método de *microbatch* em óleo de parafina. SPS2 de *T. brucei* estava a 10 mg/mL nas condições na qual foram obtidos os cristais iniciais: 0,1M Tri – citrato de sódio (pH 5,6), 17% Peg 3350. Os melhores cristais cresceram após uma semana (Figura 40 A e B).

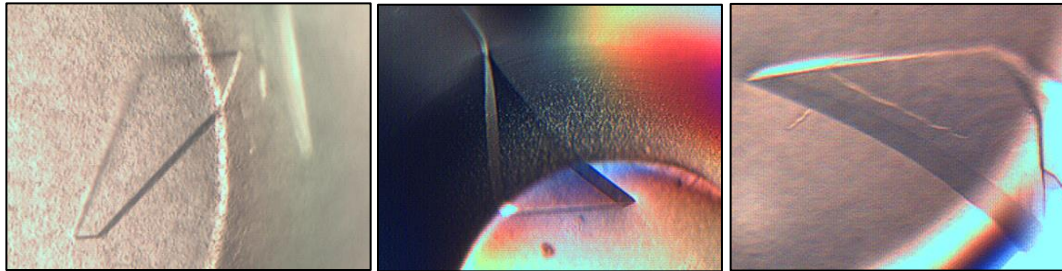
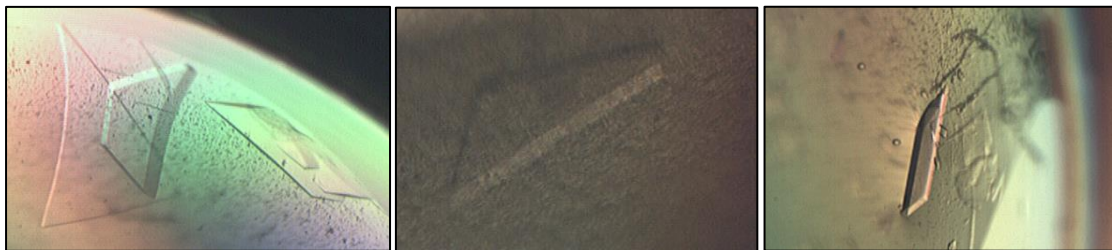
A**B**

Figura 40 - Cristais da SPS2 de *T. brucei* na forma apo (**A**) e em complexo com AMPCPP (**B**) obtidos usando a técnica de *microbatch*.

Fonte: Elaborado pela Autora

A Figura 41 mostra a melhor condição na qual foram obtidos os cristais a partir do método de *seeding* automatizado, entretanto este método não forneceu cristais melhores do que o método de *microbatch*.

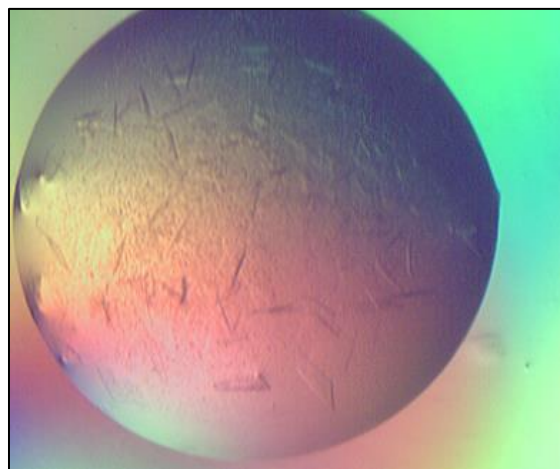


Figura 41- Cristais da SPS2 de *T. brucei* obtidos por *microseeding* automatizado

Fonte: Elaborado pela Autora

Os melhores cristais da SPS2 de *T. brucei* foram submetidos ao experimento de difração de raios X e difrataram mal, eram anisotrópicos e o padrão de difração apresentava característica de padrão de difração de múltiplos cristais (Figura 42). Foi possível indexar somente um conjunto de dados (proteína na forma apo) usando o iMOSFLM¹¹⁸. O escalonamento dos dados foi realizado pelo Scala¹¹⁹. Através da análise de ausências sistemáticas vimos que não tinha informação em l, somente em h e k, assim o grupo espacial não foi definido corretamente. Os dois possíveis grupos espaciais foram $P2_12_12_1$ ou $P2_12_12$. Assim, na busca das fases pelo método de substituição molecular não foi possível encontrar uma solução, o valor do LLG (“log-likelihood-gain”) do programa PHASER¹²³ resultou em valores negativos o que indica que a solução correta não foi encontrada na substituição molecular. As estatísticas dos dados nos dois grupos espaciais estão mostradas na **Tabela 22**.

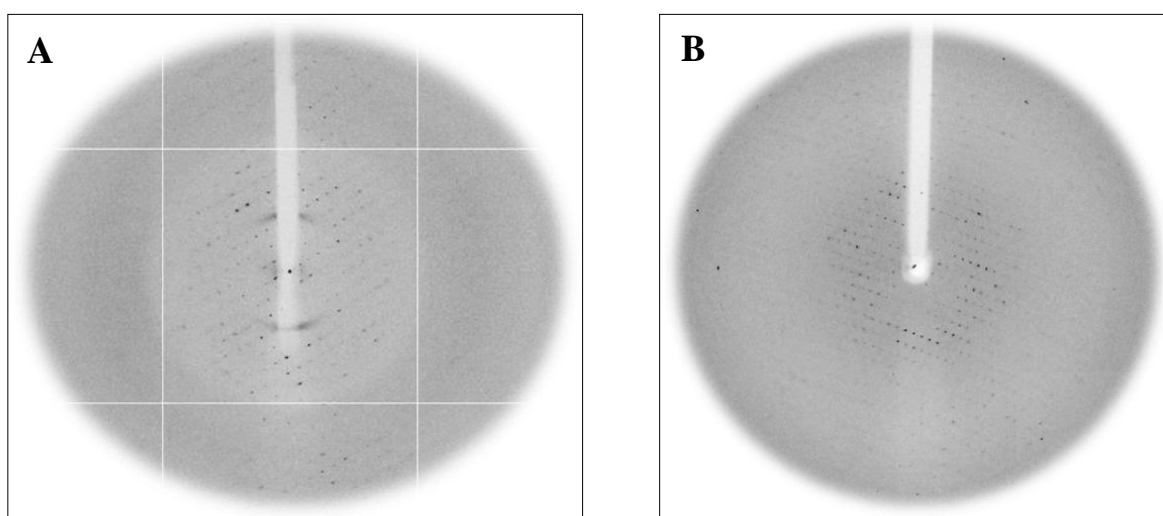


Figura 42 - Padrão de Difração para SPS2 de *T. brucei*: (A) Apo. (B) em complexo com AMP-PCP: MgCl₂
Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 22- Estatística da Coleta e Processamento dos Dados de Difração de Raios X para o cristal de SPS2 de *T. brucei* em dois grupos espaciais

Processamento	1	2
Grupo Espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2
Dimensões de cela unitária		
a (Å)	66,86	66,86
b (Å)	100,15	100,02
c (Å)	166,95	166,71
α, β, γ (°)	$\alpha = \beta = \gamma = 90$	$\alpha = \beta = \gamma = 90$
Resolução (Å)	66,9 - 3,5	66,9 - 3,5
Reflexões únicas	13205	13481
Completeza^a (%)	92,4 (96,3)	90,5 (96,8)
Redundância^b	3,2 (3,2)	3,4 (3,4)
Média de I/σ(I)^c	19,5 (1,9)	15,3 (1,7)
R_{merge}^y (%)^d	4,0 (58,1)	6,4 (65,4)

^a Completeza na camada a alta resolução está listada dentro do parênteses.

^b Redundância dos dados na camada a alta resolução está mostrada dentro do parênteses.

^c $\langle I/\sigma \rangle$ na camada a alta resolução esta listada no parênteses.

^d $R_{merge} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum I$, onde I é a intensidade observada da reflexão. Rmerge a alta resolução está listada no parênteses.

Fonte: Elaborado pela Autora

Tal resultado levou à busca pela melhoria da difração e qualidade dos cristais obtidos até então. Assim, foram abordados métodos pós-cristalização e pré-cristalização.

4.2.2 Métodos pós-cristalização da SPS2 de *T. brucei*

Os métodos pós-cristalização utilizados para aumento da qualidade de difração como: *annealing*, desidratação química, *cross-linking* falharam. Por outro lado, o método de desidratação com umidade relativa controlada resultou em uma melhoria notável na difração. Essa melhoria foi observada quando era aplicado em torno de 85% umidade relativa (UR) com o cristal na posição de 90 ° (Figura 43).

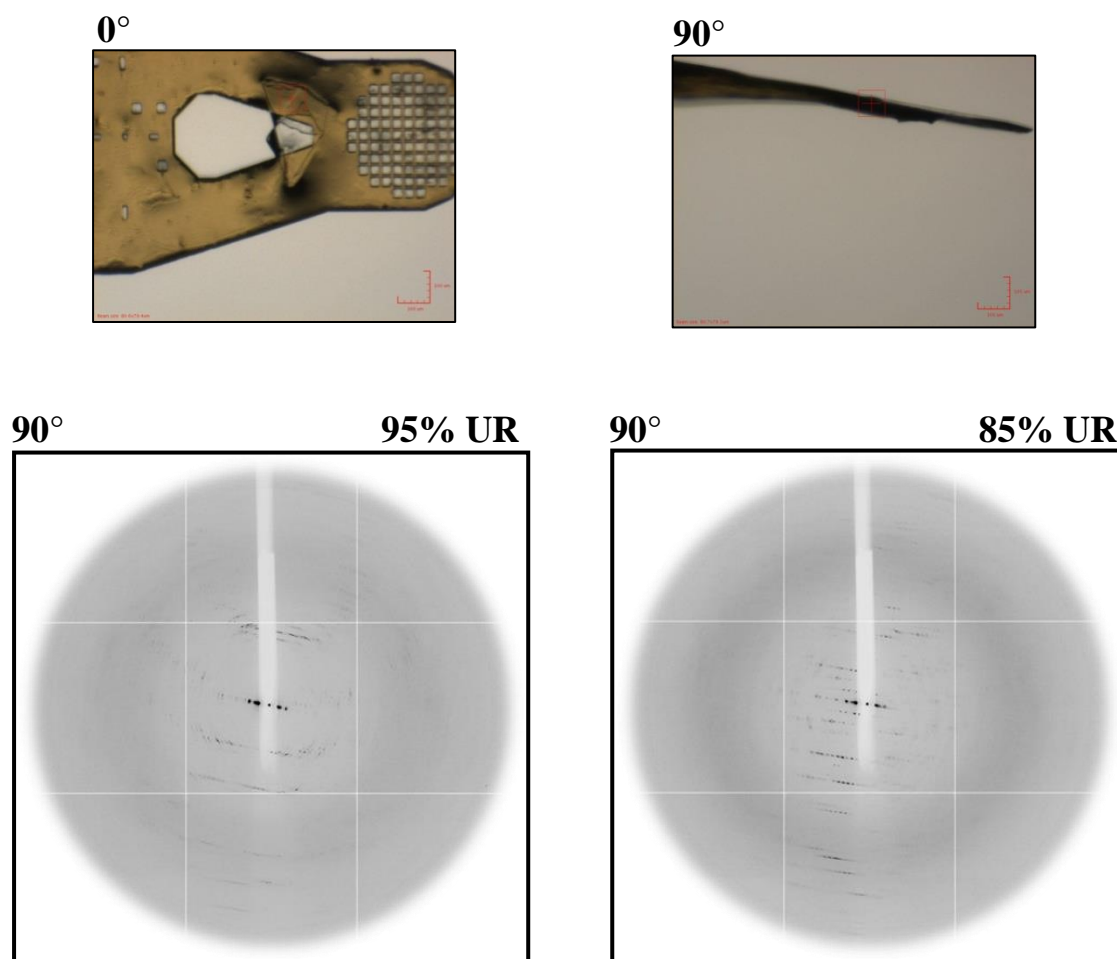


Figura 43 - (A) Posição relativa do eixo dos cristais em relação ao feixe de raios X. (B) Padrão de difração depois de aplicar a desidratação com umidade relativa controlada. Houve uma melhora na qualidade dos dados quando aplicada 85% de umidade relativa. Essa melhora pode ser visualizada nessas imagens quando comparamos 95% e 85% de umidade relativa com o cristal na posição de 90° onde a difração é mais crítica devido à anisotropia do cristal.

Fonte: Elaborado pela Autora

Visto que os cristais difrataram melhor aplicando 85% de UR em temperatura ambiente, foi iniciada a coleta de dados nestas condições. Foram coletadas 40 imagens, após isso o cristal parou de difratar. Não foi possível indexar os dados com somente 40 imagens, assim com o objetivo de obter uma coleta de dados completa após desidratar os cristais (85% de RH), os mesmos foram congelados a 100 K. Entretanto, após a desidratação seguida de congelamento, os cristais perderam o poder de difração.

Como os métodos utilizados de pós-cristalização da SPS2 de *T. brucei* não renderam melhora na difração, assim, foram aplicadas estratégias pré-cristalização.

4.2.3 Métodos pré-cristalização da SPS2 de *T. brucei*

Foi realizada a análise inicial de regiões em desordem na proteína *TbSPS2* a partir de sua sequência de aminoácidos e utilizando o programa *DISOPRED server*¹¹². Os resultados indicam uma região desordenada correspondente aos 25 resíduos iniciais do N-terminal e uma outra região de menor desordem correspondente a 6 resíduos finais do C-terminal (Figura 44 **A**).

Além disso, na primeira substituição molecular, vimos que os 70 resíduos iniciais não tinham densidade eletrônica, mesmo após ciclos de refinamento e, portanto, possivelmente corresponderia a uma região flexível da proteína. Nós analisamos, a partir dos modelos obtidos por modelagem por homologia que as regiões a serem truncadas (25 e 70 resíduos iniciais) não interromperia uma estrutura secundária (α -hélice, fita β) (Figura 44 **B**).

Assim, nós realizamos duas novas construções para a proteína *TbSPS2* truncada no N-terminal em 25 resíduos (Δ N25-*TbSPS2*) e 70 resíduos (Δ N70-*TbSPS2*).

4.2.3.1 Novas construções da SPS2 de *T. brucei*

4.2.3.1.1 Amplificação e Clonagem das novas construções de *T. brucei*

Os genes correspondentes às construções Δ N25-*TbSPS2* e Δ N70-*TbSPS2* foram amplificados como mostrados na Figura 45.

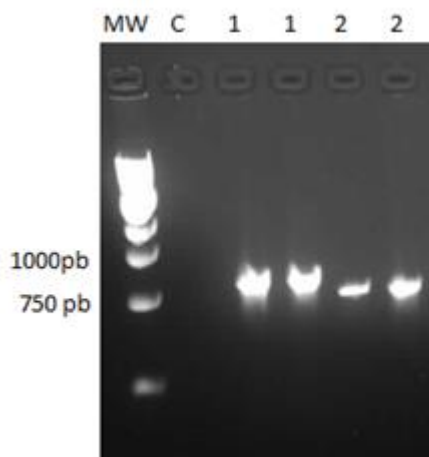


Figura 45 - Amplificação da construção Δ NN25-*TbSPS2* e Δ NN70-*TbSPS2* visualizado em gel de agarose 1%. MW - padrão de massa molecular “*Gene Ruler 1Kb DNA Ladder*” (Fermentas); C – Controle negativo; 1 e 2 – Construção Δ NN25-*TbSPS2* e Δ NN70-*TbSPS2* amplificada, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela Autora

Após a purificação do inserto este foi clonado ao vetor de clonagem pGEM-T e subclonado ao vetor de expressão pET-20b(+) e posteriormente transformados em células de *E.coli* competentes. A análise das colônias recombinantes para verificar se receberam o plasmídeo recombinante pGEMT foi determinada pela análise de restrição do plasmídeo

extraído utilizando enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I (Biolabs) que flanqueiam o gene. A mesma análise foi realizada para verificar se as colônias recombinantes receberam o plasmídeo recombinante pET28a. Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1% (Figura 46).

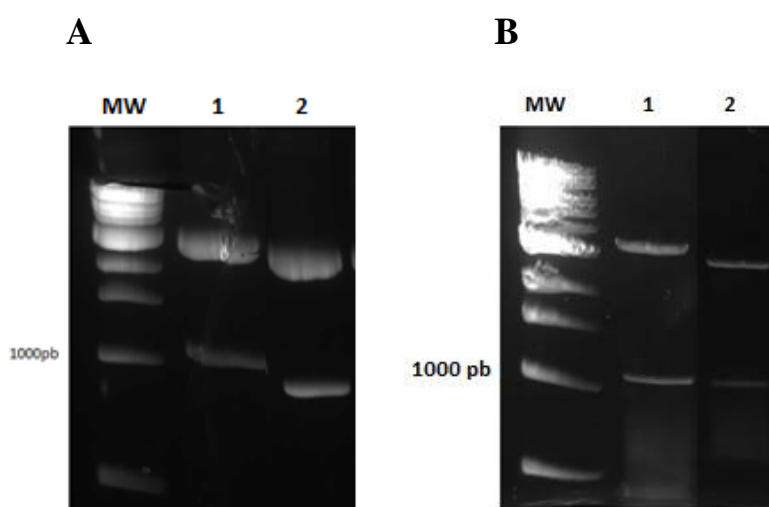


Figura 46 - Caracterização do transformante: (A) pGEMT- Δ N25-*TbSPS2* e pGEMT- Δ N70-*TbSPS2*. (B) pET20b- Δ N25-*TbSPS2* e pET20b- Δ N70-*TbSPS2* visualizado em gel de agarose 1% e TAE [1x] corado com brometo de etídeo. MW- padrão de massa molecular “*Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*” (Fermentas); colunas 1 e 2: pGEM-T/pET20b extraído e digerido com liberação do inserto da construção Δ N25-*TbSPS2* e Δ N70-*TbSPS2*, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela Autora

4.2.3.1.2 Expressão e Purificação das novas construções da SPS2 de *T. brucei*

Células de *E. coli* da cepa BL21(DE3) transformadas com as construções recombinantes pET20b- Δ N25-*TbSPS2* e pET20b- Δ N70-*TbSPS2* foram inoculadas em 1 L de meio de cultura LB e induzidas a expressar a proteína SPS2 de *T. brucei* a 37 °C até a DO_{600nm} 0,5 e induzidas com a adição de 1 mM de IPTG, colocadas a 20 °C a 150 rpm por 12 horas. As amostras das construções Δ N25-*TbSPS2* e Δ N70-*TbSPS2* expressas em sua fração solúvel foram submetidas à purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel. As construções eluídas da resina com um gradiente crescente de imidazol podem ser visualizadas em um gel SDS-Page 15% como na Figura 47.

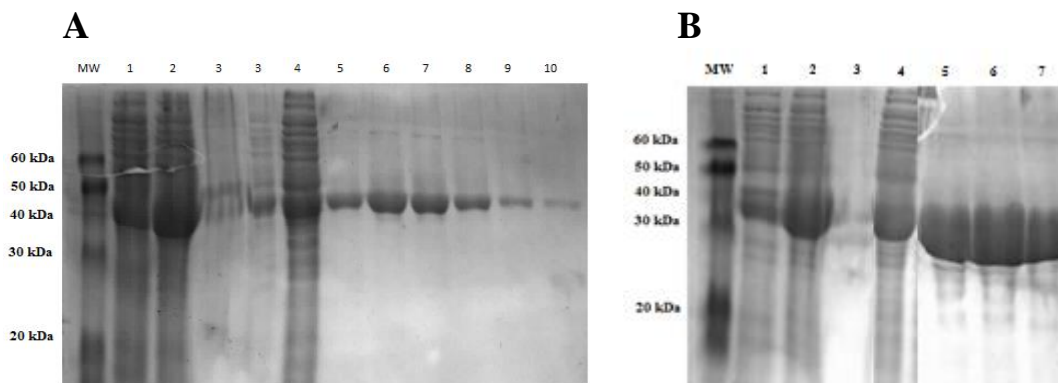


Figura 47- Gel SDS – Page da expressão e da purificação por cromatografia de afinidade. **(A)** Construção $\Delta N25-TbSPS2$; **(B)** Construção $\Delta N70-TbSPS2$. MW - Padrão de massa molecular; 1: Antes da indução; 2: Depois da indução com 1 mM IPTG; 3: Fração insolúvel; 4: Sobrenadante e entrada na coluna; **(A)** 5 -10: Frações eluídas a partir do gradiente de imidazol. **(B)** 5 –7: Frações proteicas eluídas a partir do gradiente de imidazol.

Fonte: Elaborado pela Autora

A próxima etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular foi realizada em coluna Superdex 200 16/60 (GE). O resultado está mostrado a seguir (Figura 48).

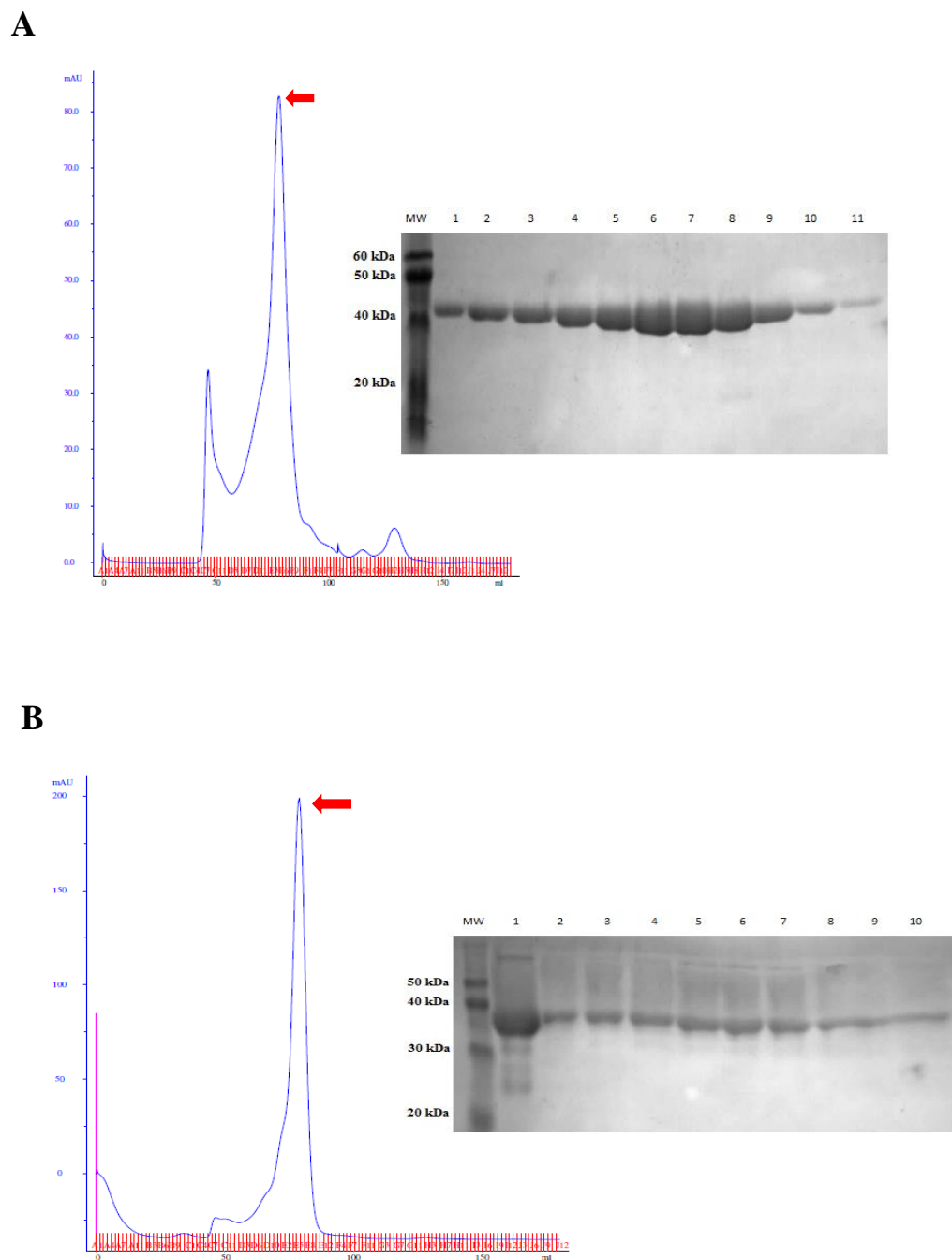


Figura 48 - Perfil Cromatográfico e gel de SDS–Page da purificação por cromatografia de exclusão molecular (A) Construção $\Delta N25$ -TbSPS2 (B) Construção $\Delta N70$ -TbSPS2 MW: Padrão de massa molecular; 1-11 e 1-10: Frações de proteína eluída correspondente ao pico majoritário (indicado pela seta vermelha).

