

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ESTUDOS MOLECULARES DA SELENOCISTEÍNA SINTASE
(SELA) DE *ESCHERICHIA COLI*

Alexandre Cassago

SÃO CARLOS – SP
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

ESTUDOS MOLECULARES DA SELENOCISTEÍNA SINTASE
(SELA) DE *ESCHERICHIA COLI*

Alexandre Cassago

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

2005

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

C343em Cassago, Alexandre.
Estudos moleculares da Selenocisteína Sintase (SELA)
de *Escherichia coli* / Alexandre Cassago. -- São Carlos :
UFSCar, 2005.
87 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2005.

1. Biologia molecular. 2. Selenocisteína Sintase. 3.
Selenocisteína. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann
PROFESSOR ORIENTADOR

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Otavio Henrique Thiemann pela forma concisa e previdente na elaboração dos projetos destinados a seus alunos, bem como a sua mente aberta para novas parcerias o que possibilita uma maior explanação e aprendizagem frente aos novos desafios. Agradeço também pela confiança, atenção e amizade, fundamentais para realização desse trabalho e dos muitos outros ainda a serem realizados juntos.

Ao Laboratório de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos – USP, ao Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução – UFSCar, bem como a CAPES pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Rosemari A. T. Curilla , Regiane Ribeiro e Tatiane T. Callegario secretárias do Programa de Genética e Evolução pela dedicação e ajuda.

À Profa. Dra Íris Torriani e ao Dr. Cristiano L. P. de Oliveira do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pela pronta colaboração fundamental para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro S. de Araújo do Laboratório de Fármacos e Bioquímica da Universidade Federal de São Carlos pelo colaboração junto a produção de anticorpos policlonais.

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo do Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física – USP por sua atenção e sempre disponibilidade nas inúmeras discussões.

Às amigas Dra. Andréa S. Costa, Dra. Elisete Correa, Dra. Daniella NeoJustino, Dra. Sandra Pfister e mestra Patrícia A. Possik pela introdução à biologia molecular e formação ao longo de toda minha Iniciação Científica. A amizade

desenvolvida ao longo de todos esses anos foi fundamental em momentos decisivos da minha vida.

À amiga Dra. Raquel Kelly Bortoleto Bugs por suas aulas sobre purificação de proteínas e amizade ao longo da convivência no laboratório.

Ao amigo e companheiro de bancada Ney Ribeiro Leite pelas inúmeras discussões e trabalhos conjuntos.

Às amigas Elisandra M. Rodrigues e Susana A. Sculaccio pela amizade e apoio na chegada ao laboratório de Cristalografia.

Aos meus amigos do laboratório e fora dele pela ajuda, paciência e amizade.

À Carolina A. de Guzzi por suas sugestões e revisões, companheirismo, paciência e amor ao longo de nossas vidas.

À minha família: meu pai Hermínio Cassago Júnior pelo exemplo acadêmico, a minha mãe Maria Rita de Vasconcelos Cassago por sua personalidade estrovertida e forte e a minha irmã Ana Paula Cassago, por sua determinação. Todos modelos que tento seguir e moldar meu caráter, personalidade e vida durante o curto período de aprendizagem nesse mundo.

A Deus presente em todos os momentos de nossa vida.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema ilustrando o tRNA e suas respectivas regiões.....	02
Figura 1.2: Aminoacilação do tRNA por aaRSs.....	03
Figura 1.3: Aminoacil-tRNA sintetases.....	04
Figura 1.4: Representação dos aminoácidos Cisteína e Selenocisteína.....	05
Figura 1.5: Diagrama esquemático na forma de trevo da estrutura do tRNA ^{sec} _{uca}	06
Figura 1.6a: Etapas envolvidas na biossíntese e incorporação de selenocisteínas.....	08
Figura 1.6b: Esquema detalhado da conversão do aminoácido serina em selenocisteína pela enzima Selenocisteína Sintase (SELA).....	09
Figura 1.7: Seqüência de nucleotídeos e respectivos aminoácidos da proteína SELA.....	11
Figura 1.8: Imagens obtidas da proteína SELA pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão.....	12
Figura 1.9: Diagrama representativo do equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	17
Figura 1.10: Luz circularmente polarizada à direita.....	19
Figura 1.11: Espectros do dicroísmo circular.....	22
Figura 1.12: Diferença de fase entre raios incidentes e espalhados.....	24
Figura 1.13: Problema inverso do espalhamento.....	25
Figura 1.14: Curva de correlação entre a função p(r) altura e o número de linhas com comprimentos r e r+dr.....	26
Figura 1.15: Comparações entre funções de p(r) de uma esfera, um elipsóide prolato e um elipsóide oblato de mesmo raio de giro.....	27
Figura 4.1: Etapas envolvidas na purificação da proteína SELA de <i>Escherichia coli</i>	48
Figura 4.2: Esquema representativo da digestão do vetor pUC19-selC com a enzima <i>Bst</i> N1 e posterior transcrição <i>in vitro</i> do tRNA ^{sec} _{uca}	56
Figura 5.1: Amplificação do gene selA de <i>Escherichia coli</i>	57
Figura 5.2: Caracterização dos transformantes pET28a-selA e pET29a-selA.....	58
Figura 5.3: Alinhamento utilizando Blastn no modo Dot-Plot (NCBI) das seqüências selA clonadas nos respectivos vetores de expressão pET29a e pET28a.....	59
Figura 5.4: Expressão da proteína SELA.....	59
Figura 5.5: Etapas da purificação da proteína SELA anteriormente a sua aplicação em coluna aniônica DEAE Sepharose Fast Flow.....	60
Figura 5.6: Purificação da proteína SELA utilizando coluna aniônica DEAE Sepharose Fast Flow.....	61
Figura 5.7: Comparação dos rendimentos resultantes da purificação da proteína SELA utilizando as colunas aniônicas DEAE Sepharose Fast Flow e Hi Trap Q HP.....	62

Figura 5.8: Concentração da proteína SELA após purificação em coluna aniônica Hi Trap Q HP.....	63
Figura 5.9: Nova estratégia de purificação da proteína SELA utilizando colunas de troca iônica Hydroxyapatite e posterior Hi Trap Q HP.....	64
Figura 5.10: Titulação dos anticorpos anti-SELA produzidos em camundongos (<i>Mus musculus</i>).....	65
Figura 5.11: Immunoblotting utilizando anticorpo anti-SELA – 3 produzido em camundongos <i>Mus musculus</i> e extratos celulares de <i>Leishmania major</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Homo sapiens</i>	66
Figura 5.12: Ensaio de DLS utilizando proteína SELA purificada [0,1 mg/mL] diluída em tampão I' contendo 10% de glicerol.....	67
Figura 5.13: Espectro de CD utilizando proteína SELA purificada [0,1 mg/mL] diluída em tampão I' contendo 10% de glicerol.....	68
Figura 5.14: Curvas experimentais obtidas nos experimentos de SAXS para a proteína decamérica SELA:.....	69
Figura 5.15: Determinação da estrutura global da proteína decamérica SELA.....	70
Figura 5.16: Amplificação do gene de inserção selenocisteína tRNA ^{sec} _{uca} (selC).....	71
Figura 5.17: Caracterização dos transformantes pUC19-selC.....	72
Figura 5.18: Alinhamento utilizando Blastn no modo Dot-Plot (NCBI) da seqüência T7 – selC clonadas no vetor de clonagem pUC19.....	72
Figura 5.19: Transcrição <i>in vitro</i> do tRNA ^{sec} _{uca}	73
Figura 5.20: Amplificação por RT-PCR do gene de inserção selenocisteína tRNA ^{sec} _{uca}	74

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1.1: Enzimas aminoacil-tRNA sintetases.....	04
Tabela 4.1: Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene selA de <i>Escherichia coli</i> a partir de DNA genômico.....	37
Tabela 4.2: Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para seqüenciamento das clonagens do inserto selA nos respectivos vetores pGEM-T, pET28a+ e pET29a+.....	42
Tabela 4.3: Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene de Inserção Selenocisteína tRNA ^{sec} _{uca} + região promotora T7.....	54
Tabela 4.4: Programa utilizado na Reação de Transcrição Reversa para verificação do produto relativo a transcrição <i>in vitro</i> do tRNA ^{sec} _{uca}	56
Tabela 5.1: Desconvoluções obtidas pelo programa SELCON-2 a partir do espectro de CD.....	68
Tabela 5.2: Parâmetros obtidos a partir dos ensaios da proteína decamérica SELA (SAXS).....	70

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. O Ácido Ribonucléico Transportador (tRNA).....	1
1.2. Aminoacil-tRNA Sintetases	2
1.3. Mecanismo de Biossíntese e Incorporação do aminoácido Selenocisteína nas Proteínas em Procariontes.....	5
1.4. Selenocisteína Sintase (SELA)	10
1.5. Selênio	12
1.6. Selenoproteínas	13
1.7. Determinação Estrutural de Proteínas	16
1.7.1. Espalhamento Dinâmico de Luz.....	16
1.7.2. Dicroísmo Circular	18
1.7.3. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo	22
1.7.4. Difração de Raios X em Cristais de Proteínas	28
1.8. Desenvolvimento de Fármacos Capazes de Bloquear a Biossíntese de Selenocisteína.....	29
II. OBJETIVOS	31
III. JUSTIFICATIVA E PERSPECTIVAS	32
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. Materiais.....	34
4.2. Métodos.....	36
4.2.1. Amplificação do gene Selenocisteína Sintase (selA).....	37
4.2.2. Clonagem do inserto selA ao vetor pGEM-T	37
4.2.3. Clonagem do inserto selA aos vetores pET28a+ e pET29a+	38
4.2.4. Transformação de células <i>E. coli</i> competentes	39
4.2.5. Caracterização das cepas recombinantes.....	40
4.2.6. Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes	41
4.2.7. Primeiros ensaios de expressão da proteína SELA	42

4.2.8. Primeiros ensaios de purificação da proteína SELA	43
4.2.9. Padronização de um novo protocolo de purificação da proteína SELA	46
4.2.10. Esquemas de purificação utilizados	48
4.2.11. Produção de Anticorpos Policlonais anti-SELA	49
4.2.12. Titulação dos Anticorpos Produzidos	49
4.2.13. Busca de Formas Homólogas da Proteína SELA a partir de Anticorpos Policlonais	50
4.2.14. Determinação Estrutural da Proteína SELA	50
4.2.14.1. Espalhamento Dinâmico de Luz	50
4.2.14.2. Dicroísmo Circular	51
4.2.14.3. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo	52
4.2.15. Amplificação do gene de Inserção Selenocisteína-tRNA ^{sec} _{uca} (selC)	53
4.2.16. Clonagem do inserto selC em vetores de clonagem	54
4.2.17. Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes	55
4.2.18. Transcrição <i>in vitro</i> e purificação do tRNA ^{sec} _{uca}	55
4.2.19. Verificação do tRNA ^{sec} _{uca} transcrito por RT-PCR.....	56
V. RESULTADOS.....	57
5.1. Resultados referentes ao gene Selenocisteína Sintase (selA).....	57
5.1.1. Amplificação do gene selA	57
5.1.2. Caracterização dos transformantes pET28a-selA e pET29a-selA	57
5.1.3. Seqüenciamento dos recombinantes pET28a-selA e pET29a-selA	58
5.2. Resultados referentes à proteína Selenocisteína Sintase (SELA)	59
5.2.1. Primeiros ensaios de expressão da proteína SELA	59
5.2.2. Primeiros ensaios de purificação da proteína SELA	60
5.2.3. Padronização de um novo protocolo de purificação da proteína SELA	61
5.2.4. Titulação dos Anticorpos Produzidos	65
5.2.5. Busca de Formas Homólogas da Proteína SELA a partir de Anticorpos Policlonais	66
5.2.6. Espalhamento Dinâmico de Luz.....	66
5.2.7. Dicroísmo Circular	67

5.2.8. Difração de Raios X a Baixo Ângulo.....	69
5.3. Resultados referentes ao Selenocisteína-tRNA ^{sec} _{uca} (selC)	70
5.3.1 Amplificação do gene Selenocisteína-tRNA ^{sec} _{uca} (selC).....	70
5.3.2. Clonagem do inserto selC em vetores de clonagem	71
5.3.3. Seqüenciamento dos recombinantes pUC19-selC	72
5.3.4. Transcrição <i>in vitro</i> e purificação do tRNA ^{sec} _{uca}	73
VI. DISCUSSÃO.....	75
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS	79
VIII. REFERÊNCIAS	80

RESUMO

O estudo de processos de tradução atrai o interesse de diversos grupos de pesquisa pelo seu papel central no metabolismo geral da célula. Em particular o estudo da via de síntese de novos aminoácidos, como o selenocisteína e o pirrolisina, que resultam na expansão do código genético dos tradicionais 20 aminoácidos para atualmente um total de 22 aminoácidos. O aminoácido selenocisteína representa a principal forma biológica do elemento selênio, sendo sua síntese e sua incorporação co-traducional em selenoproteínas uma resposta a um códon de terminação UGA em fase de leitura através de uma complexa maquinaria molecular.