Fonte: Elaborado pela Autora

4.2.3.1.3 Ensaio de Cristalização das construções da SPS2 de *T. brucei*

Foram rastreados um total de 768 condições nos testes de cristalização das construções $\Delta N25$ -*Tb*SPS2 e $\Delta N70$ -*Tb*SPS2. Entretanto, nenhum cristal ou indicio de cristal foi observado. Devido a isto, novos experimentos de proteólise *in situ* foram iniciados com intuito de determinar exatamente as regiões móveis que podem estar impedindo a formação dos contatos cristalinos.

4.2.3.2 Proteólise *in situ* da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*

A técnica de proteólise *in situ* é considerada a mais eficaz no resgate de proteínas que não cristalizam. Essa abordagem foi empregada para a SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major*. O kit de proteases (α -Quimiotripsina, Tripsina, Subtilisina e Papaina) JBS Floppy-Choppy (Jena Bioscience) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. O melhor resultado foi encontrado utilizando α -quimiotripsina incubada com 5 mg/mL de SPS2 de *L. major* e SPS2 de *T. brucei* na razão de α -quimiotripsina: SPS2 de 1:50 (w/w) por 20 minutos a temperatura de 18 °C em tampão e os fragmentos gerados foram analisados em gel SDS-PAGE.

O melhor resultado, o qual a protease gerou uma parte estável da proteína por clivar a região flexível está representado na Figura 49 A e Figura 50 A. A região estável foi sequenciada N-terminalmente (Figura 49 B e Figura 50 B) e uma análise visual do fragmento truncado foi feita pelo modelo obtido a partir da modelagem por homologia (Figura 49 C e Figura 50 C).

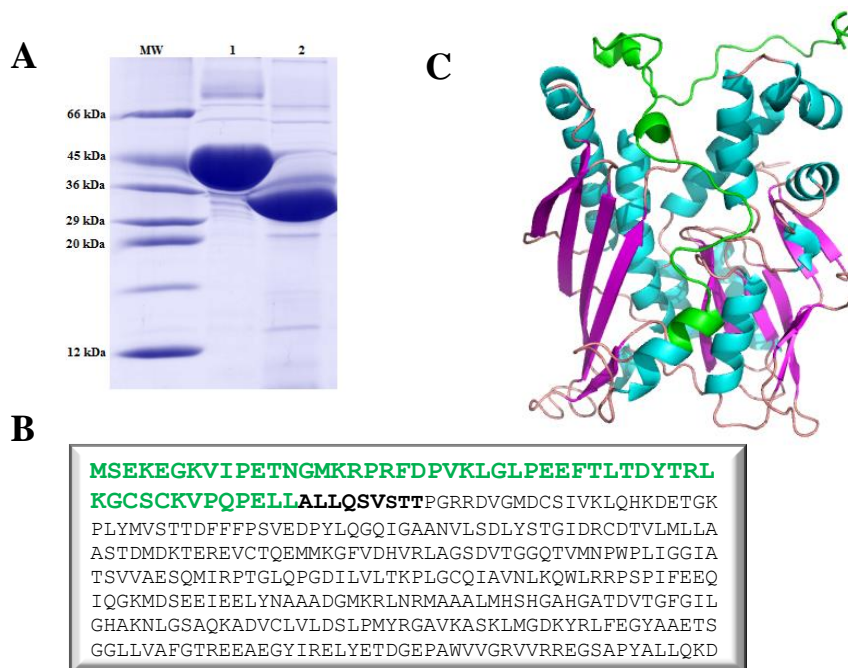


Figura 49 - Proteólise *in situ* da SPS2 de *T. brucei* usando a protease α -quimotripsina. **(A)** Gel de SDS - Page: MW – padrão de massa molecular; 1-SPS2 de *T. brucei* antes de clivar; 2-SPS2 de *T. brucei* depois de clivar com α -quimotripsina. **(B)** Sequência da proteína com o sequenciamento do N-terminal da proteína após clivagem em negrito e região perdida pela clivagem em verde. **(C)** Modelo estrutural por homologia mostrando em verde a região correspondente a que foi clivada pela α -quimotripsina.

Fonte: Elaborado pela Autora

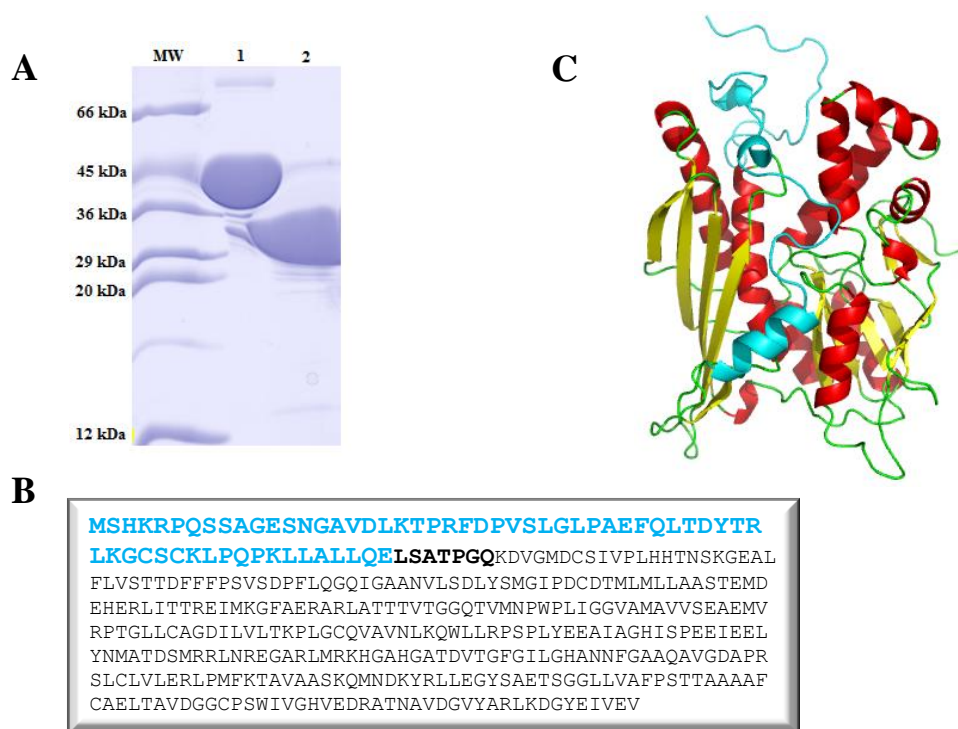


Figura 50 - Proteólise *in situ* da SPS2 de *L. major* usando a protease α -quimotripsina. (A) Gel de SDS - Page: MW – padrão de massa molecular; 1 - SPS2 de *L. major* antes de clivar; 2 - SPS2 de *L. major* depois de clivar com α -quimotripsina. (B) Sequencia da proteína com o sequenciamento do N-terminal da proteína após clivagem em negrito e região perdida pela clivagem em azul. (C) Modelo estrutural por homologia mostrando em azul a região que foi clivada pela α -quimotripsina.

Fonte: Elaborado pela Autora

Assim, novas construções de *TbSPS2* retirando 46 resíduos iniciais e *LmSPS2* sem os primeiros 69 resíduos com a cauda de histidina no N-terminal e (pET28a) e no C-terminal (pET20a) foram iniciadas.

4.2.3.2.1 Amplificação e Clonagem das construções de SPS2 de *T. brucei* e *L. major* a partir da proteólise *in situ*

Os genes foram amplificados pela reação em cadeia da DNA-Polimerase. As construções amplificadas podem ser visualizadas em gel de Agarose 1% (Figura 51).

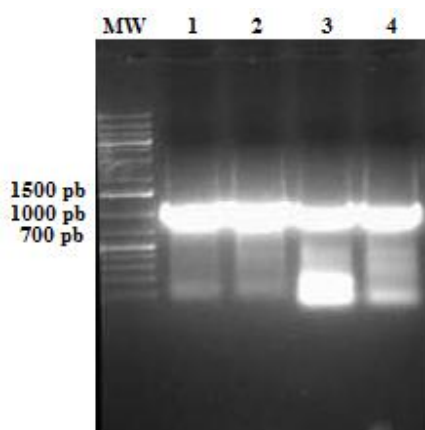


Figura 51 - Amplificação das construções da SPS2 de *T. brucei* e *L. major* visualizado em gel de agarose 1%. MW - padrão de massa molecular “Gene Ruler 1Kb DNA Ladder” (Fermentas). 1 e 2 - Construção 1 e 2 da SPS2 de *T. brucei*, respectivamente; 3 e 4 - Construção 1 e 2 da SPS2 de *L. major*, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela Autora

O inserto amplificado e adenilado foi purificado do gel e ligado ao vetor pGEM-T. As análises das colônias recombinantes foram realizadas pela digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Figura 52).

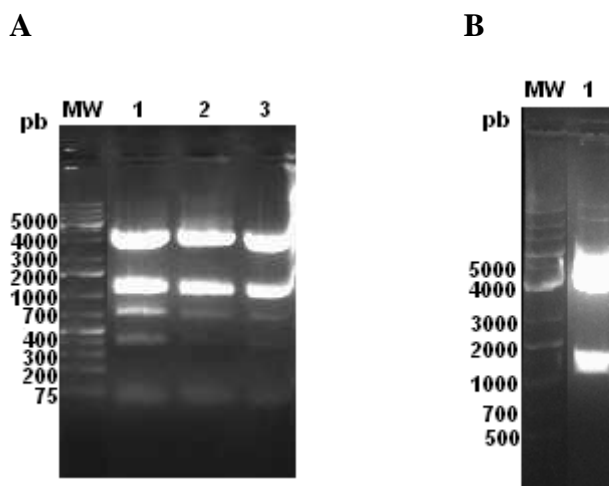


Figura 52 - Caracterização dos transformantes pGEMT-construções das selenofosfato sintetases visualizados em gel de agarose 1% e TAE [1x] corado com brometo de etídeo. MW- padrão de massa molecular “Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder” (Fermentas); (A) 1 - pGEM-T extraído e digerido, com liberação do inserto da construção 1 da SPS2 de *T. brucei*; 2 e 3 - Liberação do inserto da construção 1 e 2 da SPS2 de *L. major*. (B) 1- Liberação do inserto da construção 2 da SPS2 de *T. brucei*.

Fonte: Elaborado pela Autora

Após isso, as construções foram subclonadas em vetor de expressão pET28a e pET20b. Porém, somente a subclonagem da Δ NN69-*LmSPS2* em pET28a funcionou (Figura 53).

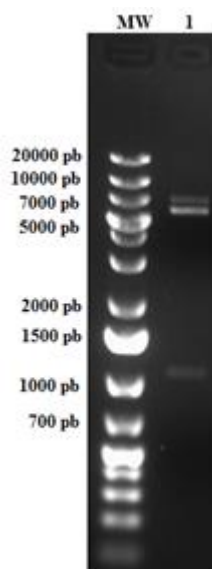


Figura 53 - Análise do transformante pET28a- Δ N69-*LmSPS2* visualizado em gel de agarose. MW- padrão de massa molecular “Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder” (Fermentas); coluna 1: pET28a extraído e digerido com liberação do inserto da Δ N69-*LmSPS2* em pET28a (69 primeiros resíduos truncados).

Fonte: Elaborado pela Autora

Assim, os experimentos de cristalização foram conduzidos com a construção Δ N69-*LmSPS2*.

4.2.3.2.2 Expressão e Purificação da Δ N69-*LmSPS2*

A proteína Δ N69-*LmSPS2* foi expressa e purificada nas mesmas condições da *SPS2* de *L. major* inteira (Capítulo 2). O gel de SDS-PAGE (15%) da expressão e das frações eluídas da última etapa de purificação da Δ N69-*LmSPS2* estão mostrados nas Figura 54 e Figura 55, respectivamente. O pico correspondente a eluição da proteína foi concentrado a 10 mg/mL usando filtro Millipore para realização dos experimentos de cristalização de raios X.

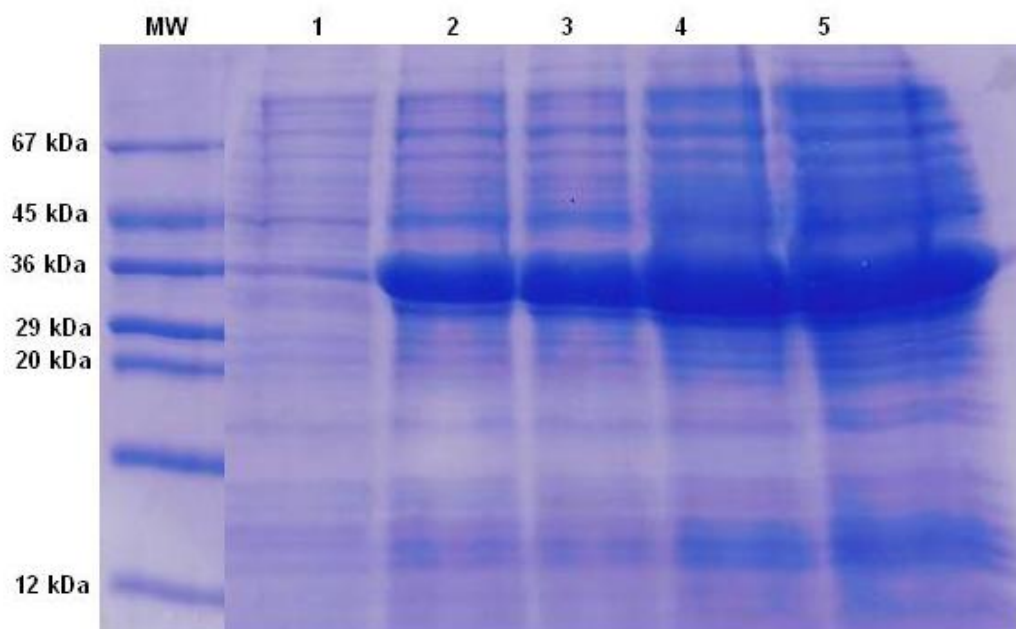


Figura 54 - Gel SDS – Page da expressão da $\Delta N69$ -LmSPS2. MW - Padrão de massa molecular; 1: Antes da indução; 2, 3, 4 e 5: Depois de 2, 4, 6 e 12 horas de indução com [1mM] IPTG.

Fonte: Elaborado pela Autora

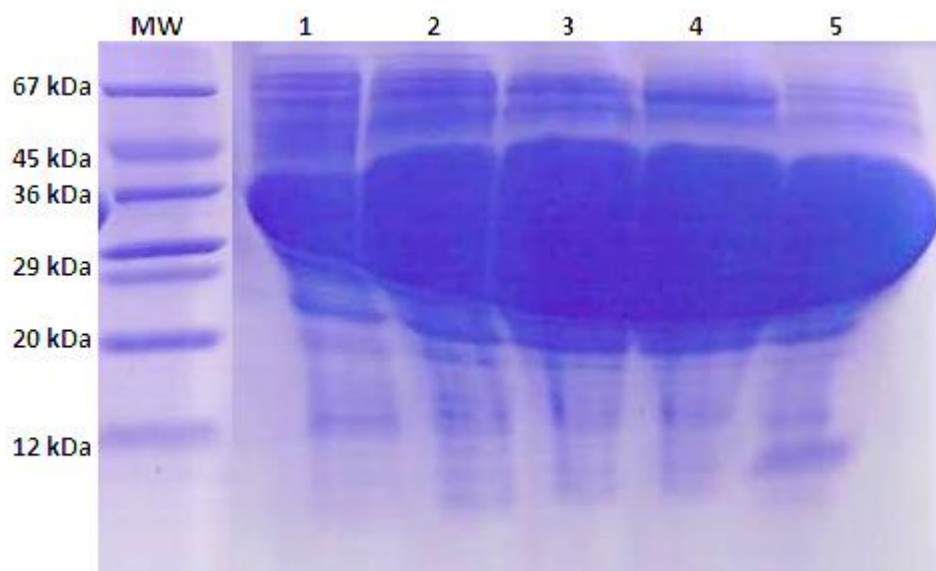


Figura 55 - Gel SDS-Page da purificação da $\Delta N69$ -LmSPS2 por cromatografia de exclusão molecular. MW - Padrão de massa molecular. 1 a 5: Frações correspondentes ao pico majoritário eluído da coluna de exclusão de tamanho.

Fonte: Elaborado pela Autora

4.2.3.2.3 Cristalização da construção truncada $\Delta N69-LmSPS2$

Os melhores cristais da $\Delta N69-LmSPS2$ cresceram a 18 °C em uma condição contendo: 0,1M de Tri-citrato de sódio (pH 5,2); 0,2 M de sulfato de amônio e 21% PEG 4000 (w/v) (Figura 56).

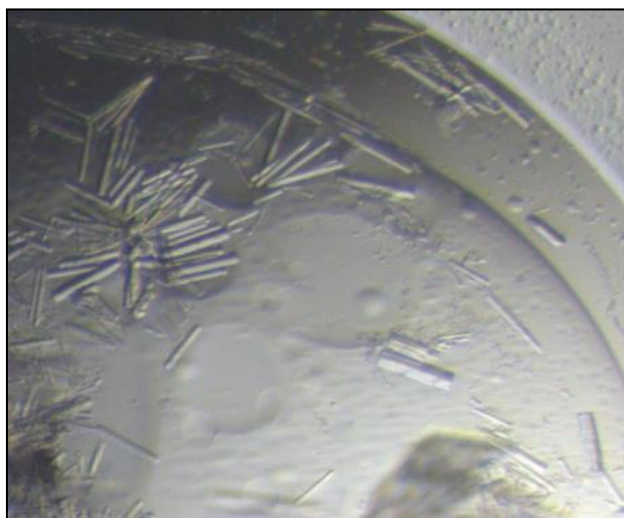


Figura 56 - Cristais da $\Delta N69-LmSPS2$ observados depois de três dias em uma condição consistindo de 0,1M Tri-citrato de sódio (pH 5,2); 0,2 M de sulfato de amônio e 21% de PEG 4000 (w/v).

Fonte: Elaborado pela Autora

Dados de difração de raios X foram coletados em um comprimento de onda de 0,92 Å usando fonte de radiação Síncrotron na linha I04-1 do Diamond Light Source (DLS), Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, UK. Foram coletadas 600 imagens com tempo de exposição de 0,3 s por imagem, ângulo de oscilação de $\Delta\varphi = 0,25^\circ$ e distância do cristal ao detector de 237 mm. Os dados foram processados utilizando o programa MOSFLM¹¹⁸ e as intensidades escalonados e reduzidas no programa SCALA¹¹⁹. O cristal da construção $\Delta N69-LmSPS2$ difratou a 1,9Å e pertence ao sistema cristalino ortorrômbico com parâmetros de cela unitária de $a=55,95\text{Å}$; $b=81,69\text{Å}$; $c=177,92\text{Å}$; $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$. O cristal montado no *loop* e o padrão de difração obtido estão mostrados na Figura 57.

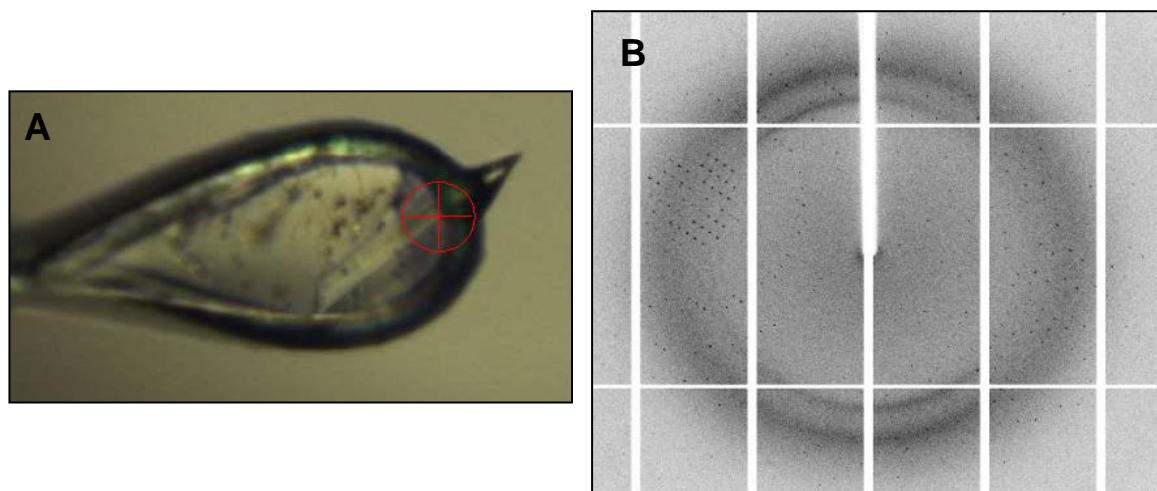


Figura 57 - Cristal da $\Delta N69$ -*LmSPS2* montado no *loop* para o experimento de difração de raios X. **(B)** Uma das imagens do padrão de difração a $1,9\text{\AA}$ obtido a partir do cristal **(A)**.

Fonte: Elaborado pela Autora

Os valores finais de R_{work} e R_{free} foram de 0,17% e 0,21%, respectivamente. A qualidade estereoquímica das estruturas foi checada pelo programa Molprobit¹²⁴ e o ramachandran gerado pelo Procheck⁷¹. Os resultados cristalográficos desde a estatística da coleta de dados até a determinação da estrutura cristalográfica da $\Delta N69$ -*LmSPS2* estão sumarizados na **Tabela 23** e a Figura 58 mostra o Ramachandran do modelo final.

Tabela 23 - Estatística da coleta de Dados e resolução da estrutura da $\Delta N69$ -LmSPS2. Valores entre parênteses são para faixa a mais alta resolução.

$\Delta N69$-LmSPS2	
Parâmetros do Cristal	
Grupo Espacial	I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Nº de moléculas / ASU	1
Parâmetros da cela unitária (Å, °)	a=55,95; b=81,69; c=177,92 $\alpha=90, \beta=90, \gamma=90$
Conteúdo de Solvente (%)	57,21
V _m (Å ³ Da ⁻¹)	2,87
Processamento dos dados	
Resolução (Å)	40,97 – 1,88 (1,98 – 1,88)
*Rmerge (%)	10,8 (68,7)
I/sigma(I)	11,4 (2,8)
Nº de reflexões unicast	33416 (4849)
Multiplicidade	5,0 (5,2)
Completeza (%)	97,7 (99,9)
Refinamento	
Resolução (Å)	40,97 – 1,88
**Rwork (%)	17,33
***Rfree (%)	20,78
Estereoquímica R.m.s.d	
Comprimentos de ligação (Å)	0,007
Ângulos de Ligação (°)	1,098
Nº de átomos da proteína	2437
Nº de moléculas de água	293
Nº de moléculas de sulfato	1
****Fator - B médio (Å ²)	
Proteína	25,885
Sulfato	46,512
Águas	37,742

* $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{\mathbf{h}} \sum_i |I_i - \langle I \rangle|}{\sum_{\mathbf{h}} \sum_i \langle I_i \rangle}$, onde I_{hl} é a intensidade medida i^{th} da reflexão \mathbf{h} e $\langle I \rangle$ são as intensidades médias a partir de múltiplas observações.

**Rwork = 100 x $\frac{\sum(|F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|)}{\sum(F_{\text{obs}})}$, soma obtidas sobre todas as reflexões com corte de $F/\sigma(F) > 2$.

***R-free = R-factor para 5% dos dados, os quais não foram incluídos no refinamento

****Fator B = valores médios de vibração térmica para átomos não hidrogênicos

Fonte: Elaborado pela Autora

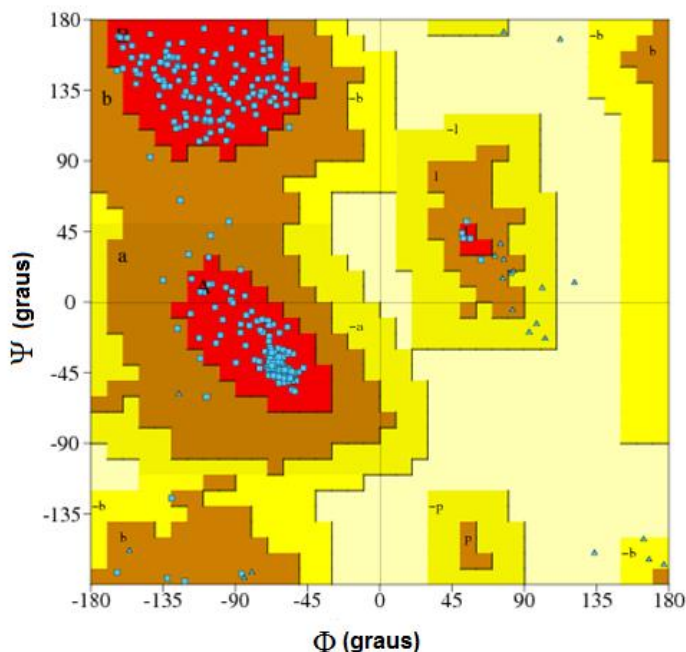


Figura 58 - Diagrama de Ramachandran do modelo cristalográfico final da $\Delta N69$ -*LmSPS2*. É avaliada a qualidade da estrutura através da combinação dos ângulos torsionais diédricos (Ψ e Φ). O resultado indica que 98,78% dos resíduos estão em regiões mais favoráveis (em vermelho), 1,22% em regiões permitidas (em bege) e nenhum resíduo se encontra em regiões generosamente permitida (em amarelo) e desfavorável (em bege claro).

Fonte: Elaborado pela Autora

4.2.3.2.4 A Estrutura Cristalográfica da $\Delta N69$ -*LmSPS2*

A **Figura 59** mostra o modelo cristalográfico da $\Delta N69$ -*LmSPS2*. O modelo final apresenta os resíduos 70-398, 1 molécula sulfato e 293 moléculas de água e consiste de um monômero na unidade assimétrica. O monômero é composto de dois domínios: N-domínio e C-domínio (**Figura 59**) e adota um enovelamento do tipo α/β . O domínio N contém uma folha β composta por 5 fitas $\beta 1\downarrow$, $\beta 2\uparrow$, $\beta 5\downarrow$, $\beta 3\uparrow$, $\beta 4\uparrow$ flanqueadas por 2 α -hélices e uma pequena hélice 3/10 (resíduo 125 – 128). O domínio C tem 7 fitas β : $\beta 7\uparrow$, $\beta 9\downarrow$, $\beta 6\uparrow$, $\beta 10\downarrow$, $\beta 8\uparrow$, $\beta 11\uparrow$, $\beta 12\uparrow$ que estão circundadas dos dois lados por 7 α -hélices e 1 hélice 3/10 (resíduo 162 – 169) (**Figura 59**). A porcentagem de cada estrutura secundária está esquematizada na **Tabela 24**. Os dados estão em bom acordo quando comparados com os resultados obtidos de estrutura secundária pela deconvolução do espectro de CD da *LmSPS2* inteira (**Tabela 24**). As diferenças nos valores estão dentro do esperado visto que a medida de CD não alcançou todo o espectro (180-260 nm) e a estrutura $\Delta N69$ -*LmSPS2* está truncada em 69 resíduos que

correspondem majoritariamente de regiões não estruturadas (outras da **Tabela 24**). A partir de operações de simetria no servidor PISA¹²⁵ foi possível gerar o homodímero a partir do monômero (**Figura 60**).

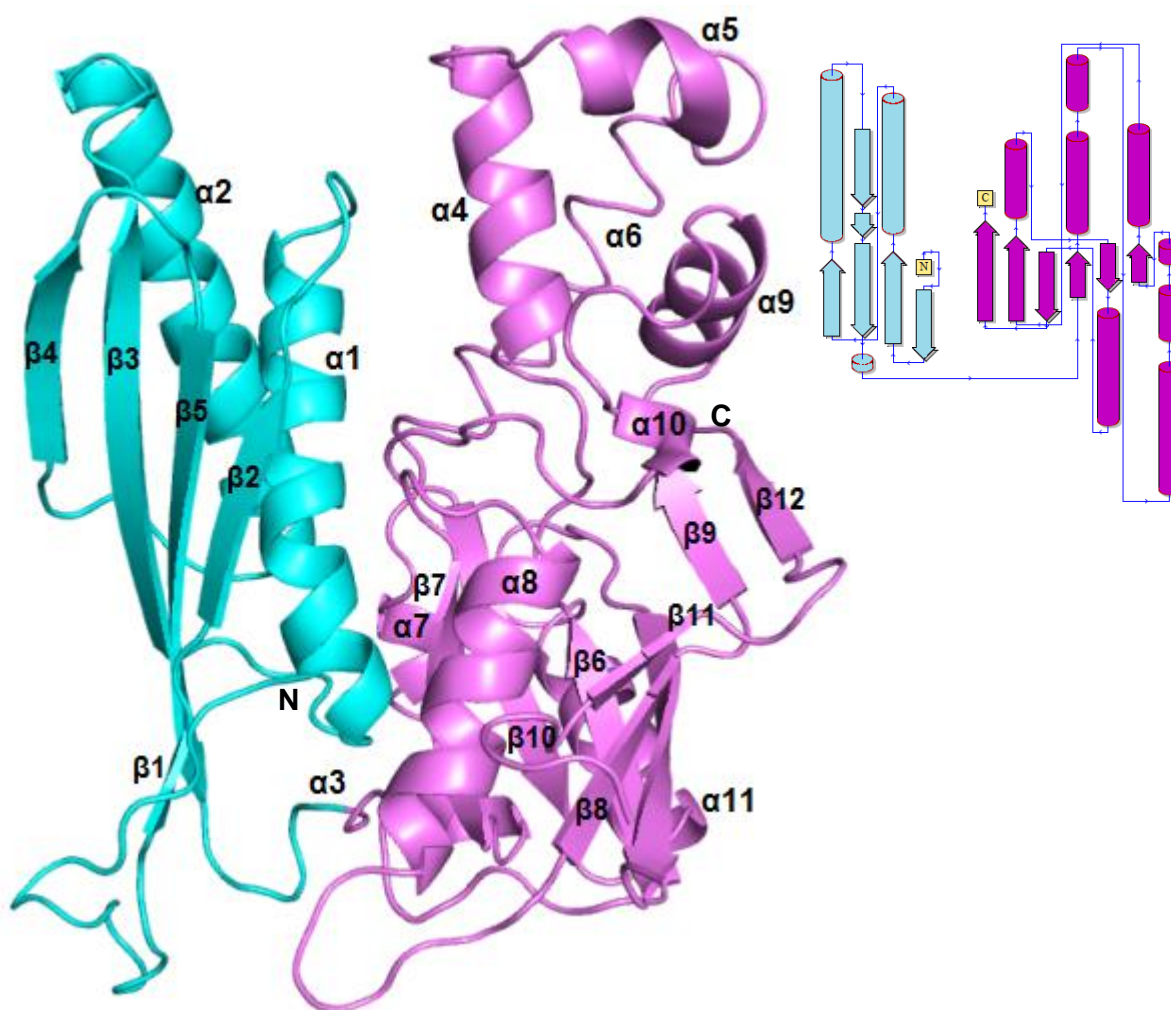


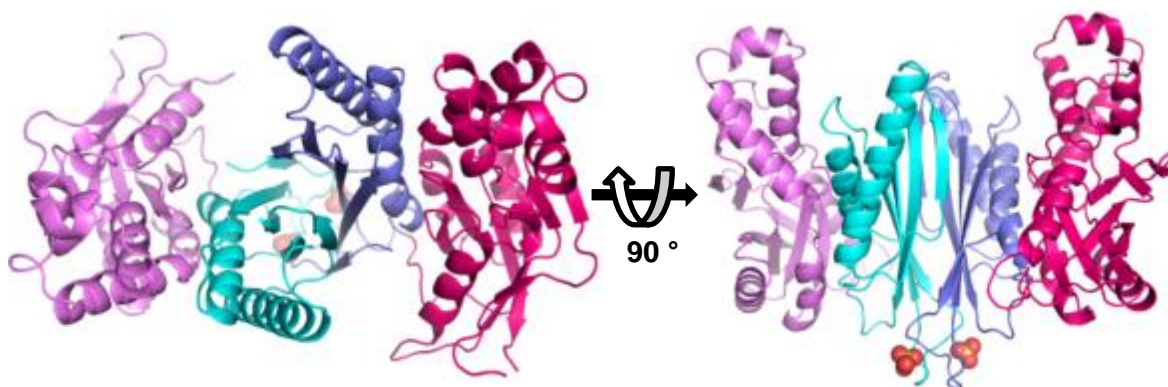
Figura 59 - Estrutura cristalográfica e diagrama de topologia da $\Delta N69$ -LmSPS2 com o N-domínio (em azul) e C-domínio (roxo). Figura gerada pelo Pymol⁹⁵ e diagrama construído pelo servidor PDBsum¹²⁶.

Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 24 – Comparação da porcentagem de estrutura secundária obtida pela estrutura cristalográfica de Δ N69-*LmSPS2* e da deconvolução do espectro de CD da *LmSPS2*

	Hélices- α (%)	Fitas- β (%)	Outras estruturas (%)
Estrutura Cristalográfica da Δ N69- <i>LmSPS2</i>	36,5	27,6	36,0
<i>LmSPS2</i> (CD)	32,8	18,2	48,9

Fonte: Elaborado pela Autora

**Figura 60** - Dímero Δ N69-*LmSPS2* gerado a partir do simétrico usando o servidor PISA¹²⁵. N-Domínios estão coloridos de azul claro e azul e C-Domínios são coloridos de roxo e rosa. Ânion sulfato esta representado como esferas.

Fonte: Elaborado pela Autora

O homodímero ilustrado na Figura 60 tem a forma do dímero determinado a partir de experimentos em solução (SAXS) e é similar ao homodímero de outros membros da superfamília das PurM nas quais se encontram as enzimas que ligam ATP.

Os primeiros dados cristalográficos de Selenofosfato sintetase que foram reportados foi de *Aquifex Aeolicus* truncada N-terminalmente⁷⁶ e posteriormente inteira em complexo com AMPCPP e na forma apo⁷⁸. Posteriormente, as estruturas da SPS1 humana⁶⁷ e da SPS de *E. coli* foram publicadas¹²⁷. Os níveis de identidade estrutural entre a Δ N69-*LmSPS2* e SPS de *Aquifex Aeolicus*; SPS1 humana e SPS *E.coli* são 27%, 43% e 29% respectivamente. A **Figura 61** ilustra o alinhamento sequencial das selenofosfato sintetase na qual foi baseado na estrutura Δ N69-*LmSPS2* contra as sequências de *LmSPS2*, *TbSPS2* e das selenofosfato sintetases que possuem estruturas conhecidas.

O enovelamento e a organização estrutural dessas proteínas são muito similares (Figura 62) com desvio quadrático médio (RMSD) de 2,004 Å para Δ N69-*LmSPS2* e SPS de

Aquifex Aeolicus; 0,930 Å para Δ N69-*LmSPS2* e SPS1 humana; 4,770 Å para Δ N69-*LmSPS2* e SPS *E.coli*.

Os resíduos importantes do sítio de ligação do ATP são altamente conservados entre todas as SPSs a partir de várias espécies (marcados com estrela na **Figura 61**) e alguns destacados na **Figura 63**. Alguns não estão na estrutura Δ N69-*LmSPS2* devido ao truncamento dos 69 primeiros resíduos como Lys37 e a não observação de densidade eletrônica para Met72 e Gly73.

As principais diferenças entre a estrutura Δ N69-*LmSPS2* e SPS de *Aquifex Aeolicus* e *E. coli* são regiões de *coil* adicionais nas estruturas eucarióticas em relação as procarióticas. Na análise da estrutura Δ N69-*LmSPS2* em relação a SPS de *Aquifex Aeolicus* na forma apo é possível observar que as duas estruturas contém o ânion sulfato. Itoh e colaboradores⁷⁸ hipotetizaram em sua estrutura que a localização desse ânion poderia ser o possível sítio de ligação do produto selenofosfato, porém, a distância desse ânion em relação ao γ fosfato é grande o suficiente para que não ocorra o ataque nucleofílico (**Figura 64**). Além disso, na estrutura reportada aqui, Δ N69-*LmSPS2*, o sítio de ligação do ânion é diferente do da estrutura de SPS de *Aquifex Aeolicus* e também está bem distante do sítio de ligação do ATP, abolindo a hipótese desse sítio ser um possível sítio de ligação do produto selenofosfato (**Figura 64**).

Capítulo 4 - Cristalizações, Métodos de melhoria da difração e Estudos Estruturais

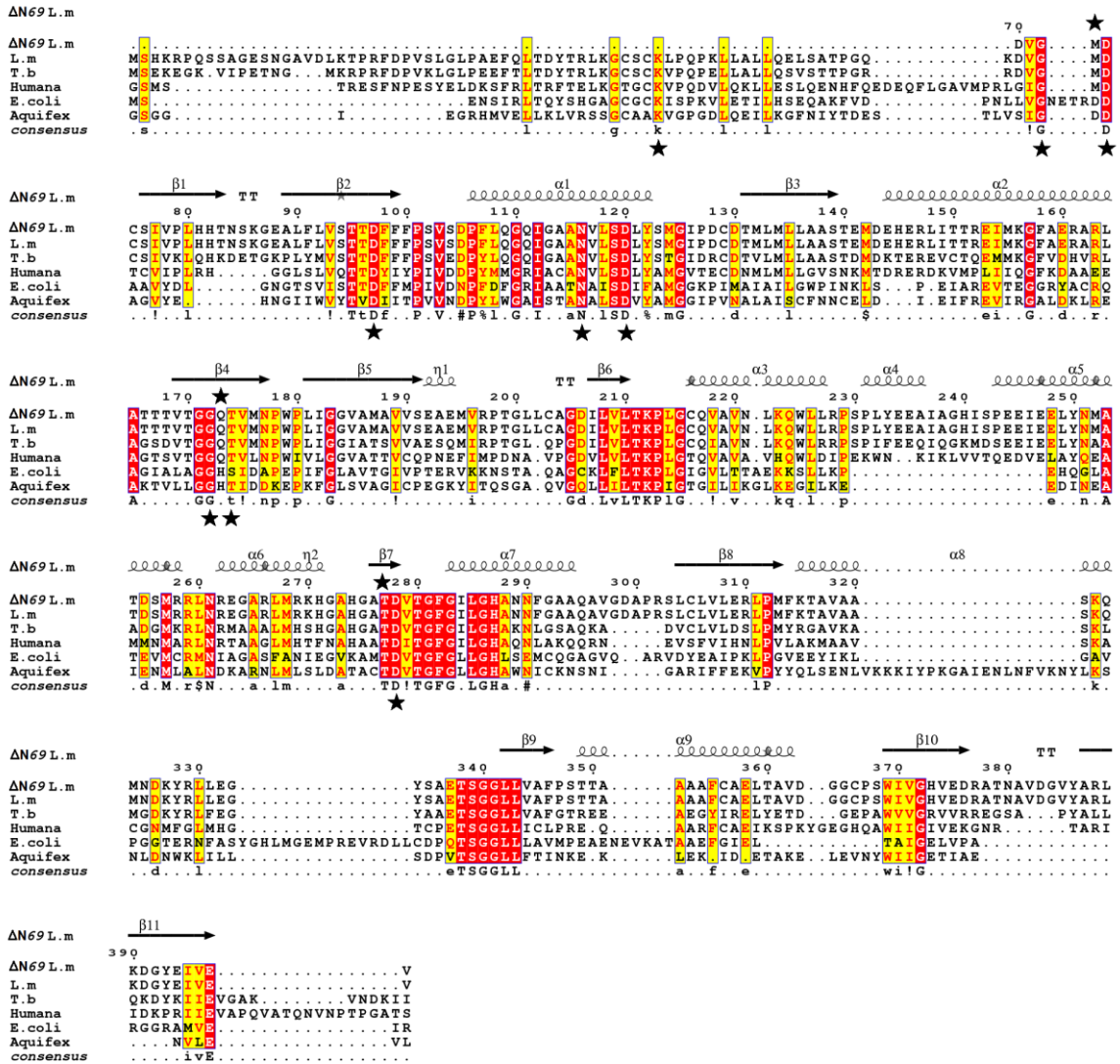


Figura 61 - Alinhamento sequencial baseado na estrutura da ΔN69-LmSPS2 contra a LmSPS2, TbsSPS2 e as selenofosfato sintetases de diferentes organismos e que possuem estrutura cristalográfica como SPS1 humana, (PDB 3FD5); SPS de E. coli (PDB 3U00) e SPS de Aquifex Aeolicus (PDB 2YYE). O alinhamento foi realizado no servidor T-Coffee¹²⁸ e analisado pelo ESPrpt 3.0¹²⁹. As estrelas correspondem aos resíduos que estão no sítio de ligação do ATP.

Fonte: Elaborado pela Autora a partir do servidor T-Coffee¹²⁸ e ESPrpt 3.0¹²⁹

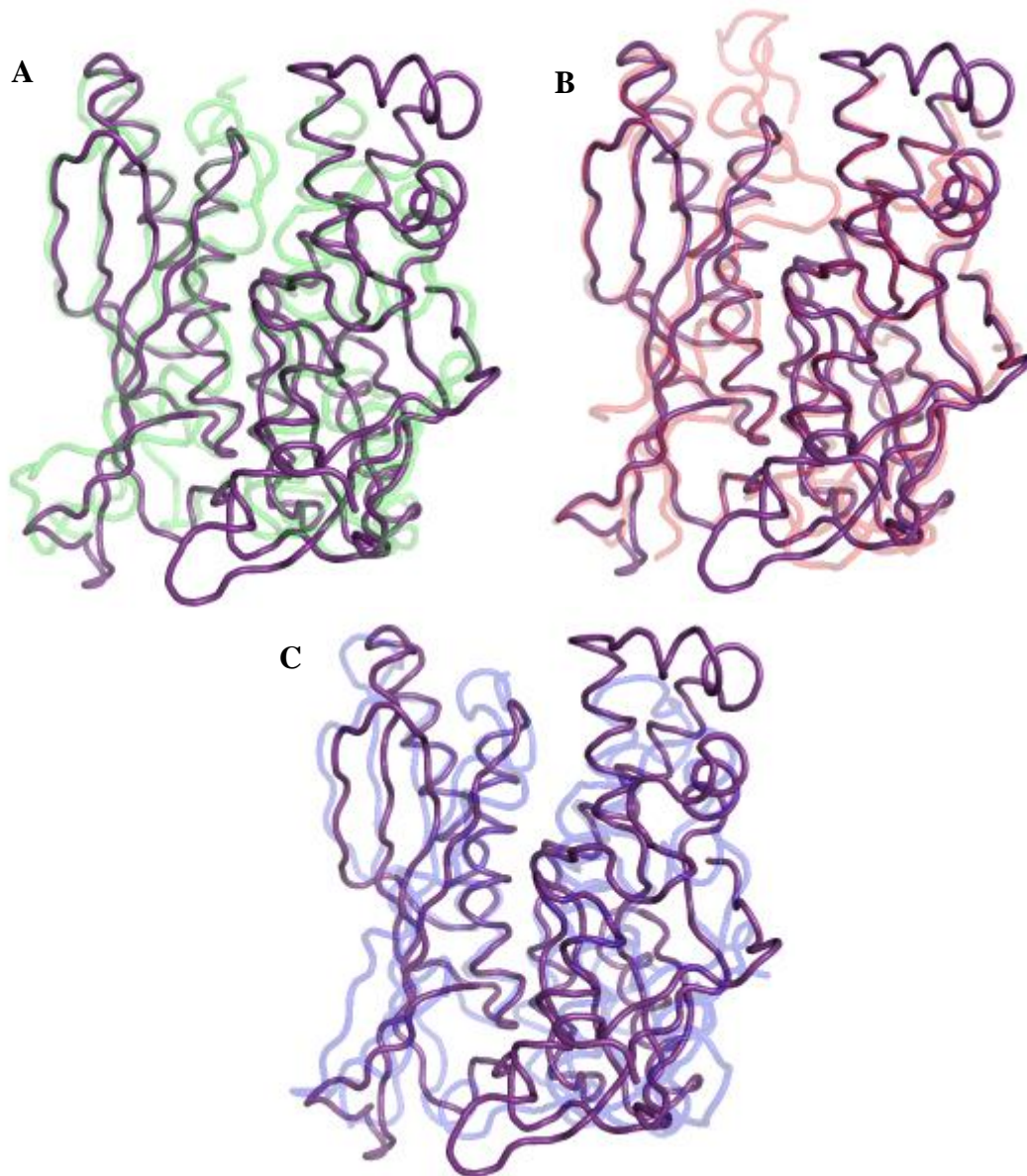


Figura 62 - Sobreposição da $\Delta N69$ -LmSPS2 (roxo escuro) em relação a: (A) SPS de *Aquifex Aeolicus* (verde), (B) SPS1 humana (vermelha) e (C) SPS *E.coli* (azul).

Fonte: Elaborado pela Autora

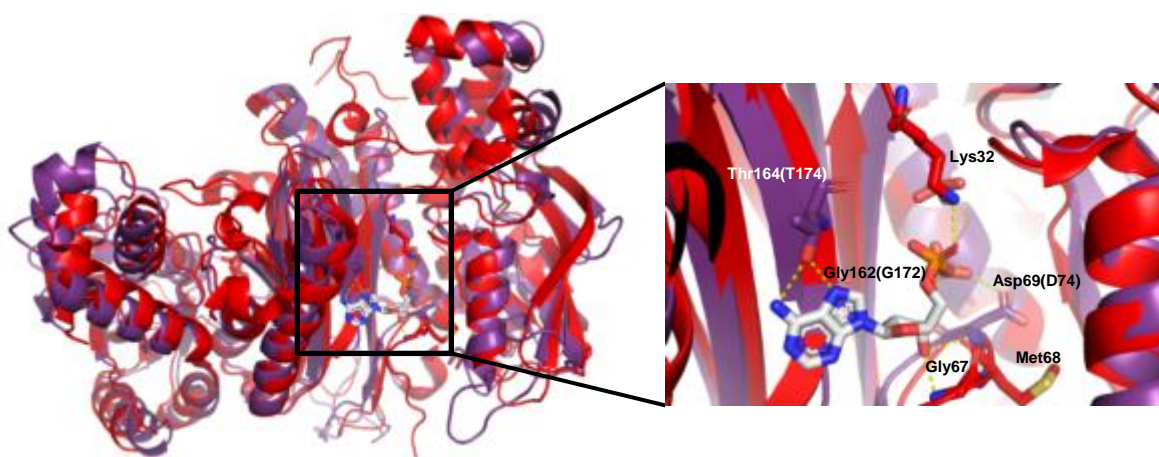


Figura 63 – Comparação da $\Delta N69$ -*LmSPS2* (em roxo) com a SPS1-ADP Humana (em vermelho). Os resíduos no sítio de ligação do ATP em roxo (correspondentes aos D69, Gly162 e Thr164 na SPS1 Humana e (D74), (G172) e (G174) na $\Delta N69$ -*LmSPS2*), porém os resíduos Lys32, Met68 e Gly67 (em vermelho) não estão na estrutura $\Delta N69$ -*LmSPS2*, pois foram perdidos no truncamento (Lys32(Lys37)) ou por não ter densidade eletrônica (Gly67 (Gly72) e Met68 (Met73)).

Fonte: Elaborado pela Autora

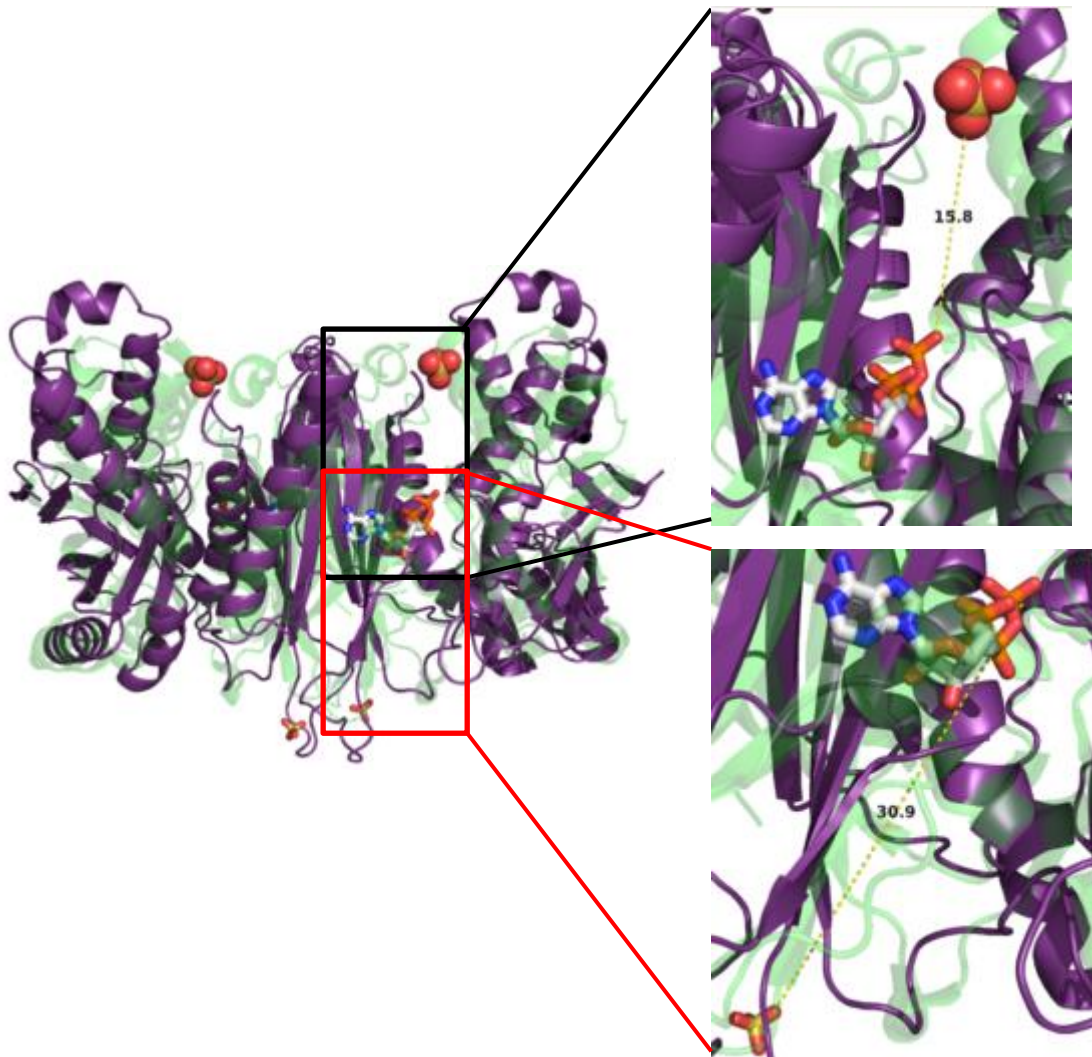


Figura 64 - Sobreposição da Δ N69-LmSPS2 (em roxo) com a SPS de *Aquifex Aeolicus* (em verde) evidenciando a localização e a distância do ânion sulfato em relação ao sítio de ligação do ATP. O ânion sulfato está representado em stick na estrutura Δ N69-LmSPS2 e em esferas na SPS de *A. Aeolicus*.