Em *Escherichia coli* as principais proteínas envolvidas nessa via são: Selenocisteína Sintase (SELA), Fator de Elongação de Selenocisteína (SELB ou EFSec), Selenofosfato Sintetase (SELD) além de um tRNA^{sec} próprio dessa via denominado tRNA de Inserção de Selenocisteína (SELC).

A proteína SELA alvo de estudo deste trabalho, foi primeiramente purificada por Forchhammer em 1991 e o único trabalho estrutural até agora realizado foi desenvolvido por Engelhardt em 1992, a partir da técnica de escaneamento por microscopia eletrônica de Transmissão (STEM). Possuindo um monômero de aproximadamente 50kDa a proteína SELA assume uma configuração espacial homodecamérica, em que cada dímero é capaz de ligar-se a um tRNA^{sec} portando o aminoácido serina que será convertido em selenocisteína, numa reação dependente do cofator enzimático piridoxal 5'fosfato.

Nesse trabalho foi possível o desenvolvimento de um novo protocolo de purificação para a proteína SELA, reduzindo consideravelmente os passos e conseqüente tempo na obtenção da proteína purificada. Também aumentando os rendimentos obtidos pela literatura, de 1mg/mL a partir de 10 litros, para aproximadamente 4,5mg/mL a partir de 3 litros de cultura bacteriana.

Quanto aos experimentos estruturais foi possível a partir de

Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) a predição da massa molecular em aproximadamente 442kDa, por Dicroísmo Circular (CD) a predição das estruturas secundárias como predominantemente constituída por hélices- α e experimentos de Espalhamento de raio X a Baixo Ângulo (SAXS), a determinação da estrutura global da proteína SELA com um diâmetro máximo de 185Å, sua massa molecular em aproximadamente 527kDa e um raio de giro de 67,3Å.

ABSTRACT

The study of translation processes attracts the interest of a wide range of research groups due to its main role in general cellular metabolism. In particular, the investigation of new amino acid residues, such as selenocysteine and pyrrolysine, which result in an expansion of the genetic code from the traditional 20 residues to a total of 22 residues up to the current time. The amino acid, selenocysteine represents the main biological form of the selenium element and its synthesis and co-translational incorporation into selenoproteins are due to an in-frame UGA stop codon using complex molecular machinery.

On *Escherichia coli*, the main proteins involved in this pathway are: Selenocysteine Synthase (SELA), Selenocysteine Elongation Factor (SELB or EFSec), Selenophosphate Synthetase (SELD) and a tRNA^{sec}_{uca} specific for this pathway named Selenocysteine Insertion tRNA (SELC).

The SELA protein, the subject of this study, was firstly purified by Forchhammer in 1991 and the sole structural analysis realized to this day was developed by Engelhardt in 1992, using the Scanning Transmission Electron Microscope (STEM) technique. With a monomer of approximately 50kDa, SELA assumes an homodecamerical spatial configuration, each dimer capable of binding to a tRNA^{sec}_{uca} with the serine amino acid which will be converted in selenocysteine, in a reaction dependant of the enzymatic cofactor piridoxal 5'fosfato.

On this work it was possible to develop a new purification protocol for the SELA protein, considerably reducing the steps and consequently the time involved for obtaining purified protein. The process also yielded better protein production when compared to literature, from 1mg/ml starting with 10 liters to approximately 4.5mg/ml starting with 3 liters of bacterial medium.

As for the structural experiments, it was possible to predict by Dynamic Light Scattering (DLS) the molecular mass as about 442kDa, Circular Dichroism (CD) predicted the secondary structure as mainly composed by α -helices and

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) showed the global structure of SELA with a maximum diameter of 185Å, a molecular mass of about 527kDa and a radius of gyration of 67.3 Å

I. INTRODUÇÃO

1.1. O Ácido Ribonucléico Transportador (tRNA)

Uma seqüência de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) é incapaz de traduzir sozinha sua seqüência de ribonucleotídeos para uma seqüência de aminoácidos, constituintes das proteínas. Assim, moléculas importantes como os ácidos ribonucléicos transportadores (tRNA) são necessários para esse processo denominado de tradução (Alberts et al., 2002).

O primeiro tRNA foi descoberto em 1965 por Robert Holley, um tRNA de 76 ribonucleotídeos responsável pelo transporte do aminoácido alanina. Atualmente sabe-se que os tRNAs são seqüências de ribonucleotídeos de tamanho variável, entre 60 a 95 ribonucleotídeos, que esquematicamente assumem a forma de uma folha de trevo, devido a seqüências complementares ao longo de sua fita simples capazes de formar quatro ramos (Voet et al., 1999) (Figura 1.1). É também sabido da existência de pelo menos um tRNA para cada tipo de aminoácido e que os tRNA possuem alguns ribonucleotídeos modificados pós-transcricionalmente que possibilitam seu reconhecimento tanto pelas moléculas de ácido ribonucléico ribossômico (rRNA) quanto pelas respectivas aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) (Voet et al., 1999).

Os tRNAs também possuem características comuns uns com os outros como por exemplo o grupamento fosfato 5' terminal; o número de nucleotídeos complementares que formam os quatro ramos da estrutura esquemática de trevo; além da seqüência CCA com um grupamento OH na extremidade 3' terminal (Voet et al., 1999) (Figura 1.1).

Cada uma das quatro alças da estrutura do tRNA recebe um nome específico, assim sendo: região do braço D; região do braço Anticódon; região variável; região do braço T ψ C além de uma haste que compartilha a seqüência 5' e 3' do tRNA, que recebe o nome de braço acceptor. No braço acceptor ocorre a ligação do aminoácido ao grupamento OH na extremidade 3' terminal, enquanto que a região anticódon ocorre a interação entre tRNA e mRNA no interior dos ribossomos (Voet et al., 1999; Alberts et al., 2002) (Figura 1.1).

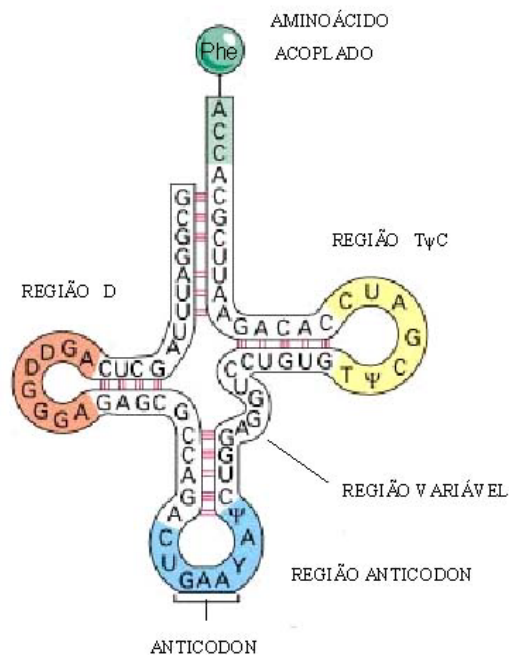


Figura 1.1: Esquema ilustrando o tRNA^{Phe} e suas respectivas regiões. Na extremidade 3' terminal ligada a hidroxila um resíduo de aminoácido (Phe). Modificado de Molecular Biology of The Cell 4th Ed – Alberts et al., 2002 p. 337.

1.2. Aminoacil-tRNA Sintetases

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

As aaRSs realizam a reação de aminoacilação em duas etapas: primeiro uma molécula de ATP reage com o aminoácido resultando na adenilação desse aminoácido e liberação de difosfato. Na segunda etapa da reação, ocorre a transferência do aminoácido ativado para o tRNA liberando assim o aminoacil-tRNA e AMP (Nelson and Cox, 2000) (Figura 1.2). Devido as similaridades de reação catalisadas pelas aaRSs e as similaridades estruturais dos tRNAs era suposto que todas as aaRSs proviessem de um ancestral comum e deveriam assim estar estruturalmente relacionadas, entretanto essas enzimas possuem diferenças em seu tamanho e estrutura tridimensional, sendo classificadas em dois grupos (Classe I e II - Tabela 1.1 e Figura 1.3) (Voet et al., 1999; Kim et al., 2003).

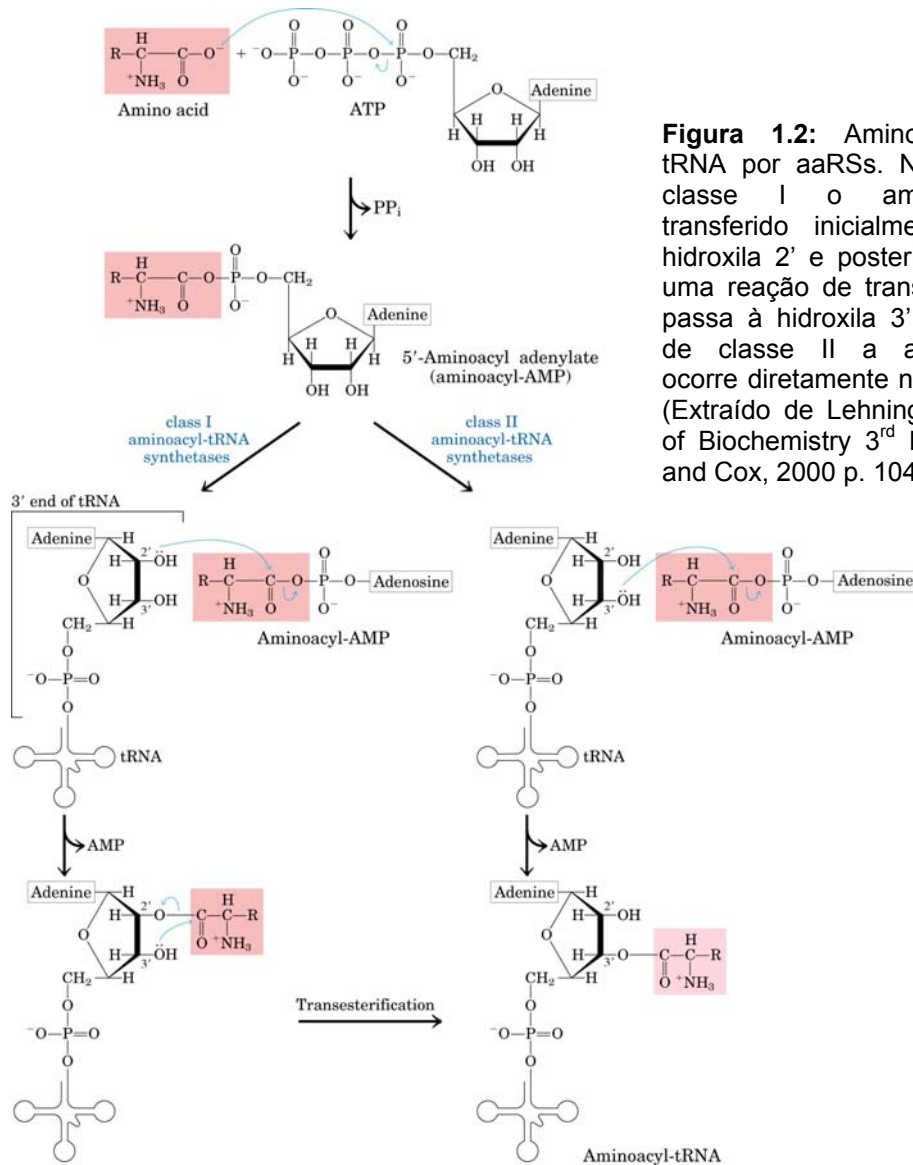


Figura 1.2: Aminoacilação do tRNA por aaRSs. Nas aaRS de classe I o aminoácido é transferido inicialmente para a hidroxila 2' e posteriormente, por uma reação de transesterificação passa à hidroxila 3'. Nas aaRSs de classe II a aminoacilação ocorre diretamente na hidroxila 3'. (Extraído de Lehninger Principles of Biochemistry 3rd Ed. – Nelson and Cox, 2000 p. 1040)

Cada aaRS possui cavidades precisas para o ATP e o seu respectivo aminoácido. As aaRS de classe I reconhecem a seqüência anticódon para inserir o respectivo aminoácido, geralmente maior e hidrofóbico, enquanto que as aaRS de classe II não interagem com a região anticódon. A configuração estrutural do tRNA é mais importante do que a própria seqüência, sendo que os principais pontos de interação ocorrem com a região anticódon e região aceptora. É devido a isso que uma aaRS pode reconhecer mais de um tRNA para um dado aminoácido (Alberts et al., 2002).

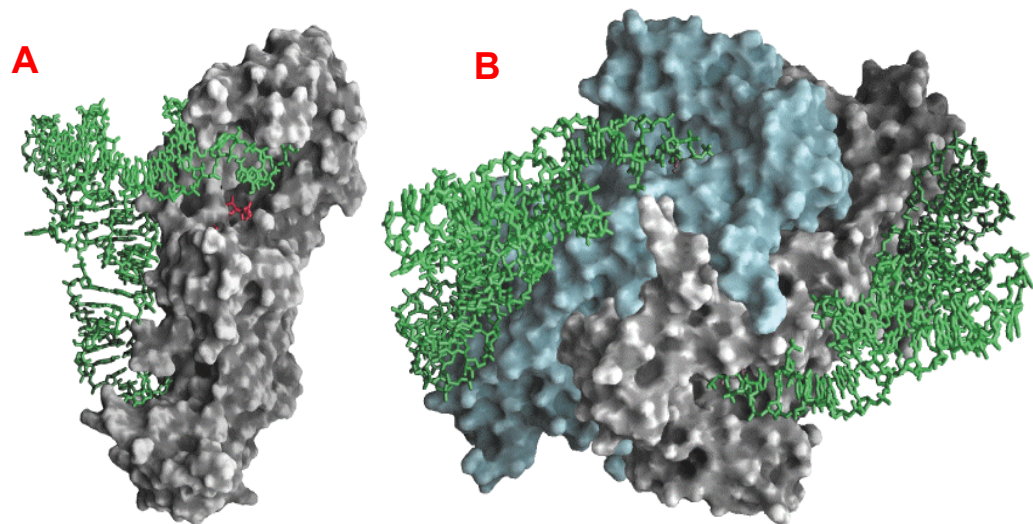


Figura 1.3: Aminoacil-tRNA sintetases. Ambas as enzimas de classe I (**A**) e II (**B**) estão mostradas ligadas ao seu tRNA (em verde). O ATP ligado esta indicado em vermelho. **A:** Gln-tRNA sintetase de *E. coli*, uma típica aaRS monomérica de classe I. **B:** Asp-tRNA sintetase de levedura, uma típica aaRS dimérica de classe II. (Extraído de Lehninger Principles of Biochemistry 3rd Ed. – Nelson and Cox, 2000 p. 1043)

SUBCLASSE	CLASSE I	CLASSE II	SUBCLASSE
Ia	IRS	ARS	IIa
	LRS	PRS	
	VRS	HRS	
	CRS	SRS	
	MRS	TRS	
	RRS	GRS	
Ib	QRS	NRS	IIb
	ERS	DRS	
	KRS-I	KRS-II	
Ic	YRS	FRS	IIc
	WRS		

TABELA 1.1: Enzimas aminoacil-tRNA sintetase (XRS) agrupada em classe I e II conforme ligação ao grupamento OH da ribose do aminoácido e em subclasses a, b e c segundo características presentes nos aminoácidos. Modificado de Kim et al., 2003.

1.3. Mecanismo de Biossíntese e Incorporação do aminoácido Selenocisteína nas Proteínas em Procariontes

O selenocisteína é o vigésimo primeiro aminoácido descrito na literatura e presente em grande número de enzimas distribuídas nas três linhagens descendentes (eubactérias, arqueobactérias e eucariotos) do ancestral primordial comum (Forchhammer et al., 1991a ; Böck et al., 1991; Stadtman, 1991). Sua constituição é muito similar ao aminoácido cisteína, diferindo pela substituição do elemento enxofre pelo selênio em sua cadeia lateral (Figura 1.4).

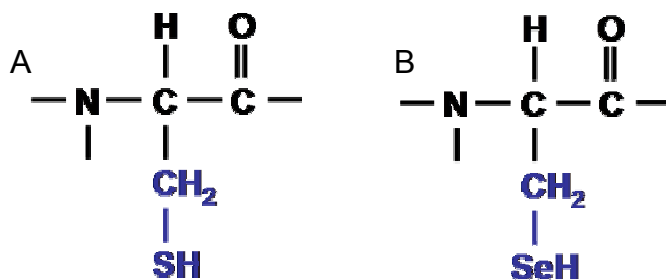


Figura 1.4: Representação dos aminoácidos Cisteína (A) e Selenocisteína (B). Observar a substituição do elemento Enxofre pelo Selênio na cadeia lateral.

Em *Escherichia coli* a formação e incorporação do aminoácido selenocisteína deve-se a uma complexa via de biossíntese cujas principais proteínas envolvidas são: Selenocisteína Sintase (SELA), Fator de Elongação de Selenocisteína (SELB ou EFSec), Selenofosfato Sintetase (SELD), serina-tRNA^{ser} Sintetase (SRS), além de um tRNA próprio denominado tRNA de Inserção de Selenocisteína (SELC) (Leinfelder et. al., 1988b). Em revisões mais recentes também foi verificada a necessidade de uma seqüência específica que promove uma alça (stem-loop), denominada de Seqüência de Inserção Sec (SECIS) (Low and Berry, 1996; Hatfield and Gladyshev, 2002) e em alguns organismos, eucariotos, proteínas auxiliares denominadas Proteína Ligante ao SECIS-2 (SBP2) (Copeland et. al., 2000; Hatfield and Gladyshev, 2002; Low et. al., 2000).

O tRNA^{sec}_{uca} de *Escherichia coli* codificado pelo gene de Inserção de Selenocisteína tRNA^{sec}_{uca} (selC) possui 95 ribonucleotídeos (Leinfelder et al.,

1988a) e através da enzima serina-tRNA sintetase é capaz de ligar-se a um aminoácido serina (Böck, et al., 1991). Em sua região anticódon é encontrada a seqüência UCA complementar ao códon de terminação UGA (Figura 1.5).

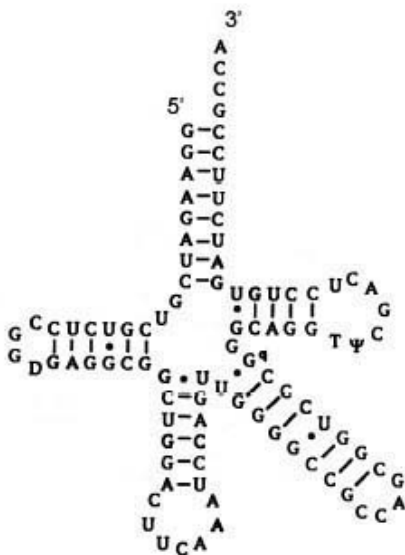


Figura 1.5: Diagrama esquemático na forma de trevo da estrutura do tRNA^{sec}_{uca} de *Escherichia coli*. Essa estrutura permite a observação das regiões complementares (dupla fita), além da seqüência anticódon UCA complementar ao códon de terminação UGA, bem como uma longa região variável. (Extraído de Tormay et al., 1994)

Após a aminoacilação do tRNA^{sec}_{uca} para seril-tRNA^{sec}_{uca}, (Figura 1.6a – etapa 1 a 2) a serina será convertida em selenocisteína pela ação da enzima Selenocisteína Sintase (SELA), uma proteína decamérica, cujo monômero possui aproximadamente 50 KDa (Böck et al., 1991; Low and Berry, 1996) (Figura 1.6a – etapa 3). Cada monômero da proteína SELA está ligado covalentemente com uma molécula de Piridoxal 5'-Fosfato, um cofator enzimático responsável pela interação com o seril-tRNA^{sec}_{uca}, formando dessa maneira uma base de Schiff (ligação dupla entre um nitrogênio e um carbono) entre o grupamento amino α do resíduo de serina e o grupamento azo-formil do piridoxal, resultando na eliminação de uma molécula de água e síntese de uma molécula intermediária denominada de aminoacrilil-tRNA^{sec}_{uca}. A partir desse composto intermediário o aminoácido insaturado pode tautomerizar para uma forma instável imino que espontaneamente hidrolisa a piruvato e amônia. Alternativamente a dupla ligação pode ser reduzida por um agente redutor (borohidrato de potássio, KBH₄) para a formação de alanil-tRNA^{sec}_{uca}. O passo seguinte consiste na transferência do selênio reduzido e ativado para a

molécula intermediária (aminoacrilil-tRNA^{sec}_{uca}), resultando no vigésimo primeiro aminoácido Selenocisteína (Forchhammer and Böck, 1991b) (Figura 1.6b).

O selênio é obtido a partir de selenito (um sal com o ânion divalente SeO₃⁻²) ou de selenocisteínas pela proteína Selenotransferase ou Selenocisteína Liase respectivamente que reduzem o selênio capaz de ser utilizado pela proteína com função enzimática Selenofosfato Sintetase (SELD) (Burk, 1991), aproximadamente 37 kDa (Leinfelder et al., 1990), numa reação dependente de ATP, que fosforila o selênio a selenofosfato, dando continuidade a biossíntese do aminoácido selenocisteína e evitando que a célula sofra intoxicação por excesso de selênio (Ehrenreich, 1992; Lacourciere and Stadtman, 2001) (Figura 1.6a – etapa B).

A incorporação do aminoácido selenocisteína juntamente as seqüências polipeptídicas das selenoproteínas deve-se a ação de uma proteína, com características similares ao fator de alongação EF-Tu, denominada de Fator de Elongação SELB, de aproximadamente 68 kDa (Forchhammer, Leinfelder and Böck, 1989). Entretanto para que haja tal incorporação é necessária a existência de uma alça (stem-loop) derivada de seqüências complementares de ribonucleotídeos, denominada SECIS seguida ao códon de terminação UGA na seqüência do mRNA possibilitando uma ligação mais eficiente da proteína SELB - selenocisteil-tRNA^{sec}_{uca} a fita de mRNA e ao ribossomo (Lescure et al., 2002) (Figura 1.6a – etapa 4).