Fonte: Elaborado pela Autora

4.2.3. Cristalografia da SPS2 de *Trypanosoma brucei*

4.2.3.3.1 Cristalização utilizando o método *Microbatch*

Os cristais iniciais obtidos para a *TbSPS2* eram anisotrópicos com alto conteúdo de solvente e formados em menos de 24 horas na condição consistindo de 0,1 M Tri – citrato de sódio (pH 5,6) e 17% Peg 3350 (w/v). Assim, foi aplicado o método de microbatch sem muito sucesso inicial. Porém, após dois meses de incubação das placas foram observados cristais tridimensionais de *TbSPS2* (Figura 65).

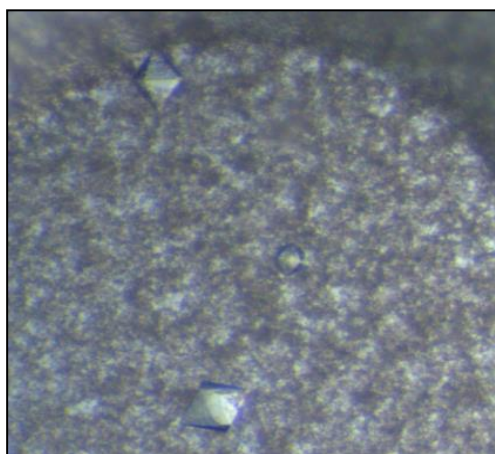


Figura 65 - Cristais da *TbSPS2* crescidos na condição de cristalização consistindo de 0,1 M Tri – citrato de sódio (pH 5,6) e 17% Peg 3350 (w/v) observados após dois meses de incubação.

Fonte: Elaborado pela Autora

4.2.3.3.2 Coleta de Dados de Difração de Raios X e Resolução inicial da Estrutura Cristalográfica da *TbSPS2*

Para coleta de dados de difração de raios X, cristais da *TbSPS2* foram resfriados em nitrogênio líquido utilizando como protetor criogênico 25% MPD (v/v). Os cristais foram

coletados em um comprimento de onda de 0,92 Å usando fonte de radiação Síncrotron na linha I04-1 do Diamond Light Source (DLS), Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, UK.

Um total de 400 imagens foi coletado com tempo de exposição do cristal de 0,5 s por imagem, ângulo de oscilação de $\Delta\varphi = 0,35^\circ$ e distância do cristal ao detector de 325,2 mm. O conjunto de dados foi processado e escalonado utilizando o programa MOSFLM¹¹⁸ e SCALA¹¹⁹, respectivamente. Os cristais da *TbSPS2* difrataram a 3,4 Å (Figura 66 B) com um grupo espacial P6₄22 e parâmetros de cela unitária de a=110,69 Å, b=110,69 Å e c=142,93 Å.

A massa molecular da subunidade foi de 43 kDa e a unidade assimétrica consiste de uma subunidade com um volume molecular (VM) de 2,94 Å³Da⁻¹ e conteúdo de solvente de aproximadamente 58,18%. A Figura 66 A mostra o cristal montado no *litholoop* (Molecular Dimensions) pronto para coleta e uma imagem do padrão de difração. A estatística da coleta de dados está sumarizada na Tabela 25.

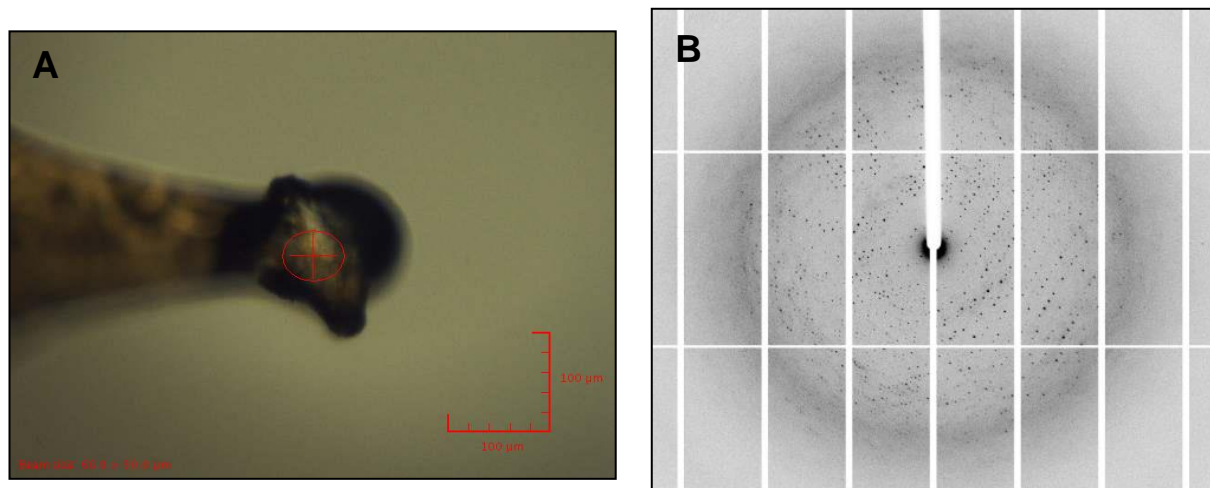


Figura 66 – (A) Cristal da *TbSPS2* montado no *litholoop* (Molecular Dimensions) para o experimento de difração de raios X. (B) Uma das imagens do padrão de difração a 3,4 Å obtido a partir do cristal (A).

Fonte: Elaborado pela Autora

Tabela 25 - Estatística da coleta de Dados da *TbSPS2*. Valores entre parentes são para faixa a mais alta resolução.

<i>TbSPS2</i>	
Parâmetros do Cristal	
Grupo Espacial	P6 ₄ 22
N° de moléculas / ASU	1
Parâmetros da cela unitária (Å, °)	a=110,69; b=110,69; c=142,93 $\alpha=90, \beta=90, \gamma=120$
Conteúdo de Solvente (%)	58,18
V _m (Å ³ Da ⁻¹)	2,94
Processamento dos Dados	
Resolução (Å)	57,29 – 3,4 (3,6 – 3,4)
*Rmerge (%)	8,0 (55,7)
I/sigma(I)	20,7 (4,8)
N° de reflexões unicas	9061 (1285)
Multiplicidade	13,1 (14,3)
Completeza (%)	99,9 (100,0)

Fonte: Elaborado pela Autora

Para determinação da fase, o melhor modelo a partir do PHASER foi obtido usando como modelo de busca a estrutura cristalográfica da Δ N69-*LmSPS2* determinada anteriormente, entretanto, esta estrutura não tem os 69 resíduos iniciais. O primeiro mapa de densidade eletrônica obtido a partir da solução do PHASER foi visualmente inspecionado e muitos resíduos iniciais foram construídos manualmente seguido de ciclos de refinamento. Os valores originais de R_{work} e R_{free} calculados depois da substituição molecular foram 46% e 47%, respectivamente. Após ciclos de refinamento os valores de R_{work} e R_{free} não diminuíam. Observamos, após muitas tentativas de refinamento que não era possível o refinamento da estrutura pelo fato do número dos dados experimentais (reflexões únicas) ser menor que o número de parâmetros a serem refinados (aproximadamente 2437 átomos com parâmetros x, y, z e B_{fator}).

*Capítulo 5 - Ensaio de
Complementação Funcional*

Este capítulo reporta os ensaios funcionais das selenofosfato sintetase de *T. brucei* e *L. major* selvagens, truncadas e com mutações pontuais.

5.1 Metodologia

5.1.1 Informações referentes ao estudo da interação SPS-SELA-SelC em *E.coli*

Os alunos de doutorado do nosso grupo (Ivan Rosa e Silva e Vitor Hugo Serrão) que estudam a interação do complexo SPS-SelA-SelC em *E.coli* demonstraram, a partir de experimentos de espectrometria de massas com troca Hidrogênio/Deutério, que a região N-terminal de SPS de *E. coli* pode exercer um papel fundamental na formação do complexo ternário. O N-terminal de SPS é altamente variável entre diferentes SPS com resíduos adicionais em SPS de eucariotos quando comparada com membros de bactéria e arquea, porém conserva a região rica em glicina responsável pela interação com o ATP. A região N-terminal é altamente flexível, o qual foi comprovado por experimentos de proteólise *in situ* no qual aproximadamente 11 resíduos de *EcSPS* foram removidos. Portanto, para investigar a função dessa região na via de biossíntese de Sec, experimentos de complementação funcional usando as construções truncadas N-terminalmente da SPS2 de *T. brucei* e *L.major* foram realizados.

5.1.2 Ensaio de Complementação Funcional das Selenofosfato sintetases

A linhagem mutante no gene *selD* de *E. coli*, WL400(*selD204*(CamR)::*cat*) foi cedida pelo “*E.coli* Genetic Stock center” (<http://cgsc.biology.yale.edu>). Essa linhagem tem o gene *selD* inativado pela inserção de um gene reporter *cat* que é marcador de resistência a cloranfenicol (CamR). A inativação do gene *selD* acarreta à não produção da enzima selenofosfato sintetase, portanto, essa linhagem é deficiente da maquinaria completa de biossíntese de selenocisteína. A falta dessa maquinaria impede a síntese de selenoproteínas como a formato desidrogenase H (FDH_H). Assim, o ensaio de complementação funcional tem

como princípio a inserção de um gene na cepa WL400(*selD204*(CamR)::*cat*) que poderá complementar ou não a atividade da selenofosfato sintetase. Se complementar, a maquinaria de síntese de selenocisteína é reestabelecida e a produção da enzima FDH_h (selenoproteína) ocorre. Assim, o composto benzil viologênio que é colocado na placa é reduzido pela FDH_h e observa-se a cor de alaranjado forte para púrpura mostrando que houve a complementação funcional.

5.1.2.1 Ensaio de Complementação Funcional de *E. coli* com as selenofosfato sintetase selvagens e truncadas no N-terminal

Para os experimentos de complementação funcional foram utilizadas as construções mostradas na **Tabela 26**. As construções $\Delta N11$ -*EcSPS*+pET28a e *EcSPS*+pET28a da selenofosfato sintetase de *E. coli* foi gentilmente cedida pelo aluno de doutorado Ivan Rosa e Silva para estudos comparativos.

Tabela 26 - Construções que foram transformadas em WL400(*selD204*(CamR)::*cat*) para os ensaios de complementação funcional. Sendo que ΔNn corresponde a ΔN deleção de resíduos no N-terminal e n o número de resíduos deletados.

Construção	Especificação
pET28a	Vetor vazio como controle negativo
pET20b	Vetor vazio como controle negativo
<i>TbSPS2</i> +pET28a	SPS2 de <i>T. brucei</i> recombinante selvagem
$\Delta N25$ - <i>TbSPS2</i> +pET20b	SPS2 de <i>T. brucei</i> com deleção dos 25 primeiros resíduos
$\Delta N70$ - <i>TbSPS2</i> +pET20b	SPS2 de <i>T. brucei</i> com deleção dos 70 primeiros resíduos
<i>LmSPS2</i> +pET28a	SPS2 de <i>L. major</i> recombinante selvagem
$\Delta N69$ - <i>LmSPS2</i> +pET28a	SPS2 de <i>L. major</i> com deleção dos 69 primeiros resíduos
<i>EcSPS</i> +pET28a	SPS de <i>E. coli</i> recombinante selvagem
$\Delta N11$ - <i>EcSPS</i> +pET28a	SPS de <i>E. coli</i> com deleção dos 11 primeiros resíduos

Fonte: Elaborado pela Autora

Capítulo 5 - Ensaios de Complementação Funcional

Essas construções já extraídas da bactéria DH5 α foram transformadas em células competentes de *E. coli* WL400(*selD204*(CamR)::*cat*) através de choque térmico. Bactérias transformadas com a construção foram plaqueadas em meio LB, contendo 1,5% de agar e o antibiótico apropriado (ampicilina 100 μ g/mL para pET20b/canamicina 30 μ g/mL para pET28a e cloranfenicol 35 μ g/mL que ficou sob agitação a 250 rpm por aproximadamente 14 horas, a 37 °C. Após o crescimento das colônias transformantes, foi feito o pré-inóculo de uma das colônias da placa com seus respectivos antibióticos e deixado sob agitação de 250 rpm por 12 horas a 37 °C. Em seguida foi retirada alíquotas de 100 μ L de cada pré-inóculo e plaqueadas em meio (1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 1% agar bacteriológico, 0,1% NaCl, pH 7,0) com 50 mM de formato de sódio, 1 mM de molibdato de sódio, 1 mM de seleneto de sódio, 0,5% de glicose e 0,1 mM de IPTG.

As placas foram incubadas por 48 horas a 30 °C em atmosfera livre de oxigênio. Após a incubação, as placas foram testadas para atividade Formato Dehidrogenase H (FDH_H) pelo ensaio do benzil viologênio. Para isso, foi adicionado no topo das placas meio “soft agar” (1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 0,75% agar bacteriológico, 0,1% NaCl, pH 7,0) suplementado com 25 mM de formato de sódio, 25 mM de KH₂PO₄, 1 mg/mL de benzil viologênio. O desenvolvimento da cor púrpura sob a redução do benzil viologênio indica que as células bacterianas contêm atividade catalítica FDH_H e então houve a complementação funcional. Foram feitos controle experimental positivo utilizando a cepa DH5 α que contém o gene *SelD* e dois controles negativos com os vetores pET28a e pET20b vazios transformados em WL400(*selD204*(CamR)::*cat*). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

5.1.2.2 Ensaio de Complementação Funcional de *E.coli* com as SPS2 mutadas pontualmente

5.1.2.2.1 Mutagênese sítio dirigida

A mutagênese sítio dirigida foi realizada diretamente nas construções de *TbSPS2+pET28a*, *LmSPS2+pET28a*. Os seguintes aminoácidos foram mutados para alanina: Leucina (L33 e L37), Treonina (T34 e T38) e Tirosina (Y36 e Y40) de *T. brucei* e *L.major*, respectivamente. Essas mutações foram realizadas baseadas nos resultados obtidos no experimento de complementação funcional das proteínas truncadas. Assim, oligonucleotídeos foram desenhados contendo a mutação e estão mostrados na **Tabela 27**. Foi utilizado o protocolo “*QuickChange Site-Directed Mutagenesis*” (Stratagene) para a realização das mutações.

Tabela 27 - Primers construídos para mutagênese sítio dirigida com a trinca de bases mutadas em vermelho. S representa os primers sense e AS os antisense.

Mutações	Primers com mutação (Base trocada em vermelho)
<i>TbSPS2</i> L33A	S: CCGTGTGTAGTCAGT TGC GGTAAACTCTCCGG AS: CCGGAAGAGTTTACCG GCA ACTGACTACACACGG
<i>TbSPS2</i> T34A	S: GAAGAGTTTACCTT AGCT GACTACACACGGCTTAAG AS: CTTAAGCCGTGTGTAGTC AGC TAAGGTAAACTCTTC
<i>TbSPS2</i> Y36A	S: GTTTACCTTAACTGAC GCC ACACGGCTTAAGGGTTG AS: CAACCCTTAAGCCGTGT GGC GTCAGTTAAGGTAAAC
<i>LmSPS2</i> L37A	S: CCTGCTGAGTTCCAG GCC ACCGACTACACACGC AS: GCGTGTGTAGTCGGT GGC CTGGAACCTCAGCAGG
<i>LmSPS2</i> T38A	S: CTGCTGAGTTCCAGCTC GCC GACTACACACGCCTG AS: CAGGCGTGTGTAGTC GGC GAGCTGGAACCTCAGCAG
<i>LmSPS2</i> Y40A	S: GTTCCAGCTCACCGAC GCC ACACGCCTGAAGGGG AS: CCCCTCAGGCGTGT GGC GTCGGTGAGCTGGAAC

Fonte: Elaborado pela Autora

As construções mutantes foram amplificadas com os oligonucleotídeos específicos, de acordo com a reação descrita na **Tabela 28**.

Capítulo 5 - Ensaios de Complementação Funcional

Tabela 28 - Mistura da reação em Cadeia da DNA Polimerase.

Componentes da reação	Quantidade final da reação
Oligo da fita sense (Fermentas) [0,3 µg/µL]	0,6 µL
Oligo da fita reverse (Fermentas) [0,3 µg/µL]	0,6 µL
Template (SPS2 em pET28a)	1 µL
Tampão HF Phusion (NEB)	[1x] 10 µL
MgCl ₂ [50 mM]	0,5 µL
dNTPs [10 mM]	1 µL
Enzima Phusion [1 U/uL] (Phusion)	0,5 µL
H ₂ O	34,3 µL
Total	50 µL

Fonte: Elaborado pela Autora

Os ciclos de amplificação das construções foram:

98 °C - 30 segundos
98 °C - 10 segundos
50 °C - 30 segundos
72 °C - 3,5 min
72 °C - 10 min
4 °C - 24 horas

} 25x

Ao finalizar a reação de PCR, adicionou-se na reação 1 µL da enzima de restrição *DpnI* (NEB) que reconhece e cliva todo DNA metilado. Assim, todo DNA molde parental será digerido pela *DpnI* e ficará somente o DNA sintetizado contendo a mutação. A reação foi incubada por 4 horas a 37 °C. O produto da digestão foi transformado em células competentes DH5α e as placas foram incubadas a 37 °C por aproximadamente 14 horas. Fez se um pré-inóculo das colônias transformantes e o plasmídeo foi extraído através do kit “GeneJET Plasmid Miniprep” (Fermentas). Para verificação da mutação o DNA extraído foi sequenciado. Os mutantes foram utilizados para o experimento de complementação funcional. Os ensaios de complementação funcional foram realizados em duplicata biológica, conforme descrito na seção 5.1.2.

5.2 Resultados e Discussão

Os resultados dos ensaios das construções truncadas estão mostrados na Figura 67. O desenvolvimento da cor púrpura sob a redução do benzil viologênio indica que as células bacterianas contêm atividade catalítica FDH_H e então houve a complementação funcional.

Capítulo 5 - Ensaio de Complementação Funcional

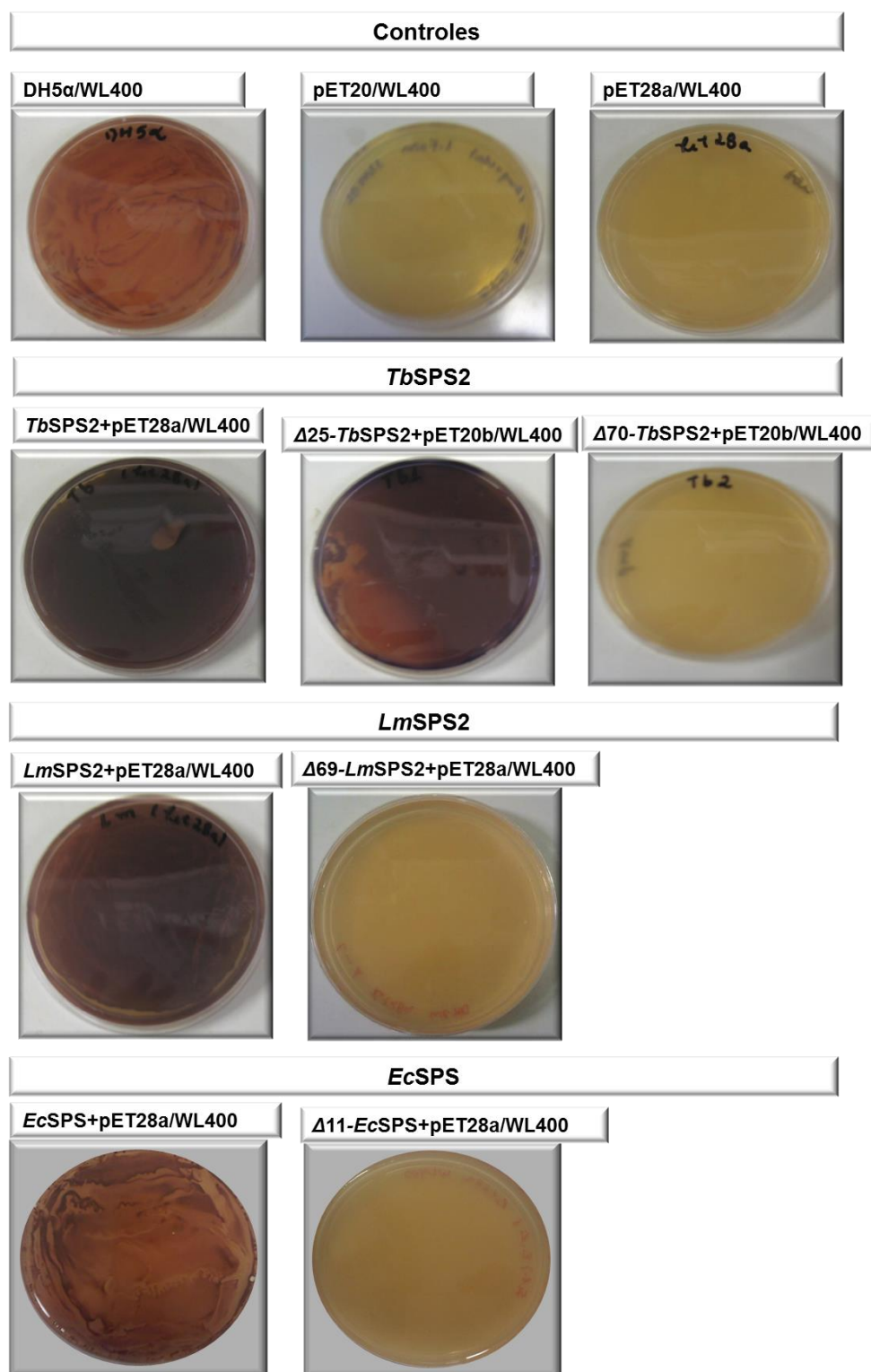


Figura 67 - Ensaio de Complementação funcional das selenofosfato sintetases selvagem e truncadas. Controle positivo DH5α, negativo pET28a e pET20b transformados em WL400. *TbSPS2*: Selvagem; com deleção dos 25 primeiros resíduos; deleção dos 70 primeiros resíduos. *LmSPS2*: Selvagem; com 69 resíduos iniciais deletados. *EcSPS*: Selvagem; com deleção dos 11 primeiros resíduos.

Fonte: Elaborado pela Autora

Através da Figura 67 podemos observar que as selenofosfato sintetases selvagens (*TbSPS2+pET28a*; *LmSPS2+pET28a*; *EcSPS+pET28a*) e a truncada de 25 resíduos (Δ N25-*TbSPS2+pET20b*) complementaram funcionalmente a cepa WL400(*selD204(CamR)::cat*), isto é, foram obtidas colônias com atividade de FDHh que reduziram o benzil viologênio e desenvolveram a cor purpura. Por outro lado, as construções truncadas Δ N70-*TbSPS2+pET20b*; Δ N69-*LmSPS2+pET28a*; Δ N11-*EcSPS+pET28a* não complementaram, consequentemente não houve a formação da cor purpura, mostrando que não foi reestabelecida a via de biossíntese de Sec.