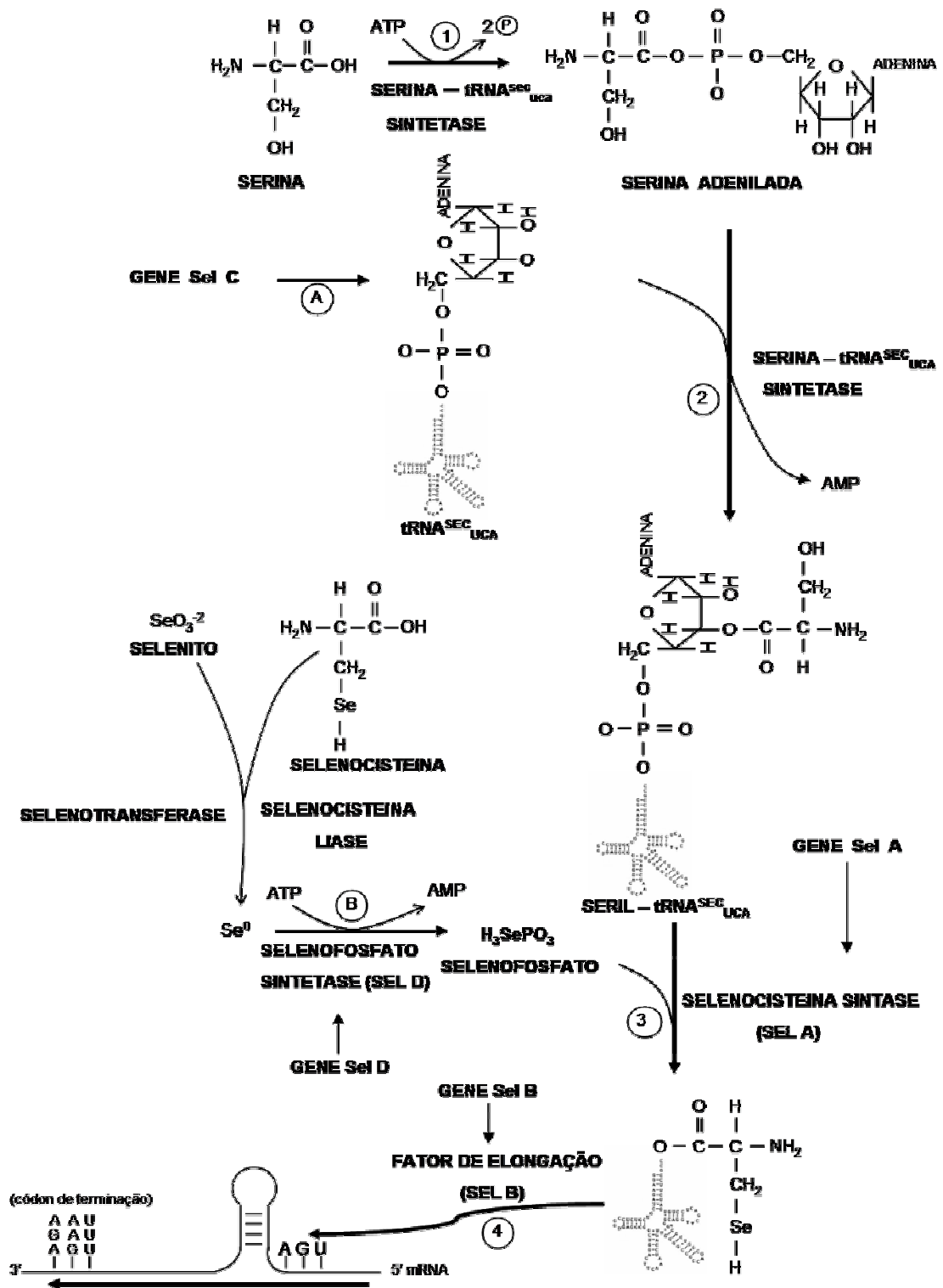


Figura 1.6a: Etapas envolvidas na biossíntese e incorporação de selenocisteínas conforme descrito no texto. A etapa 3 pode ser visualizada em detalhe na figura 1.3.3b na página seguinte.

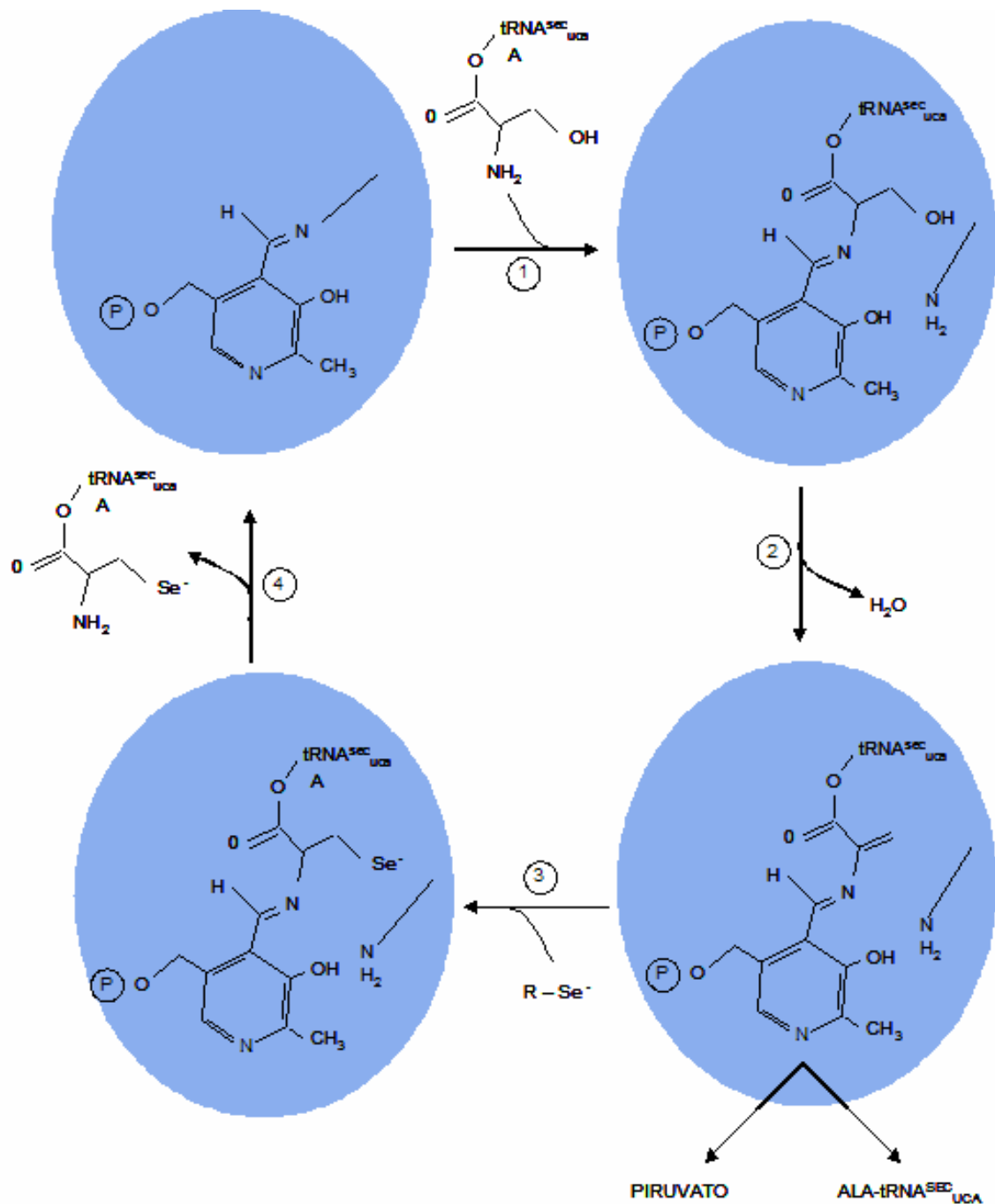


Figura 1.6b: Esquema detalhado da conversão do aminoácido serina em selenocisteína pela enzima Selenocisteína Sintase (SELA) parcialmente representada em azul. Também indicado ligado à enzima SELA o cofator enzimático Piridoxal 5'- Fosfato: **1-** Ligação do seril-tRNA^{Sec}_{uca} ao cofator piridoxal 5'-fosfato. **2-** liberação de uma molécula de água com a formação de um composto intermediário (aminoacrilil-tRNA^{Sec}_{uca}). Nessa etapa o composto intermediário pode tautomerizar liberando Piruvato (espontaneamente), ou devido a um agente redutor (borohidratado de potássio) liberar alanil-tRNA^{Sec}_{uca}. **3-** transferência do selênio reduzido e ativado à molécula intermediária, resultando no selenocisteil-tRNA^{Sec}_{uca}. **4-** liberação do aminoácido selenocisteína, disponibilizando a enzima SELA e o cofator Piridoxal 5'- Fosfato para reinício do ciclo. Modificado de Forchhammer and Böck, 1991b.

1.4. Selenocisteína Sintase (SELA)

A proteína Selenocisteína Sintase (SELA) de *Escherichia coli* é uma proteína com função enzimática de 464 resíduos de aminoácidos e massa molecular aproximada de 50,667 kDa como mostrado na figura 1.7. Entretanto a proteína SELA na forma nativa apresentou migração em gel filtração um tamanho aproximado de 600 kDa (Forchhammer et al., 1991a).

A estrutura tridimensional da Selenocisteína Sintase pôde ser melhor estudada por Engelhardt et al., 1992, através de experimentos utilizando microscopia eletrônica de transmissão capazes de demonstrar que a SELA é composta de um anel simetricamente quintuplicado, (cinco bi-lóbulos distintos).

Juntando-se as informações obtidas por Forchhammer et al., 1991a e Engelhardt et al., 1992, foi possível sugerir que a SELA não era uma proteína possuidora de cinco monômeros bi-lobulados, mas de dez monômeros. Os estudos de Engelhardt et al., 1992, também conseguiram determinar um diâmetro de 19 nm com um buraco central de 4 nm. As dimensões de cada subunidade de aproximadamente 8,5 nm e sua espessura de 5-6 nm (Figura 1.8).

```

1 ATG ACA ACC GAA ACG CGT TTC CTC TAT AGT CAA CTT CCG GCT ATT GAT CGC TTA
1 MET Thr Thr Glu Thr Arg Phe Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Ala Ile Asp Arg Leu

55 TTG CGC GAT AGC TCC TTC CTT TCT TTG CGT GAT ACT TAT GGT CAC ACC CGC GTG
19 Leu Arg Asp Ser Ser Phe Leu Ser Leu Arg Asp Thr Tyr Gly His Thr Arg Val

109 GTG GAA TTG TTG CGT CAG ATG CTC GAC GAA GCG CGA GAA GTG ATT CGT GGC AGC
37 Val Glu Leu Leu Arg Gln MET Leu Asp Glu Ala Arg Glu Val Ile Arg Gly Ser

163 CAG ACG CTG CCT GCG TGG TGT GAA AAC TGG GCG CAA GAA GTC GAT GCC CGG TTG
55 Gln Thr Leu Pro Ala Trp Cys Glu Asn Trp Ala Gln Glu Val Asp Ala Arg Leu

217 ACG AAA GAA GCG CAG AGC GCG CTC CGT CCG GTG ATC AAC CTG ACG GGA ACC GTG
73 Thr Lys Glu Ala Gln Ser Ala Leu Arg Pro Val Ile Asn Leu Thr Gly Thr Val

271 CTG CAT ACC AAC CTT GGG CGA GCT TTA CAG GCG GAA GCC GCG GTG GAA GCC GTT
91 Leu His Thr Asn Leu Gly Arg Ala Leu Gln Ala Glu Ala Ala Val Glu Ala Val

325 GCG CAG GCT ATG CGT TCG CCA GTG ACC CTC GAG TAT GAT CTG GAC GAC GCC GGA
109 Ala Gln Ala MET Arg Ser Pro Val Thr Leu Glu Tyr Asp Leu Asp Asp Ala Gly

379 CGC GGA CAT CGC GAT CCG GCG CTG GCG CAG CTG CTG TGC CGT ATT ACG GGG GCG
127 Arg Gly His Arg Asp Arg Ala Leu Ala Gln Leu Leu Cys Arg Ile Thr Gly Ala

433 GAA GAT GCC TGT ATC GTC AAT AAC AAT GCG GCG GCG GTG TTA TTG ATG TTG GCG
145 Glu Asp Ala Cys Ile Val Asn Asn Ala Ala Val Leu Leu MET Leu Ala

487 GCC ACT GCC AGC GGA AAA GAG GTG GTG GTA TCT CGC GGC GAA CTG GTG GAG ATT
163 Ala Thr Ala Ser Gly Lys Glu Val Val Val Ser Arg Gly Glu Leu Val Glu Ile

541 GGC GGC GCG TTT CGT ATT CCC GAT GTT ATG CGT CAG GCA GGC TGC ACC CTA CAC
181 Gly Gly Ala Phe Arg Ile Pro Asp Val MET Arg Gln Ala Gly Cys Thr Leu His

595 GAA GTA GGG ACC ACC AAC CGC ACG CAC GCG AAT GAT TAT CGT CAG GCG GTG AAT
199 Glu Val Gly Thr Thr Asn Arg Thr His Ala Asn Asp Tyr Arg Gln Ala Val Asn

649 GAA AAT ACC GCA CTG TTG ATG AAA GTA CAT ACC AGT AAC TAC AGC ATT CAG GGG
217 Glu Asn Thr Ala Ser Leu Leu MET Lys Val His Thr Ser Asn Tyr Ser Ile Gln Gly

703 TTC ACC AAA GCG ATA GAT GAA GCG GAA CTG GTG GCG CTC GGC AAA GAG CTG GAT
235 Phe Thr Lys Ala Ile Asp Glu Ala Glu Leu Val Ala Leu Gly Lys Glu Leu Asp

757 GTT CCC GTA GTG ACT GAT TTA GGC AGT GGC TCG CTG GTC GAT CTT AGC CAG TAC
253 Val Pro Val Val Thr Asp Leu Gly Ser Gly Ser Leu Val Asp Leu Ser Gln Tyr

811 GGT TTG CCG AAA GAG CCA ATG CCG CAG GAG TTG ATT GCG GCG GGC GTC AGT CTC
271 Gly Leu Pro Lys Glu Pro MET Pro Gln Glu Leu Ile Ala Ala Gly Val Ser Leu

865 GTG AGT TTC TCC GGC GAC AAG TTG TTA GGC GGG CCG CAG GCA GGA ATT ATT GTT
289 Val Ser Phe Ser Gly Asp Lys Leu Leu Gly Gly Pro Gln Ala Gly Ile Ile Val

919 GGT AAA AAA GAG ATG ATC GCC CGC CTC CAA AGC CAC CCG CTG AAG CGT GCA TTA
307 Gly Lys Lys Glu MET Ile Ala Arg Leu Gln Ser His Pro Leu Lys Arg Ala Leu

973 CGC GCG GAT AAA ATG ACC CTC GCG GCG CTG GAA GCC ACG TTG CGT CTT TAT TTA
325 Arg Ala Asp Lys MET Thr Leu Ala Ala Leu Glu Ala Thr Leu Arg Leu Tyr Leu

1027 CAC CCT GAA GCT CTG AGT GAA AAA TTA CCG ACC CTG GCG CTG CTT ACC CGC AGC
343 His Pro Glu Ala Leu Ser Glu Lys Leu Pro Thr Leu Arg Leu Leu Thr Arg Ser

1081 GCA GAG GTC ATT CAA ATC CAG GCA CAA CGT TTA CAG GCC CCC CTT GCC GCA CAT
361 Ala Glu Val Ile Gln Ile Gln Ala Gln Arg Leu Gln Ala Pro Leu Ala Ala His

1135 TAC GGC GCG GAG TTT GCG GTA CAG GTT ATG CCA TGT CTT TCG CAG ATT GGC AGT
379 Tyr Gly Ala Glu Phe Ala Val Gln Val MET Pro Cys Leu Ser Gln Ile Gly Ser

1189 GGT TCG CTG CCG GTT GAT CGC CTG CCG AGC GCG GCA TTA ACG TTT ACA CCC CAT
397 Gly Ser Leu Pro Val Asp Arg Leu Pro Ser Ala Ala Leu Thr Phe Thr Pro His

1243 GAT GGA CGC GGT AGC CAC CTT GAG TCA TTA GCC GCC CCG TGG CGT GAA TTG CCA
415 Asp Gly Arg Gly Ser His Leu Glu Ser Leu Ala Ala Arg Trp Arg Glu Leu Pr

1297 GTG CCG GTG ATT GGT CGT ATT TAT GAC GGA CGA TTG TGG CTG GAT TTA CGC TGC
433 Val Pro Val Ile Gly Arg Ile Tyr Asp Gly Arg Leu Trp Leu Asp Leu Arg Cys

1351 CTT GAA GAT GAG CAA CGG TTT TTG GAG ATG TTG TTG AAA TGA
451 Leu Glu Asp Glu Gln Arg Phe Leu Glu MET Leu Leu Lys ***

```

Figura 1.7: Sequência de nucleotídeos e respectivos aminoácidos da proteína SELA. Modificado de Forchhammer et al., 1991a.

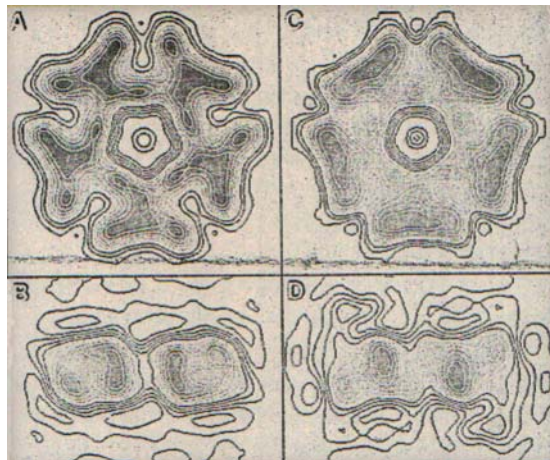


Figura 1.8: Imagens da proteína SELA obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão utilizando como marcador acetato de urânio. **A-** ilustrando a simetria encontrada na enzima SELA. **B-** vista lateral mostrando uma subunidade dimérica. **C e D** representam vista frontal e lateral respectivamente da enzima SELA ligada ao composto intermediário aminoacrilil-tRNA^{sec}_{uca}. (Reproduzido de Engelhardt et al., 1992)

Estudos utilizando microscopia eletrônica de transmissão (do inglês Scanning Transmission electron microscope – STEM) (Figura 1.8) possibilitou o cálculo da massa estimada da SELA em aproximadamente 493 ± 20 kDa, com 95% de confiabilidade. Sabendo que cada monômero possui uma massa aproximada de 50,667 kDa e que cada monômero está ligado covalentemente a uma molécula de piridoxal 5'-fosfato (FW 265,2), obtem-se uma massa de 509,322 kDa. Podendo concluir que a SELA de *Escherichia coli* é uma proteína homodecamérica constituída por cinco subunidades diméricas como sugerido pela Figura 1.8.

A enzima Selenocisteína Sintase forma complexos altamente estáveis com moléculas seril-tRNA^{sec}_{uca} quando comparada com o seril-tRNA^{ser} (Forchhammer et al., 1991a; Böck et al., 1991) e estudos de Engelhardt et al., 1992 demonstraram que apenas uma molécula de seril-tRNA^{sec}_{uca} liga-se por subunidade dimérica de maneira independente (não cooperativa) e randômica.

1.5. Selênio

O Selênio é um mineral não metálico encontrado no solo e plantas como arroz, trigo, castanha do Pará, também pode ser encontrado em mariscos e carnes (Nacional Câncer Institute).

Como um micronutriente essencial na dieta de muitas formas de vida, incluindo humanos e outros mamíferos, benefícios significativos com relação à

saúde são atribuídos a esse elemento, assim como: agente quimiopreventivo contra câncer devido a sua ação antioxidante capaz de controlar os danos celulares que podem conduzir ao câncer (Nacional Câncer Institute); fortes evidências como redutor da expressão viral; na prevenção contra doenças cardíacas e outras desordens cardiovasculares e musculares; retardamento no progresso de imunodeficiência de pacientes humanos portadores de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, AIDS; evidências de participação no desenvolvimento de mamíferos; na reprodução masculina; no processo de envelhecimento (Hatfield and Gladyshev, 2002) dentre outros.

A essencialidade de selênio em sistemas biológicos é reconhecida desde 1950, em que a deficiência de tal elemento implica em inúmeras patologias acima citadas (Burk, 1991).

A maneira como o selênio se distribui nas células é incorporando-se ao aminoácido selenocisteína como descrito pela via de incorporação de selênio no item 1.3, e posteriormente incorporado em selenoproteínas, que serão discutidas no item 1.6. Além das selenoproteínas o selênio pode ser inserido em proteínas de maneira não específica, pela substituição do enxofre do aminoácido metionina resultando em selenometioninas encontrado em cereais e gramíneas. Ou ainda em proteínas ligantes ao selênio (Selenium-Binding Proteins), em que tais proteínas ligam-se fortemente ao selênio (Hatfield and Gladyshev, 2002; Lyn Patrick, 2004). De outra maneira o selênio em grandes quantidades e na sua forma livre é altamente tóxico (Burk, 1991).

1.6. Selenoproteínas

A forma ativa do selênio encontra-se incorporado em proteínas denominadas Selenoproteínas, através do aminoácido selenocisteína como descrito no item 1.3. Devido a isso, as selenoproteínas têm despertado interesse e atualmente é sabido da existência de inúmeras selenoproteínas em bactérias, arqueobactérias e eucariontes (Low and Berry, 1996). Dentre essas selenoproteínas foram descritas pelo menos seis em bactérias, três em arqueobactérias e um número crescente em eucariotos (Böck et. al., 1991; Low

and Berry, 1996). Revisões mais atualizadas indicaram sendo de 20 (Hatfield and Gladyshev, 2002) a 25 (Kryukov et. al., 2003) proteínas contendo selenocisteína em mamíferos.

O número de selenoproteínas conhecidas tem aumentado muito nos últimos anos e com exceção da proteína Selenofosfato Sintetase não há sobreposição entre os selenoproteomas (todas as selenoproteínas de um organismo) de procariotos e eucariotos. Selenoproteínas de bactérias e arqueobactérias estão envolvidos primeiramente em processos catabólicos utilizando o selênio como catalisador em várias reações de redução (Hatfield and Gladyshev, 2002). Enquanto que selenoproteínas de eucariotos participam de processos antioxidantes e anabólicos. O que sugere uma origem independente para os selenoproteomas de procariotos e eucariotos (Hatfield and Gladyshev, 2002).

Apesar das selenoproteínas não terem seqüências homólogas, estruturas similares ou funções relacionadas, a localização de selenocisteínas (Sec) nessas proteínas parece estar limitada a apenas algumas posições, sendo restrita a apenas um aminoácido selenocisteína em eubactérias e um ou dois selenocisteínas em arqueobactérias e eucariotos (Hatfield and Gladyshev, 2002), com exceção da selenoproteína P encontrada em eucariotos e que pode ter de 11 a 17 selenocisteínas ao longo de sua seqüência (Rother et. al., 2001). A localização desse aminoácido Sec também é importante, pois situa-se no sítio ativo das proteínas, sendo que sua substituição por outro aminoácido como serina ou cisteína resulta na perda ou redução drástica da atividade enzimática (Zinoni et. al., 1987; Axley et. al., 1991).

As selenoproteínas mais estudadas em procariotos são referentes ao complexo formiato-hidrogênio liase, encontrado em *Escherichia coli*, e responsável pela decomposição do ácido fórmico a hidrogênio e dióxido de carbono, sendo uma importante via fermentadora em condições anaeróbicas (Axley et. al., 1990). Esse complexo é formado por duas proteínas: Formiato desidrogenase H (FDH_H) envolvido na formação do gás e a Formiato desidrogenase N (FDH_N) envolvido na transferência de elétrons do formiato para a Nitrato redutase (Leinfelder et. al., 1988).

Nas arqueobactérias, como *Methanococcus vannielii*, também é encontrado a selenoproteína Formato Desidrogenase, capaz de decompor o ácido fórmico a dióxido de carbono e metano, através da fermentação anaeróbica. Entretanto nesses organismos uma forma alternativa de Formato Desidrogenase, sem selenocisteínas incorporadas ao longo da cadeia polipeptídica, também foi verificada, possibilitando a sobrevivência em meios contendo ou não selênio (Jones and Stadtman, 1981).