As construções Δ N70-*TbSPS2+pET20b*; Δ N69-*LmSPS2+pET28a* não complementou a cepa deficiente de SPS por atingirem os resíduos catalíticos importantes para a função da proteína (Lys e Cys42). Já a construção Δ N25-*TbSPS2+pET20b* complementou mesmo perdendo os 25 resíduos iniciais, mostrando que esses resíduos não estão envolvidos no mecanismo de catalise das SPS2. Porém, a construção Δ N11-*EcSPS+pET28a* não complementou com a perda de somente 11 resíduos iniciais não sendo então capaz de restaurar a atividade de SPS.

Esses resultados mostraram que o N-terminal parece ser essencial para a síntese de Sec, nos decidimos confirmar se a região N-terminal de SPS é importante para formação do complexo SPS-SelA-SelC.

Pela análise do N-terminal do alinhamento sequencial das selenofosfato sintetases é possível observar três resíduos conservados (L, T e Y) além dos resíduos catalíticos (C e K) (Figura 68). Assim, foi investigado através da realização de mutações pontuais se estes resíduos conservados (L, T e Y) são importantes para a catálise da enzima e se estão realmente envolvidos no mecanismo de interação da SPS com SelA-SelC no caso de procariotos e SPS-SepSecS-PSTK-SelC em eucariotos.

Capítulo 5 - Ensaios de Complementação Funcional

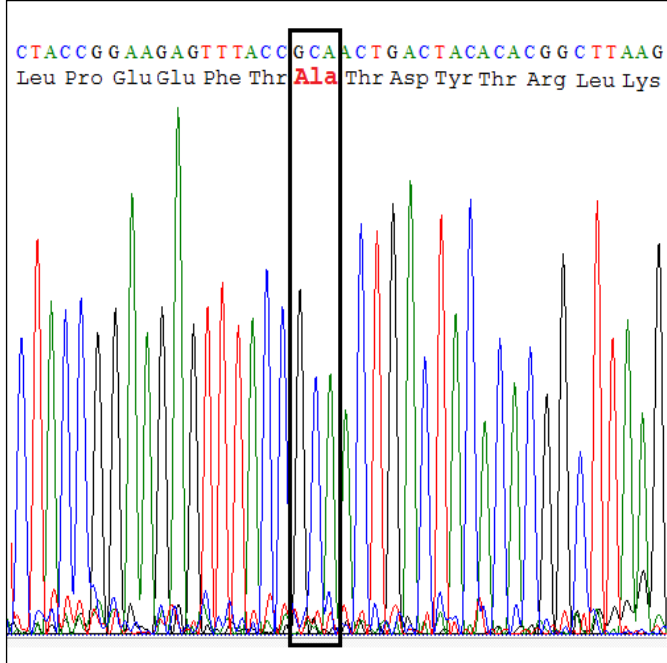


Figura 68 – Parte do alinhamento mostrando regiões circundadas em vermelho que correspondem à região truncada na qual não houve complementação funcional. A região destacada em verde representa a região truncada que complementou a cepa WL400(*selD204*(CamR)::*cat*). As setas vermelhas estão apontando os três resíduos de aminoácidos a serem investigados em relação a suas funções no mecanismo de catálise da enzima selenofosfato sintetase.

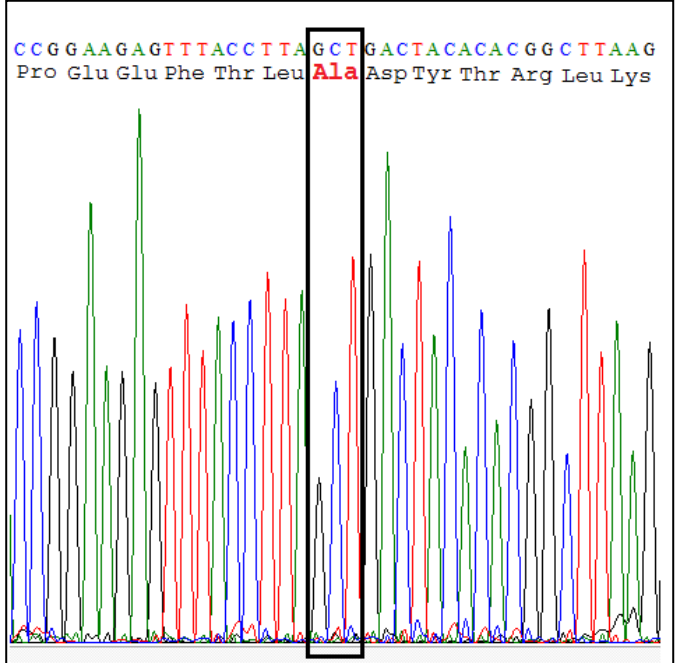
Fonte: Elaborado pela Autora

Uma parte do eletroferograma do sequenciamento assinalando as mutações está mostrado nas Figura 69 e Figura 70.

TbSPS2 L33A



TbSPS2 T34A



TbSPS2 Y36A

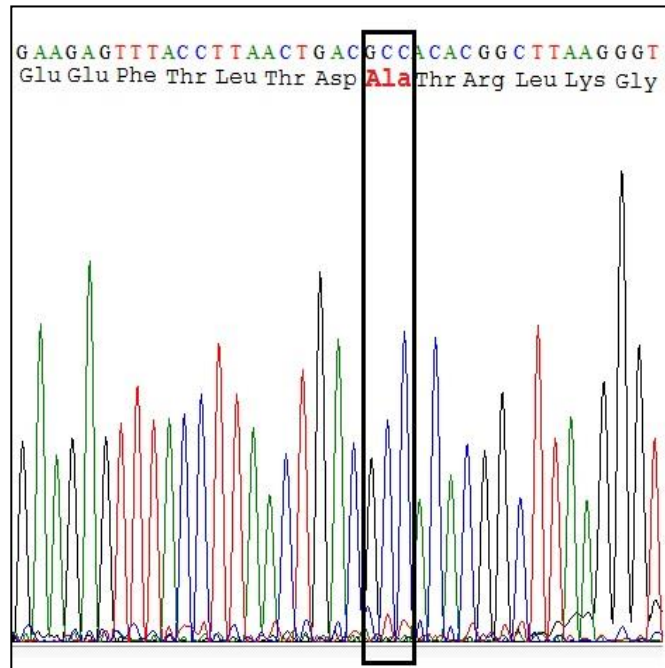


Figura 69 - Parte do sequenciamento dos mutantes da enzima selenofosfato sintetase de *T. brucei*. As regiões assinaladas mostram os resíduo que foram mutados para Alanina. *TbSPS2L33A*, *TbSPS2T34A* e *TbSPS2Y36A*.

Fonte: Elaborado pela Autora

Capítulo 5 - Ensaio de Complementação Funcional

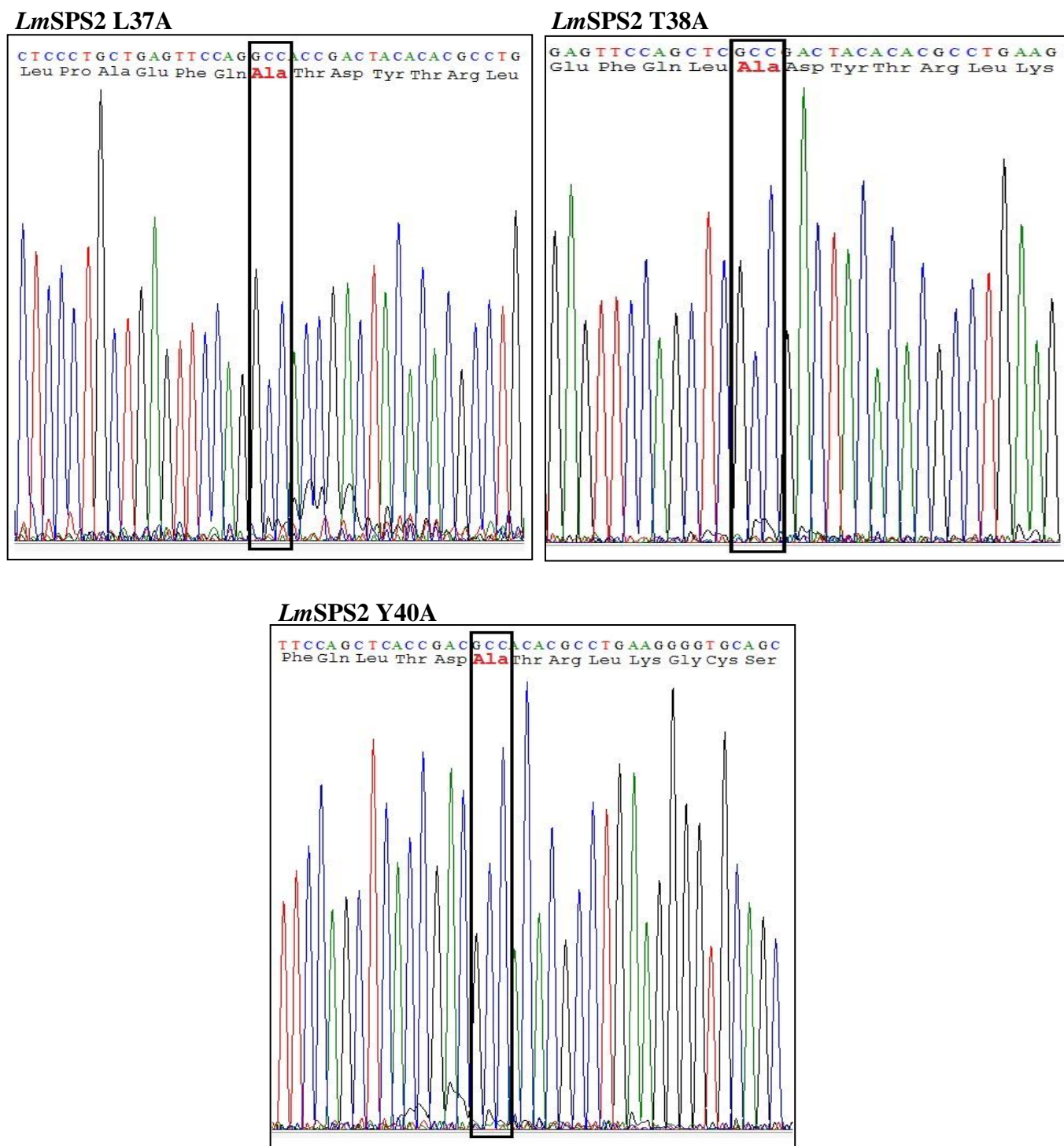


Figura 70 - Parte do sequenciamento dos mutantes da enzima selenofosfato sintetase de *L. major*. As regiões assinaladas mostram os resíduos que foram mutados para Alanina. *LmSPS2L37A*, *LmSPS2T38A* e *LmSPS2Y40A*.

Fonte: Elaborado pela Autora

Capítulo 5 - Ensaio de Complementação Funcional

Os resultados da complementação funcional com as construções truncadas podem ser visualizados na Figura 71.

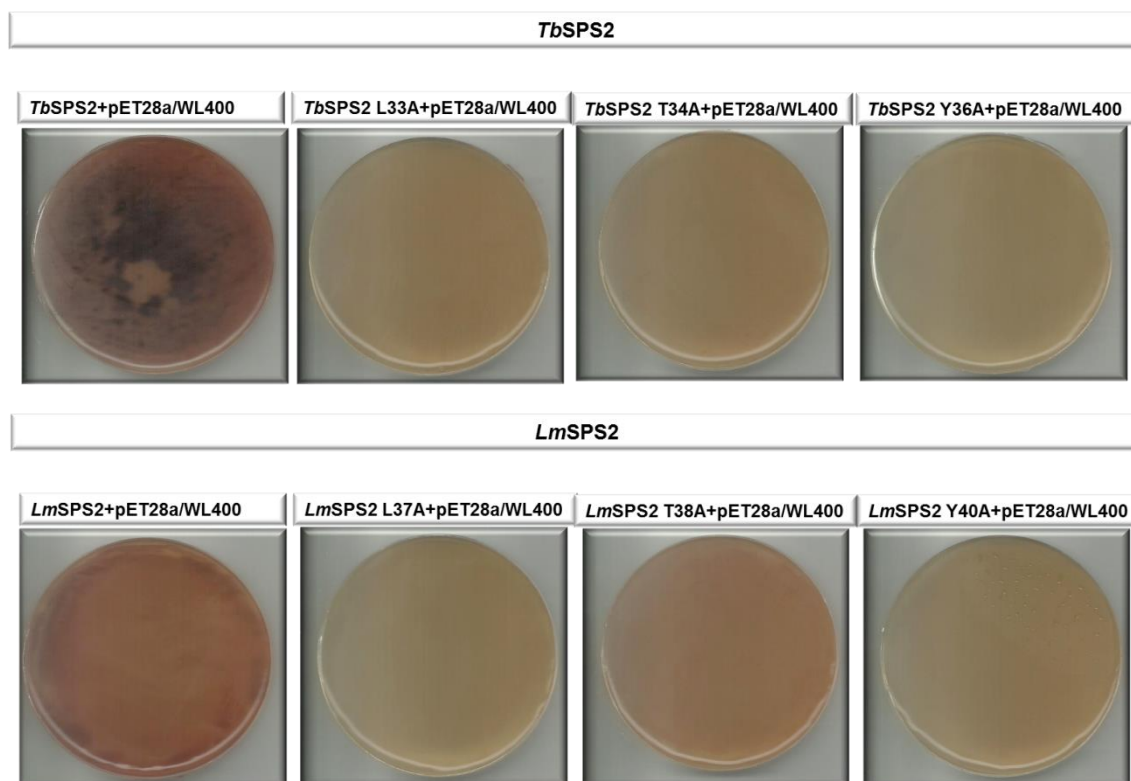


Figura 71 - Ensaio de Complementação funcional das selenofosfato sintetases selvagem e mutantes. *TbSPS2*: Selvagem; Mutante: Leu33Ala, Thr34Ala e Tyr36Ala. *LmSPS2*: Selvagem; Mutante: Leu37Ala, Thr38Ala e Tyr40Ala.

Fonte: Elaborado pela Autora

Os resultados mostram que os mutantes *TbSPS2*L33A, *TbSPS2*T34A, *TbSPS2*Y36A, *LmSPS2*L37A, *LmSPS2*T38A, *LmSPS2*Y40A não complementam funcionalmente a cepa *E. coli* WL400. Assim, os resíduos leucina, treonina e tirosina são essenciais para a atividade da SPS2 de *T. brucei* e *L. major*. Estes resíduos nunca haviam sido reportados até então na literatura como fundamentais para a atividade das selenofosfato sintetases.

Esses resultados somados aos resultados de interação da *EcSPS* com a SELA de *E. coli* por anisotropia de fluorescência obtidos pelos alunos de doutorado Ivan R. Silva e Vitor B. Serrão apontam esses resíduos como possíveis candidatos da interface de interação entre a Selenofosfato sintetase e a próxima enzima da via, a selenocisteína sintase. Os resultados de anisotropia de fluorescência realizados pelo nosso grupo levaram a isso, pois mostraram que a

Capítulo 5 – Ensaios de Complementação Funcional

interação era perdida quando utilizavam a construção truncada N-terminalmente da SPS de *E.coli* (ΔN -EcSPS).

Quando foi realizada a análise mutacional baseada nas estruturas cristalográficas das proteínas selenofosfato sintetases que possuem esses resíduos foram obtidas informações importantes. Primeiro, os resíduos correspondentes na estrutura de SPS1 humana e SPS de *E. coli* estão bem distantes do sítio de ligação do ATP (Figura 72), assim eles não participam da atividade de ATPase da enzima. Segundo, esses resíduos não fazem parte da interface de dimerização das SPSs (Figura 73) mostrando que a estrutura dimérica e sua atividade permanecem. Porém, foi observado através da estrutura da SPS1 humana que esses resíduos estão localizados próximos ao túnel molecular de aproximadamente 15 Å (Figura 74). Segundo Wang e colaboradores⁷⁹ este túnel seria o possível túnel de entrega do selenofosfato. Essa hipótese juntamente com a hipótese da participação desses resíduos na interface de interação com a proteína que receberá o selenofosfato (SepSecS) reforçam a idéia que eles estão de alguma forma envolvidos no mecanismo de entrega do selenofosfato nas SPSs.

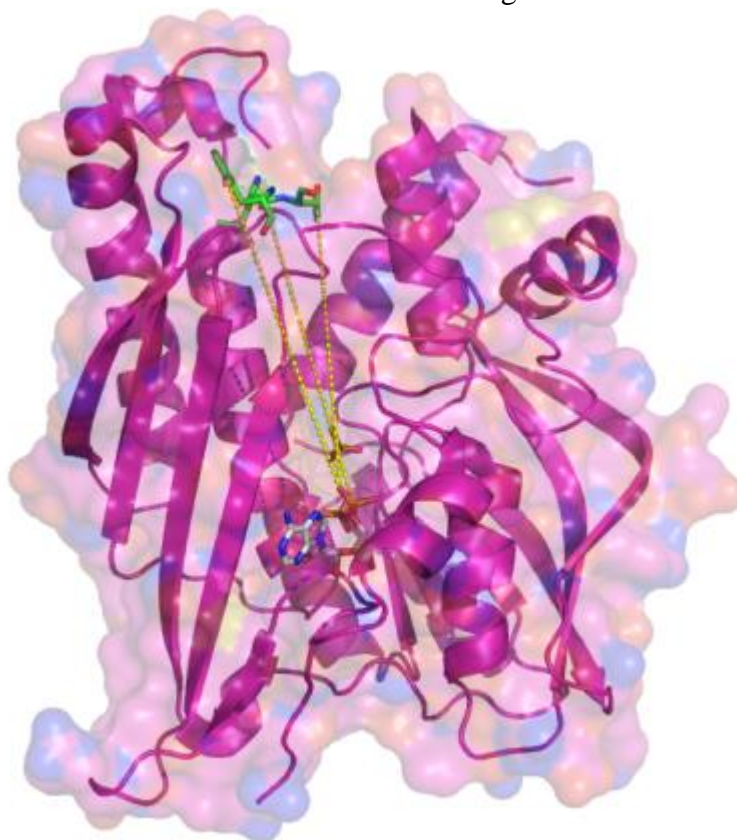


Figura 72 – Estrutura da SPS1 humana mostrando em verde os resíduos (L19, T20 e F22) correspondentes aos que foram mutados na SPS2 de *T. brucei* (L33, T34 e Y36) e *L. major* (L37, T38 e Y40) e sua grande distância em relação ao sítio de ligação do ATP em pontilhados amarelos.

Fonte: Elaborado pela Autora

Capítulo 5 – Ensaios de Complementação Funcional

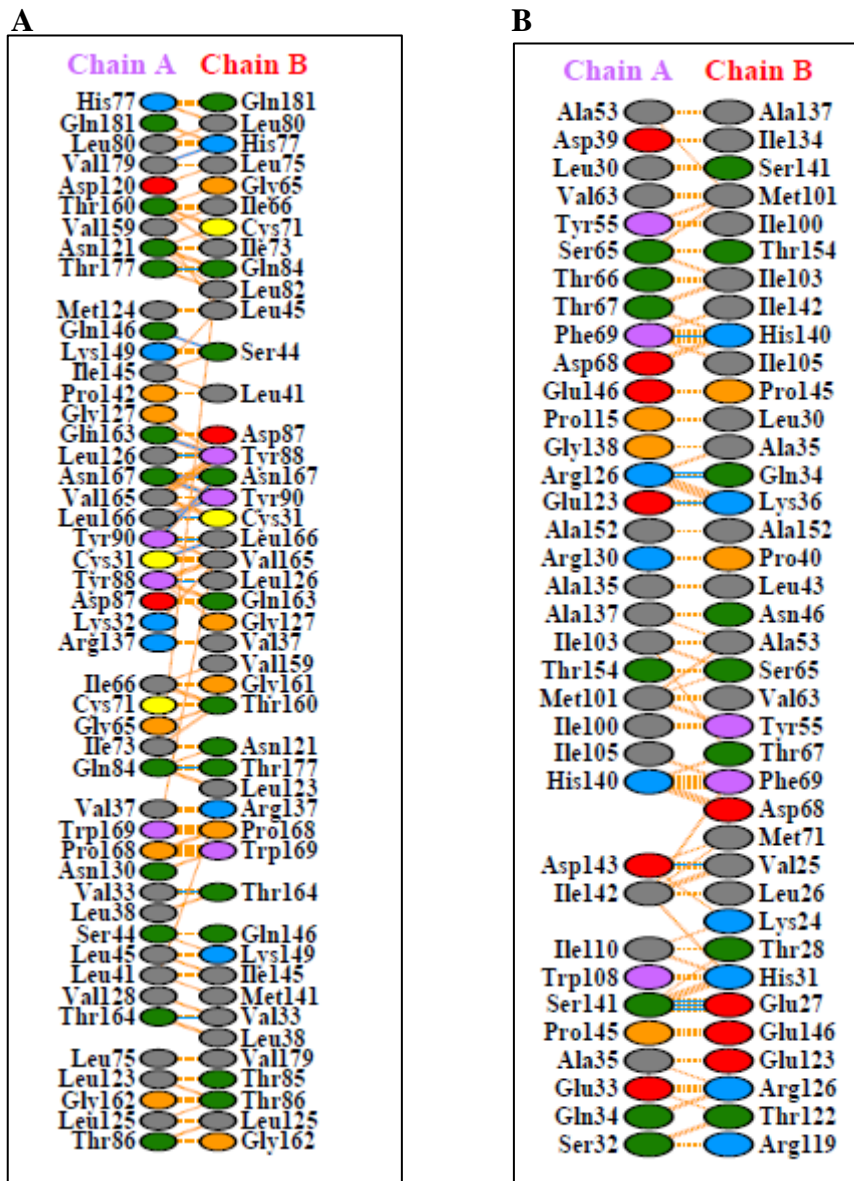


Figura 73 – Resíduos que participam da superfície de interação das duas cadeias que formam o dímero da selenofosfato sintetase: (A) SPS1 humana e (B) SPS *E. coli*. Os resíduos correspondentes aos mutados em SPS2 de *T. brucei* e SPS2 de *L. major* não participam da superfície de interação (L19, T20 e F22 em SPS1 humana e L9, T10 e Y11 em SPS de *E. coli*).

Fonte: Extraído e Modificado de PDBsum¹²⁶

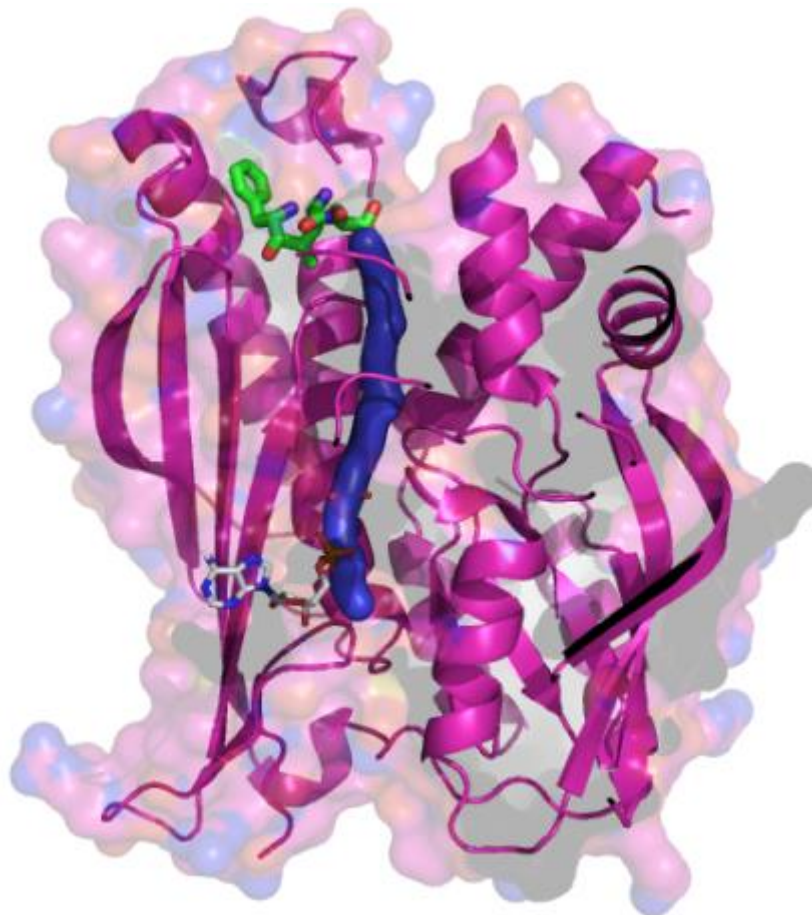


Figura 74 Estrutura da SPS1 humana ilustrando o túnel de aproximadamente 15 Å que segundo Wang e colaboradores⁷⁹ é o possível caminho de entrega do selenofosfato. Em verde estão mostrados os resíduos próximos ao início do túnel (L19, T20 e F22) e que correspondem aos resíduos mutados em SPS2 de *T. brucei* (L33, T34 e Y36) e *L. major* (L37, T38 e Y40). O túnel foi encontrado a partir do programa Caver¹³⁰ e está mostrado em azul escuro..