Em eucariotos a presença de selenoproteínas é essencial para o desenvolvimento, como demonstrado que a falta do gene selC resulta na morte embrionária (Hatfield and Gladyshev, 2002). A seguir serão citadas três das principais selenoproteínas encontradas em humanos.

A primeira selenoproteína identificada foi a Glutathione Peroxidase (GPx), que catalisa a oxidação de glutathionas reduzidas e permite a redução do peróxido de hidrogênio à água, prevenindo a peroxidação lipídica e danos celulares (Lyn Patrick, 2004). São encontradas pelo menos cinco formas de Glutathione Peroxidase, localizadas em tecidos específicos em humanos como: GPx clássico, encontrado apenas no citosol celular; GPx gastrointestinal, encontrado no fígado e no trato gastrointestinal, GPx plasma, encontrado no plasma e na tireóide; Hidroperóxido Fosfolipídico Glutathione Peroxidase (PHGPx), encontrada em membranas celulares e as GPx de núcleos espermáticos, localizadas no núcleo de espermatozoides (Lyn Patrick, 2004).

Selenoproteína P, encontrada em sua grande maioria na circulação sanguínea atuando também como uma enzima antioxidante e transportadora de selênio visto da grande quantidade de selenocisteínas incorporados em sua seqüência polipeptídica (Rother *et. al.*, 2001; Lyn Patrick, 2004).

Tireodoxina Redutase (TR), uma proteína com função enzimática capaz de degradar peróxidos e hidroperóxidos no exterior de membranas celulares e responsáveis por danos no DNA, morte celular e atrofia dos tecidos, também são atuantes na regulação de vitaminas com C e K3 (Lyn Patrick, 2004). As TR são expressas em todos os tecidos eucarióticos, sendo sua inibição letal (Hatfield and Gladyshev, 2002).

A função da maioria das selenoproteínas ainda não é conhecida, sendo

sua caracterização uma das direções a serem seguidas pelos pesquisadores de selenoproteínas (Hatfield and Gladyshev, 2002).

1.7. Determinação Estrutural de Proteínas

A importância de se determinar estruturalmente um composto é vasta, seja esse composto destinado ao desenvolvimento de novos materiais, seja ele uma biomolécula de interesse farmacológico. É sabido que as distâncias entre os átomos dessas moléculas bem como sua configuração eletrônica tem grande influência nas relações exercidas por ela dentro de seus sistemas de atuação.

No caso de biomoléculas de interesses farmacológicos poder determinar a localização de grupos específicos, bem como modificar ou substituir tais grupos, tem grande importância na elucidação de interações entre eles e o sistema biológico que tais compostos fazem parte.

Na determinação estrutural de compostos podem ser utilizados métodos químicos e físicos como os métodos espectrométricos (massa, infravermelho, ultravioleta, ressonância) que pode gerar inúmeras informações que combinadas auxiliam muito os estudos da molécula em questão. Entretanto tais metodologias em alguns casos podem gerar mais de um modelo estrutural criando inúmeras dificuldades para os passos subsequentes.

Dentre os métodos espectrométricos o Espalhamento Dinâmico de Luz e o Dicroísmo Circular são amplamente utilizados gerando informações importantes para métodos posteriores e mais precisos como o de Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo e a Difração de Raios X em cristais de proteínas.

1.7.1. Espalhamento Dinâmico de Luz

O Espalhamento Dinâmico de Luz, do inglês Dynamic Light Scattering (DLS), é uma técnica capaz de analisar biomoléculas de interesse em solução, podendo abranger uma ampla variação na concentração dessas moléculas.

Como é sabido, macromoléculas quando em solução apresentam-se em movimento Browniano e quando uma fonte de radiação é direcionada a essas moléculas ocorrem pequenas diferenças na frequência da radiação detectada em relação a onda emitida, diferença essa resultantes do efeito Doppler. Assim, as partículas em movimento Browniano são responsáveis pelas variações da intensidade de luz espalhada (Berne and Pecora, 1976).

A intensidade do espalhamento depende da posição da partícula e do detector (Figura 1.9). Uma mudança na posição da partícula é acompanhada pela mudança na medida da intensidade de luz espalhada. O conhecimento destas intensidades distintas permite obter informações a respeito do movimento das partículas, ou seja, do coeficiente de difusão e dimensões das macromoléculas, através de uma função de correlação. A função de correlação das intensidades medidas (uma medida indireta do coeficiente de difusão das partículas), é obtida a partir de uma curva de correlação da intensidade que exhibe um decaimento exponencial (Berne and Pecora, 1976).

Dessa forma nos experimentos de DLS, o raio da partícula é deduzido a partir do coeficiente da difusão e pela equação de Stokes-Einstein que descreve o “atrito” para uma esfera compacta no meio viscoso. Entretanto, na prática nem sempre macromoléculas são esféricas e o raio calculado a partir do coeficiente de difusão oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula hidratada, isto é, com sua camada de solvatação, denominado assim, raio hidrodinâmico (partícula e sua camada de solvatação) (Berne and Pecora, 1976).

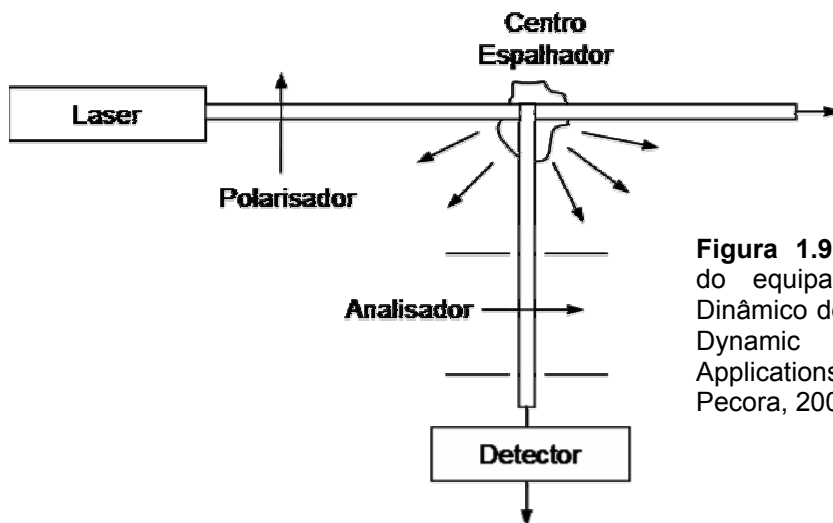


Figura 1.9: Diagrama representativo do equipamento de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). Modificado de Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry - Berne and Pecora, 2000 p. 6.

1.7.2. Dicroísmo Circular

A técnica de Dicroísmo Circular, do inglês Circular Dichroism, (CD) é capaz de detectar as diferenças de interações moleculares, a baixas concentrações, utilizando uma luz polarizada. Isso ocorre porque toda molécula que apresenta quiralidade é opticamente ativa, promovendo interações distintas na luz polarizada que a incide (Fasman, 1996).

Quando a luz é polarizada linearmente, o campo elétrico apresenta direção constante e sua amplitude varia, enquanto que na polarização circular o módulo do vetor campo elétrico é constante e a direção é variada (Fasman, 1996).

Desta maneira um feixe de luz polarizado consiste de dois feixes de luz plano-ortogonal de 90° que estão fora de fase por $\pi/2$, em que a variação do vetor elétrico na direção da propagação executa uma volta completa em um comprimento de onda ou no período de onda de luz. A luz pode ser circularmente polarizada para direita (rcp) ou para esquerda (lcp) (Fasman, 1996) (Figura 1.10).

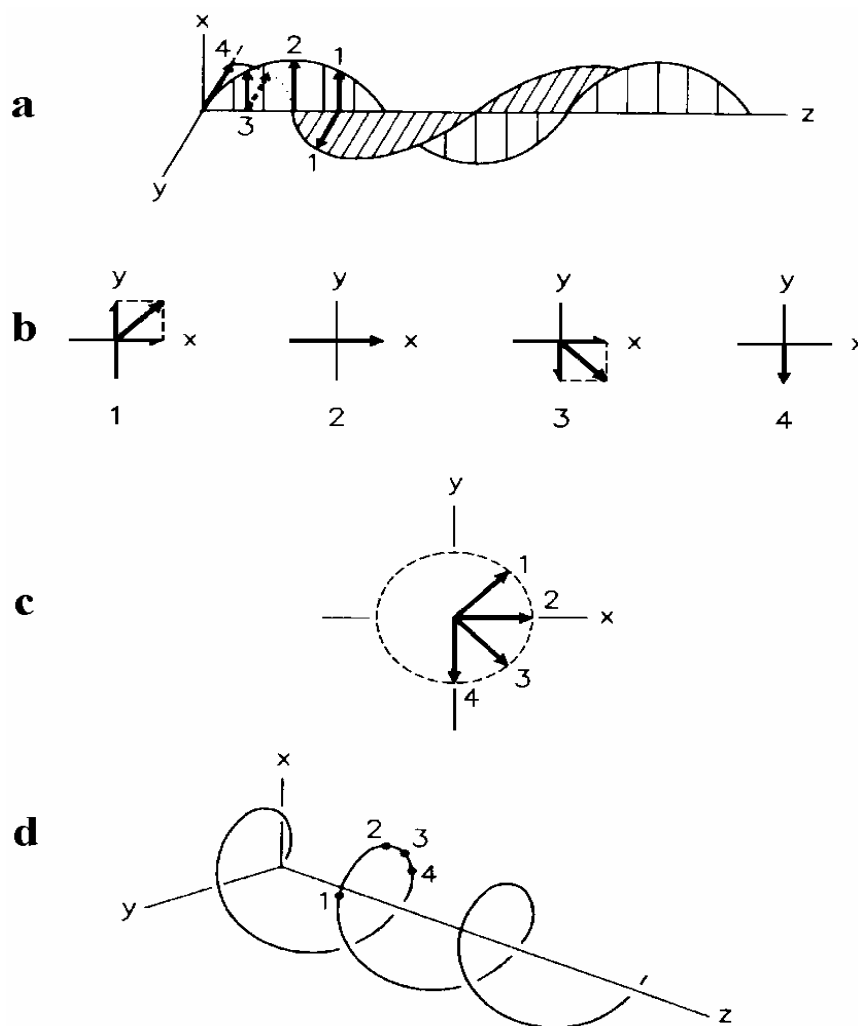


Figura 1.10: Luz circularmente polarizada à direita : **A-** Os vetores elétricos ortogonalmente polarizados emitidos a 90° estão fora de fase ($\pi/2$). **B-** Os componentes **x** e **y** estão representados no ponto ao longo do eixo **z** enumerado de 1 a 4 em **A**, junto com seus resultados. **C-** A soma do vetor em **(b)** foi projetada sobre um plano normal na direção **z**, demonstrando que a extremidade do vetor do campo elétrico segue uma via circular quando examinada ao longo da direção de propagação, observada junto a fonte de luz. **D-** Representa a luz polarizada circularmente a direita, mostrando o vetor do campo elétrico em função da posição junto a direção de propagação. Notar que o topo ou a extremidade do vetor do campo elétrico representa uma hélice transmitido à direita. Com referência **A - C**, notar que um observador em um ponto fixo no eixo **z**, olhando através da fonte de luz, verá o ponto **1** primeiro seguido do **4**. Para este observador, o vetor do campo elétrico parecerá girar no sentido horário na direção da propagação em função do tempo. Na luz circularmente polarizada a esquerda, a extremidade do vetor do campo elétrico representa uma hélice transmitida a esquerda, e um observador no eixo **z** olhando através da fonte de luz verá no vetor do campo elétrico a rotação no sentido anti-horário (Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules, Fasman, 1996 p. 27).

Os sinais analisados em CD referem-se às diferenças entre as absorções da luz circularmente polarizadas a esquerda e as circularmente polarizadas a direita. Essas diferenças de absorções da luz são extremamente úteis nas análises de biomoléculas, pois geram informações importantes a

respeito de suas estruturas secundárias, através de um espectro de CD (Fasman, 1996).

Como é sabido a estrutura secundária de uma proteína tem unidade peptídica planar e rígida, mas apresenta liberdade rotacional entre suas unidades, decorrente dos ângulos existentes entre NH e C'=O (ângulos phi θ e psi ψ). Dessa maneira as estruturas secundárias, juntamente com o núcleo protéico, formado por aminoácidos preferencialmente hidrofóbicos, promovem uma arquitetura rígida e estável, com uma certa flexibilidade sendo consideradas as partes melhores definidas da estrutura protéica (Branden e Tooze, 1999).

O espectro de CD de uma proteína, em sua forma nativa, para cada comprimento de onda é a soma da contribuição de cada uma das componentes da estrutura em análise. Esse espectro pode ser dividido em região UV próxima 250-300 nm, capaz de monitorar as contribuições dos aminoácidos aromáticos e das pontes dissulfetos e na região UV distante, 190-250 nm, monitora as transições das cadeias peptídicas da proteína (Fasman, 1996).

No espectro de UV distante é possível monitorar e estimar a composição e mudanças conformacionais das estruturas secundárias (hélices α , folhas β , voltas β e seqüências aleatórias) (Fasman, 1996) (Figura 1.11).

Hélices α : descrita pela primeira vez por Linus Pauling em 1951 como uma estrutura estável e energeticamente favorável nas proteínas, ocorrendo quando uma extensão de aminoácidos consecutivos possuem pares de ângulos θ e ψ aproximadamente -60° e -50° . Possuem 3,6 resíduos de aminoácidos por volta com ligações de hidrogênio C'=O e NH geralmente no resíduo n e n+4 respectivamente. Entretanto, mais raramente a espiral pode ser mais compacta resultado na variação das ligações de hidrogênio n+5 (hélice π) ou n+3 (hélice 3_{10}). As hélices α são polares e praticamente se localizam na superfície da proteína, podendo nas proteínas globulares ter um comprimento variável desde 4-5 resíduos a mais de 14 aminoácidos, com um giro de mão direita em que todas as ligações de hidrogênio possuem a mesma direção devido as unidades peptídicas estarem alinhadas na mesma orientação ao longo do eixo da hélice e resultando na extremidade C-terminal, uma carga

negativa e na extremidade N-terminal com uma carga positiva (resultante do momento dipolar encontrado na unidade peptídica) (Branden and Tooze, 1999).

Folhas β : constituída a partir da combinação de várias regiões da cadeia polipeptídica (fitas β) e diferentemente das hélices α não são formadas por uma região contínua e enrolada, mas distendida e plana. As fitas β usualmente são formadas de 5 a 10 resíduos longos, alinhados adjacentes umas das outras pelas ligações de hidrogênio. Folhas β formadas por várias fitas β apresentam-se dobradas sucessivamente acima e abaixo do plano da folha (dobra no c_α) e podendo interagir dos seguinte modos com as fitas β :

todas as fitas sendo paralelas;

fitas antiparalelas alternadamente,

com fitas mistas, isto é, fitas paralelas e antiparalelas numa mesma folha (Branden and Tooze, 1999).

Voltas: muitas proteínas são constituídas a partir de combinações e estruturas secundárias (hélices α e folhas β) que são conectadas por regiões denominadas voltas (loops), regiões estas de comprimento variável e forma irregular. A cadeia principal dessas voltas geralmente não formam ligações de hidrogênio entre elas, e assim ficam expostas ao solvente. Dessa forma os resíduos encontrados nessas regiões expostas, geralmente carregados ou polares, podem ser usados em vários esquemas de predições, com alta confiabilidade quando comparada as estruturas α e β . Com sua ação conectora entre as estruturas secundárias as voltas freqüentemente participam na formação de sítios de ligação e nos sítios ativos da enzima (Branden and Tooze, 1999).

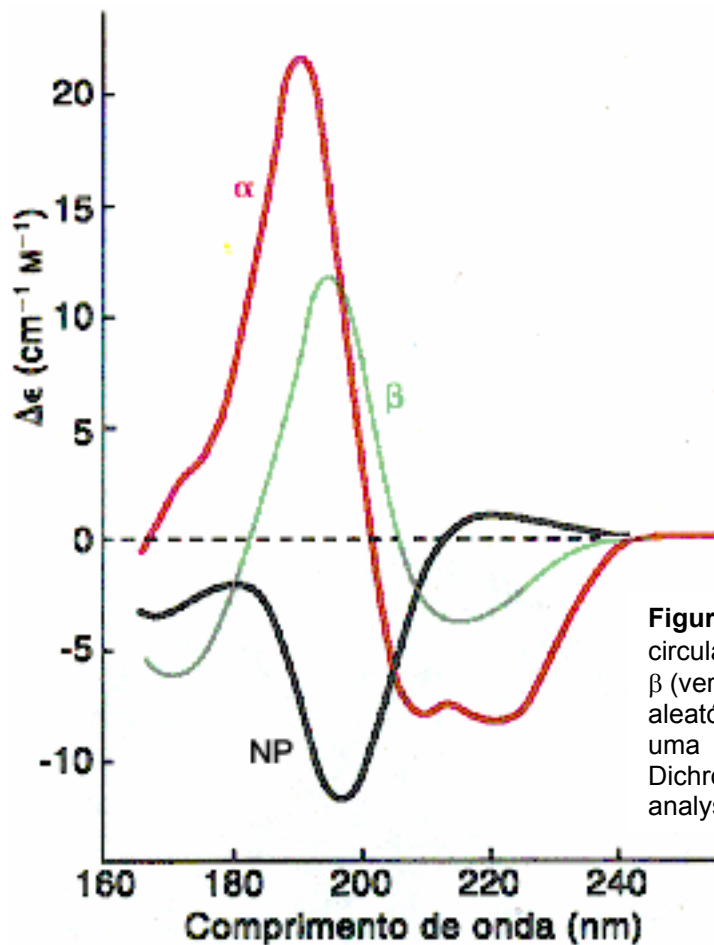


Figura 1.11: Espectros do dicroísmo circular para α -hélice (vermelho), folha β (verde) e uma região de seqüência aleatória (não periódica) (preto) para uma cadeia polipeptídica. (Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules, Fasman, 1996).

1.7.3. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

Assim, como descrito nas abordagens de DLS e CD a metodologia de Espalhamento de raios X a Baixo Ângulo (SAXS) utiliza materiais em soluções permitindo uma análise detalhada da estrutura global da molécula.

A técnica de SAXS fornece informações estruturais, assim como predições de estruturas quaternárias em oligômeros e verificações de possíveis diferenças entre as estruturas no estado cristalino e em soluções (Svergun et. al., 1994).

Essa técnica utiliza-se das heterogeneidades das densidades eletrônicas, resultantes da incidência de raios X com comprimento de onda variando na faixa de 1 a 10Å, dependendo do problema a ser estudado. As

dimensões características obtidas em SAXS variam da ordem de 10 a 1000 Å, em que numerosos tipos de materiais podem ser analisados nessa escala, como: ligas metálicas, copolímeros, colóides, micelas, micro-emulsões, materiais nanoporosos e soluções de macromoléculas biológicas como proteínas, ribossomos, ácidos nucleicos, vírus dentre muitas outras. A eficiência do espalhamento aumenta linearmente com o número atômico para raios X sendo que os valores de resolução obtidos situam-se freqüentemente entre 20 - 30 Å sendo capaz para se determinar a forma aproximada, bem como o volume ocupado por subdomínios e grupos atômicos da proteína (Dias, 2004).

Macromoléculas biológicas são essencialmente compostas por átomos leves (H, C, N, O e P) e uma vez estando solubilizadas em água ocorre pouca diferença na densidade eletrônica, entre a molécula e o solvente, produzindo um espalhamento muito fraco. Entretanto esse espalhamento pode ser melhorado com o uso de feixes de raios X produzidos por fontes síncrotron, que possuem fluxos de fótons muito maiores do que aparelhos de raios X convencionais (Dias, 2004).

Quando a energia dos fótons incidentes é bem diferente da energia de ligação dos elétrons, esses elétrons comportam-se como se fossem livres e essas partículas livres, carregadas e oscilantes produzem ondas espalhadas, coerentes com a onda incidente, em todas as direções. Todas as ondas secundárias possuem a mesma freqüência, mas podem ter diferentes fases devido à diferença de caminho (Oliveira, 2001).

Devido à alta freqüência das ondas é somente possível detectar as intensidades espalhadas dependentes com o ângulo de espalhamento, que deve ser menor de 5° ($2\theta < 5^\circ$) (Figura 1.12). Essa dependência angular entre a amplitude de espalhamento e densidade eletrônica do centro espalhador é correlacionada pela transformada de Fourier. Sendo que a principal diferença entre uma estrutura obtida por difração de cristais e na técnica de SAXS ocorre devido à estrutura cristalina apresentar um arranjo periódico nas três dimensões com um grande número de repetições, enquanto que em um meio de espalhamento em solução as partículas não estão ordenadas

periodicamente, isto é, as partículas estão imersas com orientação arbitrárias e distâncias irregulares entre si (em movimento browniano), o que pode ser compensado pelo grande número de partículas (Oliveira, 2001). Essa diferença na organização molecular reflete em modificações nas análises da transformada de Fourier que para sistemas periódicos corresponde a Série de Fourier, isto é, uma expansão da estrutura periódica a uma sistema periódico de funções. Enquanto que para sistemas não periódicos de espalhamento em solução, corresponde a Integral de Fourier, isto é, uma expansão de estruturas não periódicas a um sistema de funções periódicas (Oliveira, 2001).

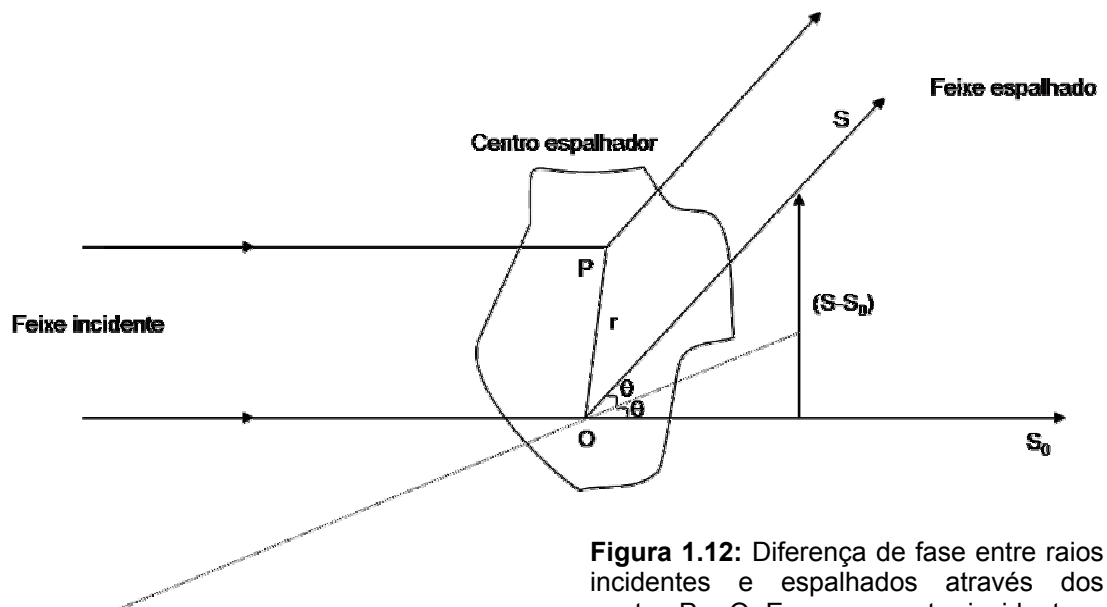


Figura 1.12: Diferença de fase entre raios incidentes e espalhados através dos pontos P e O. Em que s_0 vetor incidente, s vetor espalhado e 2θ o ângulo de espalhamento entre os vetores s_0 e s . (modificado de Small angle X-ray scattering, Glatter and Kratky, 1982 p19.)