Fonte: Elaborado pela Autora

*Capítulo 6 - Conclusões e
Perspectivas*

6.1 Conclusões e Perspectivas

Esta tese de doutorado teve como objetivo os estudos estruturais e funcionais das selenofosfato sintetases de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. Os resultados apresentados da caracterização das selenofosfato sintetases empregaram diversas técnicas biofísicas e bioquímicas as quais resultaram em informações importantes para o entendimento do comportamento das proteínas.

Dentre esses resultados estão a confirmação do estado oligomérico de dímero para ambas proteínas visto por análises de cromatografia de exclusão molecular, gel nativo, DLS, SAXS e AUC. As técnicas de gel nativo e cromatografia de exclusão de tamanho mostraram que havia uma pequena porcentagem de outra forma oligomérica que posteriormente foi verificada possivelmente pela não validação dos envelopes de SAXS nos modelos cristalográficos. Assim, foi evidenciado uma mistura de dímeros e tetrâmeros em solução. A AUC mostrou que ocorre sim a predominância de dímeros em solução mesmo em concentrações fisiológicas e que a pequena fração de tetrâmeros possui uma constante de dissociação alta.

Estudos cristalográficos somente foram bem sucedidos após inúmeras tentativas de métodos pré-cristalização e pós-cristalização. A SPS2 de *L. major* cristalizou após o truncamento do N-terminal em 69 resíduos. Os cristais possuíam alto poder de difração 1,9 Å e pertencem ao grupo espacial $I2_12_12_1$, com parâmetros de cela $a=55,95\text{Å}$, $b=81,69\text{Å}$ e $c=177,92\text{Å}$.

No caso da SPS2 de *T. brucei*, os cristais iniciais obtidos eram anisotrópicos com alta conteúdo de solvente. Usando o método microbatch cresceram cristais tridimensionais após 2 meses de incubação. Os cristais de SPS2 de *T. brucei* difrataram 3,4 Å e pertencem ao grupo espacial $P6_422$ e parâmetros de cela de $a=110,69\text{Å}$, $b=110,69\text{Å}$ and $c=142,93\text{Å}$. Estes foram os primeiros dados cristalográficos da enzima SPS2 de parasitas.

A primeira estrutura cristalográfica da SPS foi de *Aquifex Aeolicus* com fragmento N-terminal truncado. As selenofosfato sintetases possuem uma região N-terminal flexível devido ao loop rico em Glicina. O comprimento inteiro da estrutura de *A. aeolicus* mostra evidências que este loop alterna entre conformação aberta e fechada dependendo da ocupação do seu sítio de ligação. Provavelmente a flexibilidade desta região permite grandes mudanças

conformacionais, sugerindo que este *loop* N-terminal pode estar envolvido em um mecanismo de entrega do selenofosfato. A perda dos resíduos 1 a 69 de SPS2 de *L. major* em Δ N-*LmSPS2* resultou em cristais que difratam em maior resolução do que quando comparado com a SPS2 *T. brucei*. Esses resultados indicam que a flexibilidade da região N-terminal interfere com contatos proteína-proteína durante a cristalização. Um estudo detalhado da sequência N-terminal de SPS foi necessária para entender a importância desta região e sua participação no mecanismo catalítico de SPS2. Esses estudos foram realizados pelo método de complementação funcional com as proteínas truncadas o que mostrou três resíduos conservados (L, T e Y) e nunca reportados até então na literatura como essencial para a função de SPS2. Isto foi confirmado por mutações pontuais que renderam proteínas não funcionais. Possivelmente por esses resíduos estarem participando do provável túnel de entrega do selenofosfato ou da interface de interação com a enzima que recebe o selenofosfato.

Os resíduos catalíticos Sec/Cys de SPS (correspondente a Cys46 e Cys42 em *LmSPS2* e *TbSPS2*, respectivamente) estão localizado na região N-terminal de SPS2 de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. Na construção Δ N69-*LmSPS2* este resíduo é perdido, entretanto, foi reportado por Itoh e colaboradores⁷⁸ que este resíduo não é essencial para a ligação do ATP. Isto mostra que embora as enzimas truncadas não são funcionais para a formação de selenofosfato, elas podem possuir atividade de hidrólise de ATP. Isto poderá ser melhor analisado em ensaios de atividade de ATPase das SPS2 selvagens, truncadas e mutadas pontualmente.

Além disso, complementando os ensaios de atividade de ATPase, estudos estruturais com as proteínas mutadas precisam ser realizados para investigar melhor a função desses resíduos no mecanismo de catálise da SPS2.

Referências

- 1 YAMEY, G.; HOTEZ, P. Neglected tropical diseases. **BMJ -British Medical Journal**, v. 335, n. 7614, p. 269–270, 2007.
- 2 REY, L. **Parasitologia**: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2001.
- 3 SIMARRO, P.P. et al. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 2, p. e1007, 2011.
- 4 KENNEDY, P.G.E. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 186–194, 2013.
- 5 WILLIAMS, B.I. **African trypanosomiasis**. the welcome trust illustrated history of tropical diseases. London: The Wellcome Trust, 1996. p.178–191.
- 6 KENNEDY, P.G. **The fatal sleep**. Edinburgh: Luath Press, 2012.
- 7 PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2007
- 8 ALVAR, J. et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31, p. B244–249, 2013. Supplement 2.
- 9 ADLER, S.; BER, M. Transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. **Nature**, v. 148, n. 3747, p. 227–227, 1941.
- 10 LABORATORY identification of parasites of public health concern. 2013. Disponível em: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm>>. Acesso em: 10 de Outubro de 2013.
- 11 CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167–176, 2010.

12 TROFAST, J. Berzelius's Discovery of Selenium. **Chemistry International**, v. 33, n. 5, p. 16-19, 2011.

13 MEHDI, Y. et al. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. **Molecules Basel Switzerland**, v. 18, n. 3, p. 3292–3311, 2013.

14 FRANKE, K.W.; MOXON, A. L. A comparison of the minimum fatal doses of selenium, tellurium, arsenic and vanadium. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 58, p. 454-459, 1936.

15 SCHWARTZ, K.; FOLTZ, S.M. Se as an integral part of factor 3 against necrotic liver degeneration. **Journal Mountain Chemical Society**, v. 79, n. 12, p. 3292-3293, 1957.

16 COMBS, S. B.; COMBS, G. F. **The role of selenium in nutrition**, New York: Elsevier Academic Press Inc., 1986.

17 ROTRUCK, J.T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science (New York)**, v. 179, n. 4073, p. 588–590, 1973.

18 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005: Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (idr) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 Set. 2005.

19 KOHRLE, J. et al. Selenium in biology: facts and medical perspectives. **Biological Chemistry**, v. 381, n. 9-10, p. 849-864, 2000.

20 GLADYSHEV, V. N. Selenium in biology and human health: controversies and perspectives. In: HATFIELD, D. L. (Ed.). **Selenium: its molecular biology and role in human health**. Norwell, Mass: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 313-317.

21 THOMPSON, H.J. Role of low molecular weight, selenium-containing compounds in human health. In: HATFIELD, D. L. (Ed.). **Selenium: its molecular biology and role in human health**. Norwell, Mass: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 283-297.

22 VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999. p. 851-861.

23 HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. How Selenium has altered our understanding of the genetic code. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 11, p. 3565-3576, 2002.

24 FORCHHAMMER, K.; BOECK, A. Biology and biochemistry of the element selenium. **Naturwissenschaften**, v. 78, n. 11, p. 497-504, 1991.

25 PETTERSEN, E.F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

26 STADTMAN, T.C. Selenocysteine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 83-100, 1996. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.000521.

27 BAO, Y.P.; WILLIAMSON, G. Selenium-dependent glutathione peroxidases - a highlight of the role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in protection against oxidative damage. **Progress in Natural Science**, v. 10, n. 5, p. 321-330, 2000.

28 SCHMIDT, R.L.; SIMONOVIĆ, M. Synthesis and decoding of selenocysteine and human health. **Croatian Medical Journal**, v. 53, n. 6, p. 535-550, 2012.

29 AKESSON, B. et al. Purification of selenoprotein P from human plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1204, n. 2, p. 243-249, 1994.

30 MOSTERT, V. Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 376, n. 2, p. 433-438, 2000.

31 FAIRWEATHER-TAIT, S.J. et al. Selenium bioavailability: current knowledge and future research. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 5, p.1484S-1491S, 2010.

32 SMALL-HOWARD, A.L.; BERRY, M.J. Unique features of selenocysteine incorporation function within the context of general eukaryotic translational processes. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, n. 6, p. 1493-1497, 2005.

33 STADTMAN, T.C. Selenium-dependent enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 93-110, 1980. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.000521.

34 BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**, v. 4, n. 2B, p. 593-599, 2001.

35 LU, C. et al. Identification and characterization of selenoprotein K: an antioxidant in cardiomyocytes. **FEBS Letters**, v. 580, n. 22, p. 5189–5197, 2006.

36 HATFIELD, D.L. et al. Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 50, p. 42937–42948, 2011

37 DIKIY, A. et al. SelT, SelW, SelH, and Rdx12: genomics and molecular insights into the functions of selenoproteins of a novel thioredoxin-like family. **Biochemistry**, v. 46, n. 23, p. 6871–6882, 2007.

38 SENGUPTA, A. et al. Selenoprotein T deficiency alters cell adhesion and elevates selenoprotein W expression in murine fibroblast cells. **Biochemistry and Cell Biology = biochimie et biologie cellulaire**, v. 87, n. 6, p. 953–961, 2009.

39 GRUMOLATO, L. et al. Selenoprotein T is a PACAP-regulated gene involved in intracellular Ca²⁺ mobilization and neuroendocrine secretion. **The FASEB Journal** v. 22, n. 6, p. 1756–1768, 2008.

40 TANGUY, Y. et al. The PACAP-regulated gene selenoprotein T is highly induced in nervous, endocrine, and metabolic tissues during ontogenetic and regenerative processes. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4322–4335, 2011.

41 LOBANOV, A. V. et al. Selenium metabolism in Trypanosoma: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 14, p. 4012–4024, 2006.

42 YOSHIKAWA, S.; BÖCK, A. The many levels of control on bacterial selenoprotein synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1404–1414, 2009.

43 PAPP, L.V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775–806, 2007.

44 BARON, C. et al. Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA(Sec) from Escherichia coli. Comparison with canonical tRNA(Ser). **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 2, p. 274–292, 1993.

45 STOCK, T. et al. In vivo requirement of selenophosphate for selenoprotein synthesis in archaea. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 149–160, 2010.

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

47 GLASS, R.S. et al. Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12555–12559, 1993.

48 COBUCCI-PONZANO, B. et al. Recoding in archaea. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 339–348, 2005.

49 BERRY, M.J. et al. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. **Nature**, v. 353, n. 6341, p. 273–276, 1991.

50 BERRY, M.J. et al. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 8, p. 3315–3322, 1993.

51 ROTHER, M. et al. Selenoprotein synthesis in archaea. **BioFactors**, v. 14, n. 1-4, p. 75–83, 2001.

52 CHEN, G.F. et al. Effect of the relative position of the UGA codon to the unique secondary structure in the fdhF mRNA on its decoding by selenocysteinyl tRNA in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 31, p. 23128–23131, 1993.

53 ROTHER, M. et al. Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 900–908, 2001.

54 LI, C. et al. The bulged nucleotide in the *Escherichia coli* minimal selenocysteine insertion sequence participates in interaction with SelB: a genetic approach. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 22, p. 6302–6307, 2000.

55 EHRENREICH, A. et al. Selenoprotein synthesis in *E. coli*. purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 206, n. 3, p. 767–773, 1992.

56 THANBICHLER, M.; BÖCK, A. The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*. **EMBO Journal**, v. 21, n. 24, p. 6925–6934, 2002.

57 STOCK, T.; ROTHER, M. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1520–1532, 2009.

58 GUIMARÃES, M.J. et al. Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15086–15091, 1996.

59 FORCHHAMMER, K et al. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. **Nature**, v. 342, n. 6248, p. 453–456, 1989.

60 FAGEGALTIER, D. et al. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 17, p. 4796–4805, 2000.

61 XU, X.-M. et al. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 115–120, 2007.

62 TAMURA, T. et al. Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16162–16167, 2004.

63 KERNEBECK, T. et al. A bioinformatical approach suggests the function of the autoimmune hepatitis target antigen soluble liver antigen/liver pancreas. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 34, n. 2, p. 230–233, 2001.

64 GELPI, C. et al. Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9739–9743, 1992.

65 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**, v. 103, n. 50, p. 18923–18927, 2006.

66 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**, v. 101, n. 35, p. 12848–12853, 2004.

67 SMALL-HOWARD, A. et al. Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 6, p. 2337–2346, 2006.

68 IRIBAR, M.P. et al. A processed short transcript of Leishmania, ODD1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 205–208, 2003.

69 CASSAGO, A. et al. Identification of Leishmania selenoproteins and SECIS element. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 128–134, 2006.

70 COPELAND, P.R. et al. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 2, p. 306–314, 2000.

71 LASKOWSKI, R.A. et al. Validation of protein models derived from experiment. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 98, p. 631–639, 1998.

72 SU, D. et al. How an obscure archaeal gene inspired the discovery of selenocysteine biosynthesis in humans. **IUBMB Life**, v. 61, n. 1, p. 35–39, 2009.

73 SCULACCIO, S.A. et al. Selenocysteine incorporation in Kinetoplastid: selenophosphate synthetase (SELD) from Leishmania major and Trypanosoma brucei. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 162, n. 2, p. 165–171, 2008.

74 AEBY, E. et al. The selenoproteome is dispensable in bloodstream forms of Trypanosoma brucei. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 2, p. 191–193, 2009.

75 COSTA, F.C. et al. Oxidative stress protection of Trypanosomes requires selenophosphate synthase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 47–50, 2011.

76 MATSUMOTO, E. et al. Structure of an N-terminally truncated selenophosphate synthetase from Aquifex aeolicus. **Acta Crystallographica F**, v. 64, n. 6, p. 453–458, 2008.

77 LI, C. et al. X-ray crystal structure of aminoimidazole ribonucleotide synthetase (PurM), from the Escherichia coli purine biosynthetic pathway at 2.5 Å resolution. **Structure**, v. 7, n. 9, p. 1155–1166, 1999.

78 ITOH, Y. et al. Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 5, p. 1456–1469, 2009.

79 WANG, K.-T. et al. Crystal structures of catalytic intermediates of human selenophosphate synthetase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 4, p. 747–759, 2009.

80 KIM, I.Y.; VERES, Z.; et al. Escherichia coli mutant SELD enzymes. The cysteine 17 residue is essential for selenophosphate formation from ATP and selenide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 19650–19654, 1992.

81 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry**: part II - techniques for the study of biological structure and function. New York: Freeman and Co., 1980.

82 DICHROWEB. On-line analysis for protein Circular Dichroism spectra. Disponível em: <<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>>. Acesso em: 10 jun. 2012.

83 BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic light scattering**. New York: Wiley Interscience, 1976.

84 EUROPE Molecular Biology Laboratory (EMBL). Disponível em: <<http://www.embl-hamburg.de/research/unit/svergun/>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

85 SVERGUN, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, n. 4, p. 495–503, 1992.

86 GUINIER, A.; FOURNET, G. Small angle scattering of X-rays. **Journal of Polymer Science**, v. 1, n. 2, p. 268, 1955.

87 GLATTER, O. Determination of particle-size distribution functions from small-angle scattering data by means of the indirect transformation method. **Journal of Applied Crystallography**, v. 13, n. 1, p. 7–11, 1980.

88 SEMENYUK, A. V.; SVERGUN, D.I. GNOM – a program package for small-angle scattering data processing. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n. 5, p. 537–540, 1991.

89 KELLERMANN, G. et al The small-angle x-ray scattering beamline of the Brazilian synchrotron light laboratorys. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, n. 2, p. 880–883, 1997.

90 HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D**: an introduction and overview. Grenoble: ERSF, 1997. Internal report.

91 PETOUKHOV, M. V. et al. 2.1 – towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v, 40, s223–s228, 2007. Supplement

92 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101–109, 2010.

93 SVERGUN, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2879–2886, 1999.

94 KOZIN, M.B.; Svergun, D.I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, n. 1, p. 33–41, 2001

95 DELANO, W.L. The PyMOL molecular graphics system. version 1. 2002. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

96 SÁNCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. **Methods in Molecular Biology**, v. 143, p. 97–129, 2000. doi: 10.1385/1-59259-368-2:97.

97 RAVEH, B.; LONDON, N.; et al. Rosetta FlexPepDock ab-initio: simultaneous folding, docking and refinement of peptides onto their receptors. **PLoS one**, v. 6, n 4, p. e18934, 2011.

98 SVERGUN, D., BARBERATO, C.; KOCH, M.H.J. CRY SOL – a Program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 6, p. 768–773, 1995.

99 LEBOWITZ, J. et al. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067–2079, 2002.

100 SEDNTERP. Disponível em: < <http://www.jphilo.mailway.com/download.htm> >. Acesso em: 10 maio 2011.

101 SCHUCK, P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 3, p. 1606–1619, 2000.

102 SCHUCK, P. et al. Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. **Biophysical journal**, v. 82, n. 2, p. 1096–1111, 2002.

103 BORGES, J.C.; RAMOS, C.H.I. Analysis of molecular targets of Mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 1276–1285, 2011.

103 BERGFORS, T. E. **Protein Crystallization**. La Jolla, Calif International University Line, 2008.

105 D'ARCY, A. et al. An automated microseed matrix-screening method for protein crystallization. **Acta Crystallographica D**, v. 63, n. 4, p. 550–554, 2007.

106 WALTER, T.S. et al. Semi-automated microseeding of nanolitre crystallization experiments. **Acta Crystallographica F**, v. 64, n. 1, p. 14–18, 2008.

107 HARP, J.M. et al. Macromolecular crystal annealing: overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography. **Acta Crystallographica D**, v. 54, n. 4, p. 622–628, 1998.

108 HARP, J.M.; HANSON, B.L.; et al. Macromolecular crystal annealing: evaluation of techniques and variables. **Acta Crystallographica D**, v. 55, n. 7, p. 1329–1334, 1999.

109 HERAS, B.; MARTIN, J.L. Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. **Acta Crystallographica D**, v. 61, n. 9, p. 1173–1180, 2005.

110 KACHALOVA, G.S. et al. Comparison of structures of dry and wet hen egg-white lysozyme molecule at 1.8 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 284, n. 1, p. 91–94, 1991.

111 SANCHEZ-WEATHERBY, J. et al. Improving diffraction by humidity control: a novel device compatible with X-ray beamlines. **Acta Crystallographica D**, v. 65, n. 12, p. 1237–1246, 2009.

112 WARD, J.J. et al. The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. **Bioinformatics**, v. 20, n. 13, p. 2138–2139, 2004.

- 113 COHEN, S.L. et al. Probing the solution structure of the DNA-binding protein Max by a combination of proteolysis and mass spectrometry. **Protein Science**, v. 4, n. 6, p. 1088–1099, 1995.
- 114 GAO, X. et al. High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation. **Journal of Structural and Functional Genomics**, v. 6, n. 2-3, p. 129–134, 2005.
- 115 MALAWSKI, G.A. et al. Identifying protein construct variants with increased crystallization propensity--a case study. **Protein Science**, v. 15, n. 12, p. 2718–2728, 2006.
- 116 WALTER, T.S. et al. Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. **Structure**, v. 14, n. 11, p. 1617–1622, 2006.
- 117 KIM, Y. et al. Large-scale evaluation of protein reductive methylation for improving protein crystallization. **Nature Methods**, v. 5, n. 10, p. 853–854, 2008.
- 118 BATTYE, T.G.G. et al. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. **Acta Crystallographica D**, v. 67, n. 4, p. 271–281, 2011.
- 119 EVANS, P.R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta Crystallographica D**, v. 67, n. 4, p. 282–292, 2011.
- 120 COWTAN, K. et al. From crystal to structure with CCP4. **Acta Crystallographica D**, v. 67, n. 4, p. 233–234, 2011.
- 121 ADAMS, P.D. et al. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. **Methods**, v. 55, n. 1, p. 94–106, 2011.
- 122 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 2010.
- 123 MCCOY, A.J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.
- 124 CHEN, V.B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2010.

125 KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Detection of protein assemblies in crystals. **Computational Life Sciences**, v. 3695, p. 163–174, 2005. doi: 10.1007/11560500_15

126 LASKOWSKI, R.A. et al. PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 488–490, 1997.

127 NOINAJ, N. et al. Structural Insights into the catalytic mechanism of Escherichia coli selenophosphate synthetase. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 499–508, 2012.

128 NOTREDAME, C. et al. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. **Journal of Molecular Biology**, v. 302, n. 1, p. 205–217, 2000.

129 GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305–308, 1999.

130 PETREK, M.; OTYEPKA, M.; et al. CAVER: a new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. **BMC bioinformatics**, v. 7, p. 316, 2006. doi:10.1186/1471-2105-7-316.

Anexo

Anexo

**Participação em artigos publicados durante o
período em questão**

Livia Maria Faim,^a Ivan Rosa e Silva,^a Marcio Vinicius Bertacine Dias,^{b,c} Humberto D'Muniz Pereira,^a José Brandao-Neto,^d Marco Túlio Alves da Silva^a and Otavio Henrique Thiemann^{a*}

^aInstitute of Physics, University of São Paulo, Avenida Trabalhador São-carlense 400, 13566-590 São Carlos-SP, Brazil, ^bDepartment of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, England, ^cBrazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center of Research in Energy and Materials (CNPEM), Caixa Postal 6192, 13083-970 Campinas-SP, Brazil, and ^dDiamond Light Source, Harwell Science and Innovation Campus, Didcot OX11 0DE, England

Correspondence e-mail: thiemann@ifsc.usp.br

Received 5 March 2013

Accepted 27 May 2013

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of selenophosphate synthetases from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*

Selenophosphate synthetase (SPS) plays an indispensable role in selenium metabolism, being responsible for catalyzing the activation of selenide with adenosine 5'-triphosphate (ATP) to generate selenophosphate, the essential selenium donor for selenocysteine synthesis. Recombinant full-length *Leishmania major* SPS (*LmSPS2*) was recalcitrant to crystallization. Therefore, a limited proteolysis technique was used and a stable N-terminal truncated construct (Δ N-*LmSPS2*) yielded suitable crystals. The *Trypanosoma brucei* SPS orthologue (*TbSPS2*) was crystallized by the microbatch method using paraffin oil. X-ray diffraction data were collected to resolutions of 1.9 Å for Δ N-*LmSPS2* and 3.4 Å for *TbSPS2*.

1. Introduction

Selenophosphate synthetase (SPS; EC 2.7.9.3) is a central enzyme in selenocysteine (Sec) biosynthesis (Leinfelder *et al.*, 1990; Donovan & Copeland, 2010), catalyzing the production of monoselenophosphate (SeP). The reaction occurs by the activation of selenide with ATP and water, in a 1:1:1 stoichiometry, resulting in the formation of adenosine 5'-monophosphate (AMP), orthophosphate (P_i) and the biologically active form of selenium, monoselenophosphate (SeP) (Glass *et al.*, 1993; Veres *et al.*, 1994; Noinaj *et al.*, 2012).

Recent reports have demonstrated that SeP is derived from the transfer of the γ -phosphate group of ATP to selenide, while the β -phosphate group is released as orthophosphate (Itoh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Noinaj *et al.*, 2012).

SPSs are found in all domains of life (Su *et al.*, 2009) and have a conserved cysteine or selenocysteine residue in the N-terminal glycine-rich region corresponding to the catalytic site (Persson *et al.*, 1997; Sculaccio *et al.*, 2008). The kinetoplastid SPSs from *Trypanosoma brucei* (*TbSPS2*) and *Leishmania major* (*LmSPS2*), which share 26 and 28% amino-acid sequence identity with the *Escherichia coli* orthologue, respectively, are not selenoproteins (Sculaccio *et al.*, 2008), in contrast to the mammalian SPS2 selenoprotein. Initially considered to be irrelevant for *T. brucei* metabolism (Aeby *et al.*, 2009), *TbSPS2* is indeed involved in oxidative stress protection. In this organism, *Sps2* silencing reduced cell viability under hydrogen peroxide treatment or excessive growth, establishing its importance in cellular metabolism (Costa *et al.*, 2011).

Crystal structures have been reported of *Aquifex aeolicus* SPS (*AaSPS*; 27 and 29% amino-acid sequence identity to *TbSPS2* and *LmSPS2*, respectively) in the apo form and in complex with the nonhydrolyzable AMPCPP (α,β -methyleneadenosine 5'-triphosphate) (Matsumoto *et al.*, 2008; Itoh *et al.*, 2009). For human SPS1 (*HsSPS1*; 42% amino-acid sequence identity to both *TbSPS2* and *LmSPS2*), structures of complexes with AMPCPP, ADP and P_i products have been reported (Wang *et al.*, 2009). Recently, the structure of the *E. coli* SPS (*EcSPS*) C17S mutant (the mutation site corresponds to positions Cys42 and Cys46 in *TbSPS2* and *LmSPS2*, respectively) was solved in the apo form (Noinaj *et al.*, 2012). In these structures, metal ions such as Na⁺ and K⁺ were demonstrated to mediate the binding of the highly electronegative substrate phosphate group. In *AaSPS* structures, both open and closed forms of the N-terminal Gly-rich loop have been observed and there is evidence

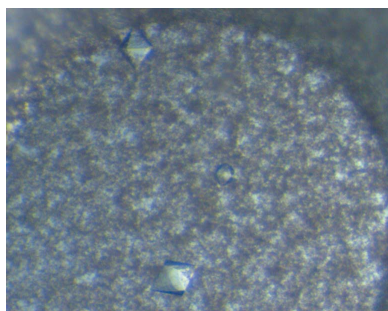


Table 1
Data-collection statistics for ΔN -*Lm*SPS2 and *Tb*SPS2.

Values in parentheses are for the outermost resolution shell.

	ΔN - <i>Lm</i> SPS2	<i>Tb</i> SPS2
Data-collection parameters		
X-ray source	DLS beamline I04-1	DLS beamline I04-1
Wavelength (Å)	0.92	0.92
Detector	PILATUS 2M	PILATUS 2M
Crystal-to-detector distance (mm)	237.0	325.2
Oscillation range per image (°)	0.25	0.35
No. of images	600	400
Crystal parameters		
Space group	<i>I</i> 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 6 ₃ 22
No of molecules in asymmetric unit	1	1
Unit-cell parameters (Å)	<i>a</i> = 55.95, <i>b</i> = 81.69, <i>c</i> = 177.92	<i>a</i> = <i>b</i> = 110.69, <i>c</i> = 142.93
Solvent content (%)	57.21	58.18
<i>V</i> _M (Å ³ Da ⁻¹)	2.87	2.94
Resolution range (Å)	40.97–1.88 (1.98–1.88)	57.29–3.40 (3.60–3.40)
<i>R</i> _{p.i.m.} † (%)	3.8 (39.3)	2.2 (15.0)
<i>I</i> / <i>σ</i> (<i>I</i>)	11.4 (2.8)	20.7 (4.8)
Total No. of observations	167436 (24993)	134256 (10398)
No. of unique reflections	33416 (4849)	9061 (1285)
Multiplicity	5.0 (5.2)	13.1 (14.3)
Completeness (%)	97.7 (99.9)	99.9 (100.0)

† $R_{p.i.m.} = \sum_{hkl} \{1/[N(hkl) - 1]\}^{1/2} \sum_i |I_i(hkl) - (I(hkl))| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, where *I*(*hkl*) is the intensity of observation *i* of reflection *hkl* and *N*(*hkl*) is the redundancy of reflection *hkl* (Weiss & Hilgenfeld, 1997; Weiss *et al.*, 1998; Weiss, 2001).

that ATP binding, metal binding and the formation of their binding sites are interdependent (Itoh *et al.*, 2009). *Aa*SPS and *Hs*SPS1 are selective for monovalent cations, with a preference for K⁺ over Na⁺ or Li⁺ (Wang *et al.*, 2009).

Here, we report the first crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of SPS2 from the kinetoplastid parasites *L. major* and *T. brucei*, which are not selenoproteins. Our structures may provide new information on the reaction mechanism of these enzymes. Moreover, comparison of the *Tb*SPS2 and *Lm*SPS2 structures with those of *Aa*SPS, *Hs*SPS1 and *Ec*SPS may contribute to an understanding of the evolution of the selenocysteine-biosynthesis pathway.

2. Materials and methods

2.1. Overexpression and purification of *Lm*SPS2 and *Tb*SPS2

*Lm*SPS2 (UniProt code Q4Q0M0) and *Tb*SPS2 (UniProt code Q38A34) cloned into pET28a were transformed in *E. coli* BL21 (DE3) cells, expressed and purified by adapting a previously described protocol (Sculaccio *et al.*, 2008). Briefly, cells were grown in LB medium containing 50 µg ml⁻¹ kanamycin with agitation at 310 K until the OD at 600 nm of the cell culture reached 0.5–0.6. Protein expression was induced by the addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1.0 mM for 16 h under the same conditions. The cells were harvested by centrifugation at 4000g for 40 min and the cell pellet was suspended in 50 ml lysis buffer [50 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 1 mM β-mercaptoethanol and one tablet of Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)]. The cells were disrupted by six cycles of 30 s sonication at 35 W (550 Sonic Dismembrator) and 30 s resting on ice.

The cell lysate was clarified by centrifugation at 20 000g for 30 min (277 K) and the cleared supernatant was applied onto a 5 ml Ni Sepharose High Performance HisTrap HP column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer *A* (50 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoethanol, 10 mM imidazole). The column was

washed with ten column volumes of buffer *A* and the bound protein was eluted using a linear 0–500 mM imidazole gradient in buffer *A*. The eluted fractions (5 ml) were dialyzed against 1 l buffer *B* (50 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoethanol) for 16 h at 277 K. The protein was purified and the buffer exchanged for buffer *C* (50 mM Tris–HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoethanol) by size-exclusion chromatography using a HR 10/30 Superdex 200 column (GE Healthcare). The purity of each of the protein samples was verified by 15% SDS–PAGE and the proteins were concentrated to 5–10 mg ml⁻¹ for crystallization and *in situ* proteolysis experiments. The protein concentration was determined using a NanoDrop 2000c UV–Vis spectrophotometer (Thermo Scientific) at 280 nm using predicted extinction coefficients (calculated using *ProtParam*; <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005) of 28 920 and 34 755 M⁻¹ cm⁻¹ for *Lm*SPS2 and *Tb*SPS2, respectively. The purified recombinant proteins have additional 6×His tag and thrombin-cleavage site residues, resulting in molecular weights of 44.7 and 45.0 kDa and isoelectric points of 5.83 and 5.98 for *Lm*SPS2 and *Tb*SPS2, respectively.

2.2. *In situ* proteolysis and N-terminal sequencing of *Lm*SPS2

After unsuccessful efforts to crystallize full-length *Lm*SPS2, we used an *in situ* proteolysis technique, a strategy employed to rescue proteins that are recalcitrant to crystallization (Wernimont & Edwards, 2009). The JBS Floppy-Choppy kit (Jena Bioscience) was used according to the manufacturer's instructions with the following proteases: α-chymotrypsin, trypsin, subtilisin and papain. The best result was achieved using α-chymotrypsin incubated with 5 mg ml⁻¹ *Lm*SPS2 at an α-chymotrypsin:*Lm*SPS2 ratio of 1:50 (w:w) for 24 h at 291 K in buffer *C* and the generated fragments were analyzed by SDS–PAGE. The α-chymotrypsin-treated *Lm*SPS2 was purified by size-exclusion chromatography (Superdex 200 10/30 HR, GE Healthcare) and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane for N-terminal sequencing (Protein Sequence Analysis at the Department of Biochemistry, University of Cambridge). A new *Lm*SPS2 construct consisting of residues 70–398, Δ*N*-*Lm*SPS2, was cloned into the pET28a expression vector (Novagen) using the 5'-AGCATATGTCGGCAACGCTGGGCAGAAG-3' forward and 5'-AGCTCGAGTCACACCTCCACAATTTTCATACCCGTC-3' reverse primers.

2.3. Protein crystallization and data collection

For crystallization, the Δ*N*-*Lm*SPS2 (extinction coefficient of 27 305 M⁻¹ cm⁻¹ calculated using *ProtParam*; <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005) and *Tb*SPS2 recombinant proteins were concentrated to 10 mg ml⁻¹ in buffer *C*. Crystallization trials of the SPS2 proteins were set up in 96-well plates with commercial screens (Qiagen) using Honeybee (Digilab) and Crystal Phoenix (Art Robbins Instruments) robots for Δ*N*-*Lm*SPS2 and *Tb*SPS2, respectively. Optimization screens were carried out in 24-well plates using the hanging-drop vapour-diffusion technique with 1 µl well solution mixed with 1 µl protein solution at 10 mg ml⁻¹ in buffer *C*. The microbatch experiment for *Tb*SPS2 was carried out in Greiner microbatch plates (Hampton Research) prepared with 2 µl *Tb*SPS2 at 10 mg ml⁻¹ in buffer *C* mixed with 2 µl crystallization solution and 20 µl paraffin oil in each well and incubated at 291 K. The final crystallization conditions for Δ*N*-*Lm*SPS2 and *Tb*SPS2 were 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M trisodium citrate pH 5.2, 21% (w/v) PEG 4000 and 0.1 M trisodium citrate pH 5.6, 17% (w/v) PEG 3350, respectively. Crystals were cooled and stored in liquid nitrogen after rapid transfer to a cryoprotectant solution consisting of

their respective mother liquor with 25%(v/v) ethylene glycol for ΔN -*Lm*SPS2 crystals and 25%(v/v) MPD for *Tb*SPS2 crystals. X-ray diffraction data were collected from a single crystal at a wavelength of 0.92 Å (13 477 eV) on the I04-1 beamline at the Diamond Light Source (DLS), Harwell Science and Innovation Campus, Didcot, Oxfordshire, England (Lobley *et al.*, 2012). Integration and scaling of data were carried out using *MOSFLM* (Leslie, 2006) and *SCALA* (Winn, 2003; Evans, 2006). Data-collection and processing statistics for the crystals of ΔN -*Lm*SPS2 and *Tb*SPS2 are summarized in Table 1.

3. Results and discussion

As all attempts to crystallize *Lm*SP2 were unsuccessful, we applied *in situ* proteolysis, which has been demonstrated to be a successful approach to crystallization. This technique has demonstrated efficacy in rescuing proteins that are recalcitrant to crystallization. However, the initial crystals obtained were not suitable for X-ray diffraction experiments, probably owing to heterogeneous cleavage of the protein. Therefore, to obtain reproducible crystals we cloned the stable core of the *Lm*SPS2 protein, ΔN -*Lm*SPS2, which lacks residues 1–69, and it was obtained with high homogeneity.

N-terminal sequencing analysis of the approximately 36 kDa fragment allowed the identification of the cleavage point at the N-terminal flexible region. The resulting ΔN -*Lm*SPS2 protein yielded crystals (Fig. 1*a*) that diffracted to 1.9 Å resolution and

belonged to space group $I2_12_12_1$, with unit-cell parameters $a = 55.95$, $b = 81.69$, $c = 177.92$ Å. Matthews coefficient calculation using the cell-content analysis program from the *CCP4* suite is most consistent with one molecule per asymmetric unit ($V_M = 2.87$ Å³ Da⁻¹, 57.21% solvent content; Winn *et al.*, 2011; Matthews, 1968).

Initially, the crystals obtained of *Tb*SPS2 were anisotropic with a high solvent content. Using the microbatch method, a crystal of *Tb*SPS2 grew after two months of incubation and diffracted to 3.4 Å resolution (Fig. 1*b*). The space group was $P6_422$ and the unit-cell parameters were $a = b = 110.69$, $c = 142.93$ Å. The monomeric molecular weight of *Tb*SPS2 is 45 kDa and from the Matthews coefficient the crystal asymmetric unit contains one protein molecule, with a V_M of 2.94 Å³ Da⁻¹ and a solvent content of approximately 58.18%.

The first reported SPS structure from the thermophilic *A. aeolicus* was also obtained as an N-terminally truncated fragment (Matsumoto *et al.*, 2008). The selenophosphate synthetases possess a flexible N-terminal region owing to the Gly-rich loop (Itoh *et al.*, 2009). The full-length *A. aeolicus* structure shows that this loop alternates between an open and a closed conformation depending on the binding-site occupation. It is probable that the flexibility of this region allows large conformational changes, suggesting that this N-terminal loop is involved in a substrate-delivery mechanism (Itoh *et al.*, 2009). The lack of residues 1–69 of *Lm*SPS2 in ΔN -*Lm*SPS2 resulted in crystals that diffracted to a higher resolution compared with *Tb*SPS2. These results indicate that the flexibility of the N-terminal region of SPS2 interferes with protein–protein contacts during crystallization. A detailed study of the SPS N-terminal sequence is necessary to understand the importance of this region and its participation in the SPS catalytic mechanism.

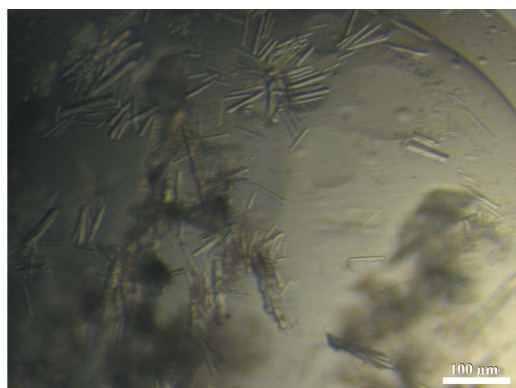
The catalytic residue Sec/Cys of SPS (corresponding to Cys46 and Cys42 in *Lm*SPS2 and *Tb*SPS2, respectively) is located in the N-terminal region of *Leishmania* and *Trypanosoma* SPS2. In the ΔN -*Lm*SPS2 construct this residue is missing; however, it has been reported (Itoh *et al.*, 2009) that this conserved residue is not essential for ATP binding. This shows that although the truncated enzyme is not functional for the formation of selenophosphate, it may retain ATP hydrolysis activity.

We are now working to determine the ΔN -*Lm*SPS2 phases by the molecular-replacement methodology as implemented in *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007) using the three-dimensional structure of human SPS1 (PDB entry 3fd5; Wang *et al.*, 2009), which shares 43% sequence identity with ΔN -*Lm*SPS2, as a search model. The structure of ΔN -*Lm*SPS2, with 66% amino-acid sequence identity, will be a good search model to solve the structure of *Tb*SPS2.

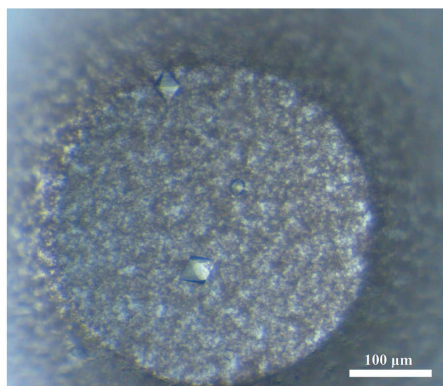
This research was supported in part by Research Grant 98/14138-2 from the Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP). We would like to express our gratitude to Dr Victor Bolanos-Garcia for help with the N-terminal sequencing analysis and to Dr Susana A. Sculaccio for technical help during this study. We also kindly acknowledge the support received from the Department of Biochemistry of the University of Cambridge and Professor Dr Tom Blundell and the technical assistance provided to us at the N-terminal sequencing facility.

References

- Aeby, E., Palioura, S., Pusnik, M., Marazzi, J., Lieberman, A., Ullu, E., Söll, D. & Schneider, A. (2009). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 5088–5092.
- Costa, F., Oliva, M., de Jesus, T., Schenkman, S. & Thiemann, O. (2011). *Mol. Biochem. Parasitol.* **180**, 47–50.
- Donovan, J. & Copeland, P. R. (2010). *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 881–892.
- Evans, P. (2006). *Acta Cryst. D* **62**, 72–82.



(a)



(b)

Figure 1
(a) ΔN -*Lm*SPS2 crystals observed in 0.2 M ammonium sulfate, 0.1 M trisodium citrate pH 5.2, 21%(w/v) PEG 4000 after 3 d. (b) *Tb*SPS2 crystals obtained after two months of incubation in 0.1 M trisodium citrate pH 5.6, 17%(w/v) PEG 3350 using the microbatch method (paraffin oil) in Greiner plates. These crystals were used for X-ray data collection.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). *The Proteomics Protocols Handbook*, edited by J. M. Walker, pp. 571–607. Totowa: Humana Press.
- Glass, R. S., Singh, W. P., Jung, W., Veres, Z., Scholz, T. D. & Stadtman, T. (1993). *Biochemistry*, **32**, 12555–12559.
- Itoh, Y., Sekine, S., Matsumoto, E., Akasaka, R., Takemoto, C., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. (2009). *J. Mol. Biol.* **385**, 1456–1469.
- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehlein, E. & Bock, A. (1990). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 543–547.
- Leslie, A. G. W. (2006). *Acta Cryst. D* **62**, 48–57.
- Lobley, C. M. C., Aller, P., Douangamath, A., Reddivari, Y., Bumann, M., Bird, L. E., Nettleship, J. E., Brandao-Neto, J., Owens, R. J., O'Toole, P. W. & Walsh, M. A. (2012). *Acta Cryst. F* **68**, 1427–1433.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Matsumoto, E., Sekine, S., Akasaka, R., Ota, Y., Katsura, K., Inoue, M., Kaminishi, T., Terada, T., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. (2008). *Acta Cryst. F* **64**, 453–458.
- Matthews, B. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Noinaj, N., Wattanasak, R., Lee, D. Y., Wally, J. L., Piszczek, G., Chock, P. B., Stadtman, T. C. & Buchanan, S. K. (2012). *J. Bacteriol.* **194**, 499–508.
- Persson, B. C., Böck, A., Jäckle, H. & Vorbrüggen, G. (1997). *J. Mol. Biol.* **274**, 174–180.
- Sculaccio, S., Rodrigues, E., Cordeiro, A., Magalhaes, A., Braga, A., Alberto, E. & Thiemann, O. (2008). *Mol. Biochem. Parasitol.* **162**, 165–171.
- Su, D., Hohn, M. J., Palioura, S., Sherrer, R. L., Yuan, J., Söll, D. & O'Donoghue, P. (2009). *IUBMB Life*, **61**, 35–39.
- Veres, Z., Kim, I. Y., Scholz, T. D. & Stadtman, T. C. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 10597–10603.
- Wang, K., Wang, J., Li, L. & Su, X. (2009). *J. Mol. Biol.* **390**, 747–759.
- Weiss, M. S. (2001). *J. Appl. Cryst.* **34**, 130–135.
- Weiss, M. S. & Hilgenfeld, R. (1997). *J. Appl. Cryst.* **30**, 203–205.
- Weiss, M. S., Metzner, H. J. & Hilgenfeld, R. (1998). *FEBS Lett.* **423**, 291–296.
- Wernimont, A. & Edwards, A. (2009). *PLoS One*, **4**, e5094.
- Winn, M. D. (2003). *J. Synchrotron Rad.* **10**, 23–25.
- Winn, M. D. *et al.* (2011). *Acta Cryst. D* **67**, 235–242.



The crystal structure of the cysteine protease Xylellain from *Xylella fastidiosa* reveals an intriguing activation mechanism



Ney Ribeiro Leite^{a,1,2}, Aline Regis Faro^{a,1,3}, Maria Amélia Oliva Dotta^a, Livia Maria Faim^a, Andreia Gianotti^b, Flavio Henrique Silva^b, Glaucius Oliva^a, Otavio Henrique Thiemann^{a,*}

^aInstituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP 13566-590, Brazil

^bDepartment of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP 13565-905, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2012

Revised 21 December 2012

Accepted 3 January 2013

Available online 17 January 2013

Edited by Stuart Ferguson

Keywords:

Cysteine protease

Xylellain

Crystal structure

Xylella fastidiosa

ABSTRACT

***Xylella fastidiosa* is responsible for a wide range of economically important plant diseases. We report here the crystal structure and kinetic data of Xylellain, the first cysteine protease characterized from the genome of the pathogenic *X. fastidiosa* strain 9a5c. Xylellain has a papain-family fold, and part of the N-terminal sequence blocks the enzyme active site, thereby mediating protein activity. One novel feature identified in the structure is the presence of a ribonucleotide bound outside the active site. We show that this ribonucleotide plays an important regulatory role in Xylellain enzyme kinetics, possibly functioning as a physiological mediator.**

Structured summary of protein interactions:

Xylellain and **Xylellain** bind by X-ray crystallography (View interaction)

© 2013 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Xylella fastidiosa is a gram-negative bacteria that colonizes exclusively the plant xylem vessels decreasing xylem flow compromising the plant development and are difficult (*fastidious*) to culture by standard bacteriological procedures [1–3]. Several economically important crops are affected by *X. fastidiosa* strains [4–8] that are transmitted by Homoptera (leafhoppers) insects [9,10]. In Brazil alone, citrus variegated chlorosis or CVC cause approximate annual losses to the citrus industry of US \$100 million [11] whose control is limited to crop management, infected branches pruning and plant eradication. The use of healthy seedlings and vector control are at present the only preventive measures available. The availability in 2000 of the *X. fastidiosa* clone 9a5c genome sequence [12] lead to a significant advance in the understanding of the bacterium metabolism [2,3]. From *X. fastidiosa* genome analysis a single cysteine protease was identified, Xylellain, and characterized as a cathepsin B like protease [13]. In this study, we solved the crystal structure of Xylellain, to a resolu-

tion of 1.65 Å. This structure revealed that the first 39 residues of the enzyme N-terminal sequence are attached to the active site and represent a regulatory pro-region. Surprisingly a ribonucleotide, UDP, is present in a hinge region and may play an important role in stabilizing the N-terminal pro-region, representing a potential enzyme activity modulator, sensing the bacteria physiological state.

2. Materials and methods

2.1. Recombinant Xylellain characterization

The expression and purification of the recombinant Xylellain protein was performed essentially as previously described [13] modified by the induction temperature reduced to 20 °C for 16 h and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) added to a final concentration of 0.1 mM selenomethionine incorporation for single-wavelength anomalous dispersion (SAD) experiments was performed by inhibition of methionine biosynthesis in M9 minimal medium (Sigma) supplemented by selenomethionine (Sigma) [14].

Point mutations R23A, F25A and R23A/F25A, were generated using the Gene Tailor™ Site-Directed Mutagenesis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions and the oligonucleotides: R23A, 5'-ATAGCTGATATTGCTGACTTTTCATACACC-3'; F25A, 5'-GATATTCGTGACGCTTCATACACCCAGAG-3'; R23A/F25A, 5'-ATAGCTGATATTGCTGACGCTTCATACACCC-3' and their complementary primer: R23A and R23A/F25A, 5'-ATAGGGTCTATATCGAC-

* Corresponding author. Fax: +55 1633739881.

E-mail address: thiemann@ifsc.usp.br (O.H. Thiemann).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda. Rodovia Itapira-Lindóia, km 14, Itapira, SP, Brazil.

³ Present address: Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble, France.

TATAA-3', F25A, 5'-TCTATATCGACTATAAGCACTG-3'. Mutant Xylellain proteins were expressed and purified as described.

Enzyme kinetic experiments were performed as described [13] in a WALLAC 1420 fluorimeter using carbobenzoxy-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Z-RF-MCA, Sigma) as substrate. The amount of active enzyme was determined by titration with E64 (N-[N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine) inhibitor [15].

2.2. Crystallization and data collection

Suitable crystals were obtained at 18 °C using the hanging-drop vapor diffusion technique in 60 mM sodium citrate (pH 5.6), 134 mM ammonium acetate and 20–22% (w/v) PEG 4000 and 7 mg/ml of Xylellain. The crystals were cryoprotected in the crystallization solution containing 15% (v/v) ethylene glycol and frozen to 100 K. A native data set was collected to 1.65 Å resolution, on a MAR345dtb image-plate detector using Cu K α radiation generated by a Rigaku Ultra-X 18 rotating-anode operating at 90 mA and 50 kV and focused using Osmic mirrors. Selenomethionine crystals were obtained by the hanging-drop vapor diffusion method in 100 mM MES (pH 5.6), 18% PEG 8000 and 6 mg/ml of Xylellain. Selenomethionine data sets were collected at the National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, Beamline X12B. Xylellain diffraction data for the Sel-Met crystal were indexed, integrated and reduced using HKL2000 package [16] while for the native crystal, the data processing was carried out using MOSFLM [17]. Intensities were scaled with SCALA from the CCP4 suite [18]. Data collection and processing statistics are provided in Table 1. Both native and selenomethionine crystals belong to space group P1 with similar cell dimensions and Matthew's coefficient [19] calculated to 2.16 Å³/Da with a solvent content of 43.02%.

2.3. Structure solution and refinement

Searches on the PDB database identified *Cathepsin S* and *F* [20,21] and *Cruzain* [22] as Xylellain homologues with 30% sequence identity. Molecular replacement attempts to solve the Xylellain structure with AmoRe [23], MOLREP [24] and PHASER

[25] were not successful justifying the use of selenomethionine isomorphous replacement methodology.

The selenomethionine Xylellain structure was solved by SAD method at the Se-K edge ($\lambda = 0.9792$). Eight selenium atoms per cell unit were found using SHELX package [26], initial phases were obtained with SOLVE [27] and improved by solvent flattening and density modification with 42% solvent content, followed by auto building routine with RESOLVE [28]. Residues of the initial model were checked according to their electronic density with COOT [29]. Initial phases were extended with sequential rounds of solvent flattening and density modification using the selenomethionine-containing and native data sets. Cycles of SOLVE-RESOLVE routine successfully traced and built 665 residues of the expected 1164, with an R_{factor} 43% and merit figure of 0.55. The remaining model was built manually with COOT followed by refinement with REFMAC [18]. Water molecules were added by COOT and the structure was validated using PROCHECK [30]. All pictures were created using PyMOL [31].

3. Results

3.1. Crystalline packing and overall structure

Both the selenomethionine and the native Xylellain crystals belong to the P1 space group, with similar unit cell parameters, containing four Xylellain monomers (chains A–D) (Fig. 1). A contact surface of 2018 Å² between chains A/B and C/D is stabilized by polar contacts involving a minimum of 19 residues of each monomer, 13 hydrogen bonds and 6 salt bridges. In this crystal packing the active site and the propeptide domain belong to the dimer interface in the A/B and C/D chains. The atomic contacts between chains A/B with C/D is characterized by fewer interactions.

The adopted residue numbering initiates at Met1 from Xylellain full length sequence (GenBank accession No. AE003869, locus_tag XF_0156, complement of position 159327–160142). Final refinement shows 1435 waters molecules and a ribonucleotide (UDP) molecule at each chain.

The first 22 and 23 N-terminal amino acid residues of chains A–D and B–C, respectively, representing the pET28a-derived sequence that include the hexahistidine-tag and thrombin site,

Table 1
Crystallographic data collection and refinement statistics.

Data set	Native	SelMet
Space group	P1	P1
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , and <i>c</i> (Å)	55.089, 69.31, 82.36	55.15, 69.21, 82.27
α , β , and γ (Å)	75.86, 75.43, 66.51	76.15, 75.67, 66.64
Wavelength (Å)	1.541	0.972
Resolution (Å)	78.66–1.65 (1.74–1.65)	50.00–1.83 (1.91–1.83)
R_{merge}^a (%)	5.4 (40.0)	5.4 (40)
I/σ (I)	9.9 (1.9)	15.1 (2.5)
Completeness (%)	91.0 (86.7)	99.5 (97.8)
Redundancy	8.1 (4.4)	4.8 (3.1)
No. of reflections observed	117070	86,291
No. of reflections unique	16,308	7651
Refinement		
Number of atoms	8578	–
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	16.85/21.59	–
r.m.s.d.		–
Bond angles (°)	2.082	–
Bond lengths (Å)	0.025	–
Ramachandran analysis (%/No.)		–
Most favored	88.7/800	–
Additional allowed	10.9/98	–
General allowed	0.4/4	–

Numbers in parentheses represent the highest resolution bin.

^a $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_l |I_{hl} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_l \langle I_h \rangle$, where I_{hl} is the intensity of the l th observation of reflection h and $\langle I_h \rangle$ are the mean intensity of the h reflections. R_{merge} is computed over all l observations of h reflection.

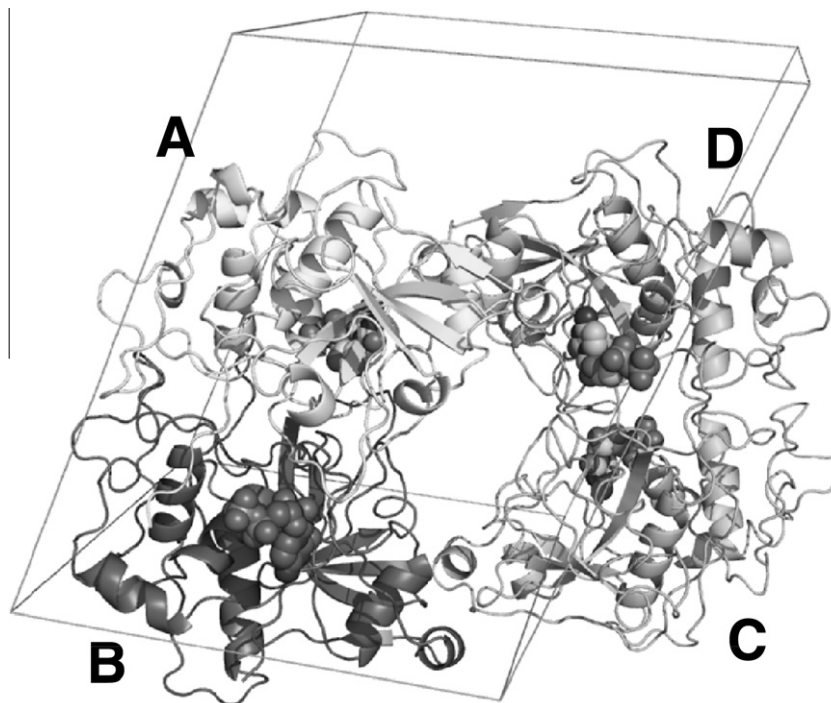


Fig. 1. Cartoon representation of the crystallographic packing of the Xylellain refined structure inside the cell unit. Each monomer, A, B, C and D of Xylellain is represented in ribbons with a diphosphate ribonucleotide in the ball-and-stick representation near the N-terminal region of each monomer.

the first two residues (MQ) of the Xylellain sequence and the last residue (Lys291) are not visible in the electron density maps. No differences were observed between the unit cell monomers as shown by the RMSD combination of structural superpositions 0.41 Å (AB); 0.43 Å (AC); 0.22 Å (AD); 0.29 Å (BC); 0.44 Å (BD); 0.43 Å (CD). The overall fold of Xylellain shows a core structure characteristic of the papain-like cysteine protease family [32] with a two domain arrangement, a predominantly α -helix N-terminal domain and a predominantly β -sheet C-terminal domain. The active site cleft is located at the domains interface.

3.2. The active-site cleft and N-terminal extension

The Xylellain active site is homologous to the papain family cysteine proteases, forming a cleft where the substrate peptide is fitted. The papain active site consists of seven subsites (S4, S3, S2, S1, S1', S2' and S4') that interact with seven amino acids (P4, P3, P2, P1, P1', P2', P3' and P4') of the substrate peptide (Fig. 2). Xylellain active site is characterized by four residues, Gln72, Cys78, Hys237 and Asn255, where Cys78, located at the N-terminal helix α 2, and Hys237 located at the strand β 4 form the catalytic dyad. Gln72 precedes the catalytic (Cys78) and is responsible for the formation of the oxy-anion pocket during the peptide bond hydrolysis. Asn255, acts correctly positioning the imidazole ring of His217 through a hydrogen bond between the N ϵ 2 of His237 and O δ 1 of Gln72. The active site cleft is blocked by the N-terminal sequence (Lys29 to Ile39) analogous to other papain family cysteine proteases [33].

Xylellain structure reveals an interesting N-terminal amino acids region close to the substrate binding site. The first segment (I) of the proregion (Thr23 to Arg28) does not interact directly with the protein. While a second segment (II) of ten residues (Lys29 to Ile39) is buried within the active site cleft, between the two protein domains forming a 990 Å² surface of interaction. The two segments (I and II) are separated by two residues, Gly32 and Gly34, enabling segment I to twist approximately 70 degrees relative to segment II

over the active site cleft. Segment II is stabilized by eighth hydrogen bonds (N ϵ Lys30-O Ser122-3.02 Å, N ϵ 1Trp284-O δ 2Asp38-2.83 Å; NAsp38-O δ 2Asp282-3.06 Å; Nlle36-OAla124-2.97 Å; N ϵ Arg43-O δ 1Asp41-2.87 Å; NH1Arg43-O δ 2Asp41-2.71 Å; NH2Arg186-O δ 2Asp38-2.8 Å; NH1Arg127-Olle39-2.93 Å) and amino acids Ser31, Tyr33, Tyr35, Ile36, Asp38 side chains interact with S2', S1', S1, S2 and S3 sites respectively [34] as seen in procathepsins B, K, L and Caricain [35–37]. The proregion hydrolysis is avoided by its positioning in the reverse direction in regard to the substrate peptide [38].

3.3. Ribonucleotide UDP

During the process of structure refinement, an unaccounted electron density was observed close to the helix α 4 and strand β 3 and the proregion residues Asp41, Arg43 and Phe45 in all four chains of the asymmetric unit. After careful analysis this electron density was identified to a ribonucleotide and the electron density contour at carbon C2' of the ribonucleotide pentose ring established that it is a ribose. The two pyrimidine ribonucleotide diphosphate, cytosine and uracil, can be modeled within this electron density and neither the monophosphate nor the triphosphate ribonucleotide satisfy the density map as well as the diphosphate. Analysis of the interactions between the ribonucleotide pyrimidine ring and Xylellain side chains suggests that the C4 oxygen of uracil can satisfy a hydrogen bond with the nitrogen of Tyr184 backbone, while the cytosine C4 nitrogen will not form such a bond. From these observations we propose that the nucleotide is a uridine diphosphate (UDP). An electron density omit map for the UDP is shown in Fig. 3. The UDP binding pocket is formed by Asp41, Arg43, Asp44, Phe45 and Lys131, Lys135, Tyr184. The first four from the proregion, Lys131 and Lys135 from helix α 4 and Tyr184 from strand β 3 (Fig. 3). The UDP pyrimidine ring is stacked between Phe45 and Tyr184 aromatic rings, hydrogen bonds are observed between the UDP O2 and O4 and the main chain nitrogen of Phe45 and Tyr184, respectively, and also between the N3 with

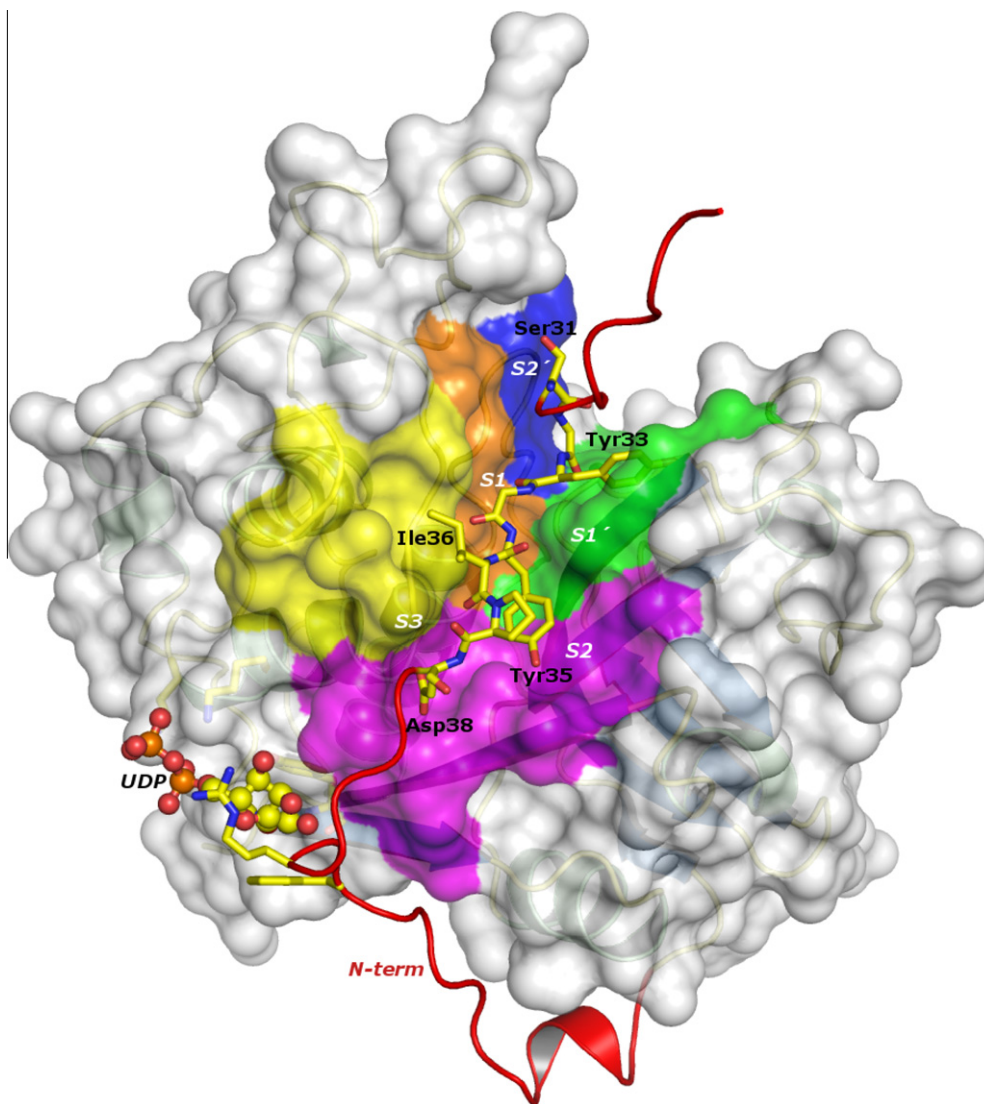


Fig. 2. Representation of the surface of Xylellain, showing the interaction between the proregion (red cartoon and yellow sticks) and the proregion-binding sites, S1' (green), S2' (blue), S1 (orange), S2 (magenta) and S3 (yellow). Stick representations show residues complementary to the substrate-binding site.

the main chain oxygen of Tyr184. The negative charged phosphate groups of UDP are accommodated by Lys131 and Lys135 from helix $\alpha 4$ and Arg43 from the proregion (Fig. 3).

The role of UDP in Xylellain is an intriguing topic. To our knowledge this is the first time a ribonucleotide is found in a protease. In an attempt to address its role, residues Arg43 and Phe45 were substituted for Ala by site-directed mutagenesis, generating the Xylellain Arg43Ala, Phe45Ala and the double mutant Arg43Ala/Phe45Ala and their kinetic parameters were compared with the native Xylellain (Table 2).

Comparison of the kinetic results indicate a more significant alteration of the k_m values from the native Xylellain for the double mutant Arg43Ala/Phe45Ala = 28(1) μM and the single mutant Phe45Ala = 124,6(9) μM , than the observed effect of the mutations on the k_{cat}/k_m values, that remain mostly constant and within the experimental error (Table 2).

4. Discussion

4.1. Structure of Xylellain

Xylellain shares a common fold with other cystein proteases. The 39 amino acid residues representing Xylellain propeptide is

analogous to other cystein proteases, like cathepsin B (3PBH), K (7PCK) and L (1BY8) [35,36] although shorter. Cystein proteases proregion form extensive contacts with a loop and a β -strand region on the protein surface, forming a structure called “Proregion Binding Loop” (PBL) [39]. These proregions are accommodated in the active site cleft mimicking the substrate interactions with the catalytic residues, however, self-cleavage is inhibited by its reverse orientation in relation to the substrate. The proregion can be divided in two segments (I and II). Segment I (Thr23 to Arg28) is free of the active site and could be a cellular signal sequence, while segment II (Lys29 to Ile39) fits in the active site and is stabilized by seven hydrogen bonds (Fig. 2) and Ser21, Tyr23, Tyr25, Ile26, Asp28 interaction with S2', S1', S1, S2 and S3 sites (Fig. 2).

One intriguing and novel aspect of this structure is the presence of a bound UDP. The pyrimidine ring identity was determined by the UDP fitting in the electron density map. The Xylellain side chains residues interaction with the pyrimidine ring show that uracil C4 oxygen satisfies the hydrogen bond with Tyr184 nitrogen, strengthening our initial identification. Cytosine C4 nitrogen would not form such a hydrogen bond.

The UDP binding pocket location, at the bent of the proregion leaving the active site cleft, decreases the flexibility of this region

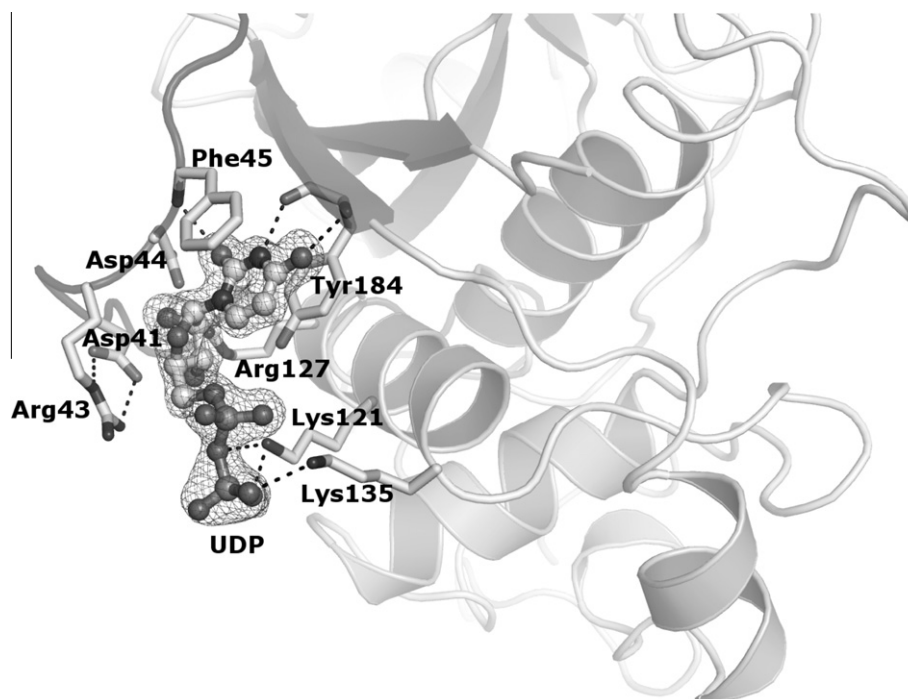


Fig. 3. UDP molecule interaction and identification. A σ -weighted $2\text{Fo} - \text{Fc}$ omit electron-density map is shown contoured at 1.0σ for the area surrounding the ligand (UDP). A hydrophobic pocket is formed by residues Phe45 and Tyr184 interacting the nitrogen base of UDP. Hydrogen bonds complement the nucleotide binding pocket. Positively charged residues Arg43, Lys131 and Lys135 form a large charged surface that interacts with the negatively charged phosphates of UDP. A hydrogen-bonding network (Asp41–Arg43, Asp44–Arg141) maintains the N-terminal proregion near the protein core.

Table 2
Comparison of enzyme kinetics between native and mutant Xylellain.

	k_m (μM)	k_{cat}/k_m ($1/\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Native Xylellain	69 ± 6	0.22 ± 0.2
Mutant Arg43Ala	35 ± 4	0.12 ± 0.1
Mutant Phe45Ala	124.6 ± 9	0.33 ± 0.3
Mutant Arg43Ala/Phe45Ala	28 ± 1	0.25 ± 0.2

as revealed by the mean b-factors of 16.6 \AA^2 of this region as compared to the overall structure of 22.8 \AA^2 . The position and the strong interactions of UDP with the proregion suggest a contribution to the N-terminal sequence fitting in the active site cleft.

The kinetic data (Table 2) revealed that mutations in the UDP binding pocket, that prevent the ribonucleotided stabilization, resulted in a strong k_m variation for the substrate, but maintain the k_{cat}/k_m values, suggesting that the UDP influences the substrate accessibility to the active site cleft not affecting catalytic efficiency (Table 2).

We hypothesize that UDP acts as a physiological regulator of the activation of Xylellain. Destabilization of this nucleotide as a result of cell signaling events would cause segment II of the proregion to lose its interaction with the cleft surface and leave the active site more exposed and accessible to the substrate. In contrast, in the presence of UDP, segment II would interact perfectly with the active site, preventing unwanted proteolysis. Our findings suggest a novel mechanism for the regulation of the activation of cysteine proteases.

4.2. Protein data bank accession code

Protein coordinates and structure factors were deposited on RCSB protein data bank under PDB code 3OIS.

Acknowledgements

The work was supported in part by the Research Grant 98/14138-2 to GO and NRL, MAOD, ARF, LMF and AG had student fellowships from the *Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo* (FAPESP). We would like to thank the members of the Protein Crystallography and Structural Biology Group (IFSC-USP) and Laboratory of Molecular Biology (DGE-UFSCar) for helpful discussions in the course of this work, Dr. Susana A. Sculaccio, José A. L. da Costa, José G. Catarino and Norma B. Saes for technical help. The data collection was performed at the “*RapiData2006*” at Brookhaven National Light Source with Thanks to Dr. Alexei Soares for data collection and Initial data processing and phasing assistance.

References

- [1] Purcell, A.H. and Hopkins, D.L. (1996) Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 131–151.
- [2] Lambais, M.R. et al. (2000) A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 459–462.
- [3] Koide, T. et al. (2004) DNA microarray based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strains of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J. Bacteriol.* 186, 5442–5449.
- [4] Rossetti, V. and De Negri, J.D. (1990) Clorose variegada dos citros – revisão. *Laranja* 11, 1–14.
- [5] Hendson, M. et al. (2001) Genetic diversity of Pierce’s disease and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2), 895–903.
- [6] Van Sluys, M.A. et al. (2003) Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce’s disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J. Bacteriol.* 3, 1018–1026.
- [7] Monteiro, P.B. et al. (2001) Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2263–2269.
- [8] Williams, P.H. (1980) The crucifer genetics cooperative. *Plant Dis.* 64, 11736–11742.
- [9] Brlansky, R.H. et al. (1983) Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Homalodisca coagulata*, by xylem limited bacteria. *Phytopathology* 73, 530–535.

- [10] Roberto, S.R. et al. (1996) Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. *Fitopatologia Brasileira* 21, 517–518.
- [11] De Souza, A.A. et al. (2003) Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 867–875.
- [12] Simpson, A.J.G. et al. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406, 151–157.
- [13] Nogaroto, V. et al. (2006) Recombinant expression and characterization of a *Xylella fastidiosa* cysteine protease differentially expressed in a nonpathogenic strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 261, 187–193.
- [14] Van Duynne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., et al. (1993) Atomic structure of FKBP-FK506, an immunosuppressant complex. *J. Mol. Biol.* 228, 105–124.
- [15] Matsumoto, K. et al. (1999) Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers Pept. Sci.* 51, 99–107.
- [16] Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymology* 276, 307–326.
- [17] Leslie, A.G.W. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image data. *Jt. CCP4 ESF-EADBM. Newsl. Protein Crystallogr.* 26, 27–33.
- [18] Collaborative computational project number 4 (1994) *Acta Crystallogr., Sec. D: Biol. Crystallogr.* 50, 760–763.
- [19] Matthews, B.M. (1968) The solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491–497.
- [20] Pauly, T.A. et al. (2003) Specificity determinants of human cathepsins revealed by crystal structures of complexes. *Biochemistry* 42, 3203–3213.
- [21] Somoza, J.R. et al. (2002) The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J. Mol. Biol.* 322, 559–568.
- [22] Gilmor, S.A. et al. (1997) Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci.* 6, 1603–1611.
- [23] Navazza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr., Sec. A: Found. Crystallogr.* 50, 157–163.
- [24] Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 1022–1025.
- [25] Read, R.J. (2001) Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr., Sec. D: Biol. Crystallogr.* 57, 1373–1382.
- [26] Schneider, T.R. and Sheldrick, G.M. (2002) Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr., Sec. D: Biol. Crystallogr.* 58, 1772–1779.
- [27] Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) Discrimination of solvent from protein regions in native Fouriers as a means of evaluating heavy-atom solutions in the MIR and MAD methods. *Acta Crystallogr., Sec. D: Biol. Crystallogr.* D55, 849–861.
- [28] Terwilliger, T.C. (2000) Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr., Sec. D: Biol. Crystallogr.* 56, 965–972.
- [29] Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr., Sec. D: Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
- [30] Laskowski, R.A. et al. (1998) Validation of protein models derived from experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8, 631–639.
- [31] Delano, W.L. (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.
- [32] Drenth, J. et al. (1968) Structure of Papain. *Nature* 218, 929–932.
- [33] Cygler, M. and Mort, J.S. (1997) Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 79 (11), 645–652.
- [34] Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157–162.
- [35] Turk, D. et al. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Å resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* 384, 211–214.
- [36] LaLonde, J. et al. (1999) The crystal structure of human procathepsin K. *Biochemistry* 38, 862–869.
- [37] Sivaraman, J. et al. (1999) Crystal structure of wild-type human procathepsin K. *Protein Sci.* 8, 283–290.
- [38] Wiederanders, B. (2003) Structure–function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim. Pol.* 50, 691–713.
- [39] Cygler, M. et al. (1996) Structure of ratprocathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure* 4 (4), 405–416.