Devido a esses ajustes existe uma perda de informação em experimentos a baixo ângulo, devido à média realizada sobre todas as orientações no espaço. O que não limita o estudo de sistemas monodispersos e polidispersos, sendo possível à determinação do tamanho, forma e em algumas circunstâncias, a estrutura interna (sistemas monodispersos). Enquanto que para sistemas polidispersos é obtida uma função de distribuição de tamanhos desde que uma forma da partícula seja assumida.

Dessa forma através da função de distribuição de pares de distâncias (FDPD), diretamente relacionada com a intensidade de espalhamento mensurável é possível resolver o problema inverso de espalhamento como visualizada na figura 1.13. Dessa maneira a partir de uma partícula com estrutura tridimensional pode-se calcular sua correspondente FDPD e a intensidade espalhada. O problema inverso de espalhamento é a tentativa para obter o tamanho, forma e estrutura interna da partícula alvo a partir da intensidade de espalhamento medida. Apesar desse problema não possuir solução única, a FDPD é de muita ajuda combinada aos métodos numéricos de recuperação tridimensional de estruturas a partir de curvas de espalhamento.

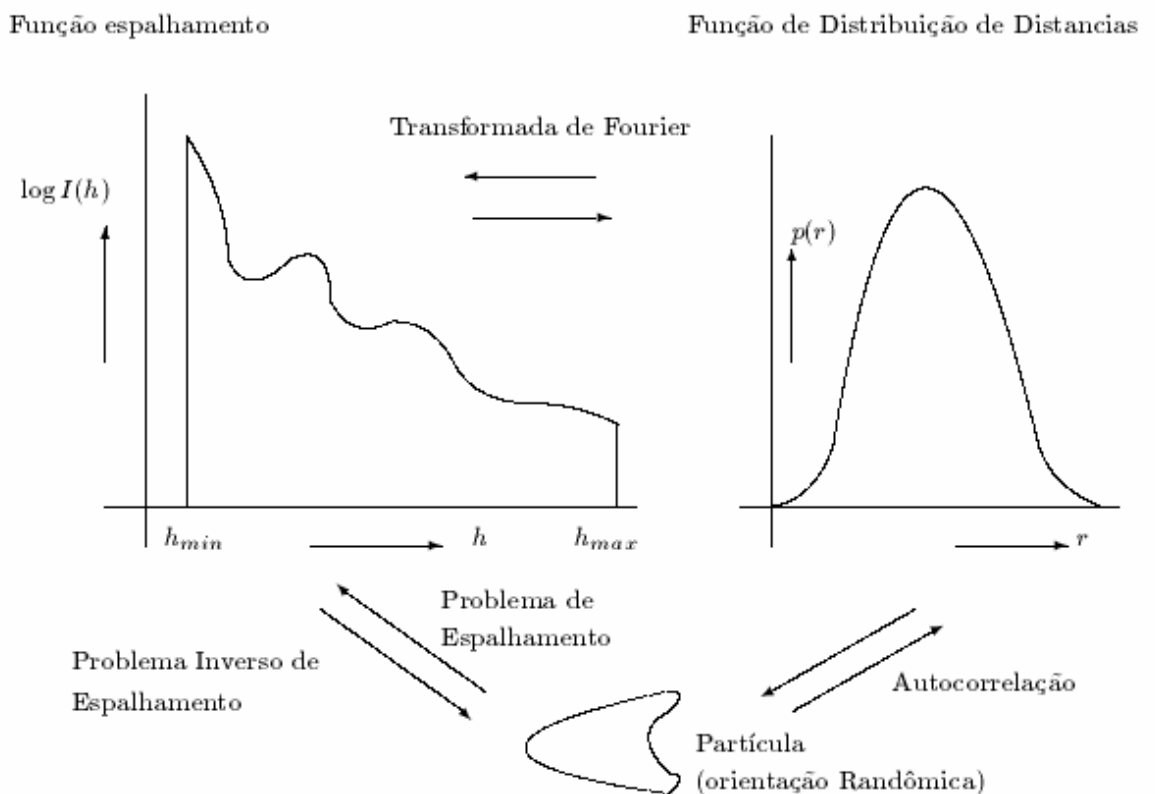
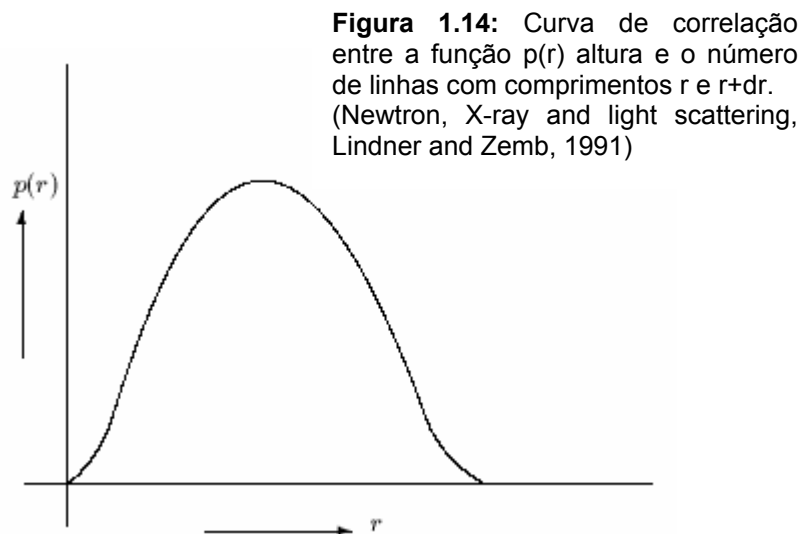


Figura 1.13: Problema inverso do espalhamento. (Newtron, X-ray and light scattering, Lindner and Zemb, 1991)

Inicialmente a partícula é subdividida em um número infinitamente grande de elementos idênticos de volume, o que se deve a proporcionalidade

da função $p(r)$ ao número de linhas com comprimentos r e $r + dr$ que são encontradas na combinação de qualquer elemento com volume i e qualquer outro elemento de volume k da partícula (Figura 1.14). No caso em que as partículas não são homogêneas, deve ser considerada a diferença obtida na intensidade eletrônica.



Quando os espalhamentos partem de sistemas monodispersos alguns parâmetros são obtidos diretamente da curva de intensidade espalhada sem a necessidade de tratamentos exaustivos dos dados obtidos, assim como:

Massa Molecular – é possível seu cálculo pela relação da intensidade a ângulo zero (I_0) dividida pelo produto da concentração da solução (C) e massa da molécula em questão (m) é igual a uma constante (k). Se usarmos a mesma relação para uma molécula conhecida e igualarmos as constantes teremos de maneira indireta a massa aproximada da molécula alvo.

Raio de Giro – capaz de medir o grau de uma dada partícula se comportar como uma esfera compacta em um meio aquoso. Dessa maneira através da Lei de Guinier é possível determinar o raio de giro em que as origens dos vetores é tomado no centro de massa da partícula.

Volume Hidrodinâmico – é necessário o cálculo do volume hidratado devido às macromoléculas em solução apresentarem uma fina camada de

água em sua superfície (camada de solvatação). Dessa maneira o volume hidratado é calculado pela divisão da intensidade espalhada pela diferença de densidades eletrônica.

Utilizando-se da função de distribuição de distâncias (PDDF), isto é, $p(r)$ e a função de intensidade $I(h)$, somada as informações de massa molecular, raio de giro e volume hidrodinâmico é possível realizar uma varredura completa a respeito da forma e estrutura das partículas espalhadoras, isto é, das macromoléculas de interesse.

Partindo-se de um padrão esférico bem conhecido, as diferenças obtidas na curva pela função $p(r)$ são capazes de predizerem a forma estrutural da macromolécula como observado na figura 1.15.

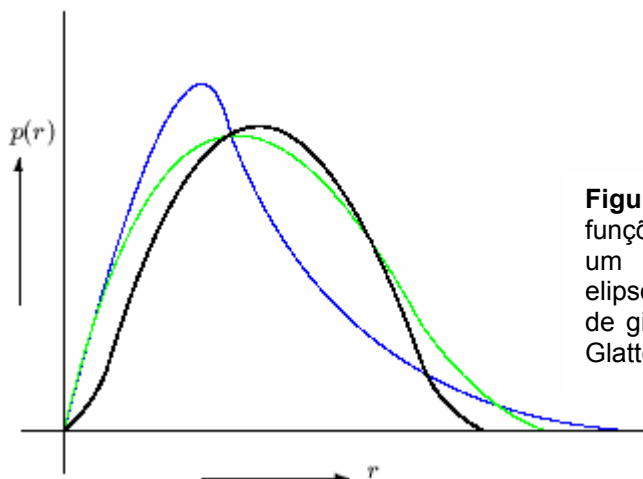


Figura 1.15: Comparações entre funções de $p(r)$ de uma esfera (—), um elipsóide prolato (—) e um elipsóide oblato (—) de mesmo raio de giro. (Small angle X-ray scattering, Glatter and Kratky, 1982 p. 179)

Quanto mais é alterado da forma esférica para estruturas alongadas uni ou bidimensionalmente, mais o máximo da função se desloca para valores menores de r ($r = R = D/2$) ao mesmo tempo em que temos um aumento de D (a máxima dimensão da partícula).

Essas análises também são utilizadas nas predições de estruturas poliméricas, entretanto nesses casos a especificação quanto a sua forma em dímero, trímero e assim por diante, isto é, a imposição de restrições quanto a simetria dessas partículas será de extrema importância na determinação tridimensional dessa macromolécula.

1.7.4. Difração de Raios X em Cristais de Proteínas

Quando estudamos biomoléculas de interesse a técnica que atualmente fornece maior informação e precisão é a difração de raios – X, uma técnica física que fornece de maneira precisa, utilizando-se amostras de tamanho mínimo cristalizadas, um grande número de informações estruturais (Malta, 2003).

Entretanto a cristalização de proteínas é um processo que envolve múltiplos parâmetros divididos em três passos clássicos: nucleação, crescimento e estabilização do crescimento. Nesse caminho até a cristalização é preciso atenção quanto à cinética das reações nas soluções protéicas devendo-se evitar que durante o processo de diminuição da solubilidade dessa não precipite ao invés de cristalizar. Dessa forma devem-se preferir processos em que as diminuições da solubilidade ocorram de forma lenta (Dias, 2004).

A estabilidade das macromoléculas biológicas em solução está baseada nas competições entre as interações solvente-soluto e as interações intramoleculares e que podem ser modificadas através dos seguintes parâmetros: Temperatura, capaz de alterar a desordem das moléculas de solvente; pH, pode alterar as concentrações de H^+ e OH^- , isto é, alterar a protonação e desprotonação dos grupos de macromoléculas; Sais, podem atuar na força iônica das moléculas; Competidores de ligações de hidrogênio, em altas concentrações competem com as ligações de hidrogênio da água e ligações de hidrogênio das macromoléculas; Aditivos hidrofóbicos, capazes de interagir diretamente com regiões hidrofóbicas das macromoléculas ou alterar as características do solvente; Solventes orgânicos, modificam a constante dielétrica (Dias, 2004).

Muitas são as técnicas utilizadas na cristalização de macromoléculas, sendo o mais freqüente, a Técnica de Difusão a Vapor, em que a solução protéica por ficar pendurada, “hanging drop” ou num poço “sitting drop”. Nessa técnica uma pequena gota, 2-10 μ L de proteína é misturada com um volume similar de solução de cristalização e colocada de forma vedada do meio

externo num recipiente contendo 500-1000 μL de solução de cristalização. A solução de cristalização é formada por um tampão, sal e um agente precipitante. A diferença entre a concentração de soluto entre a gota e o reservatório de solução cristalizante direciona esse sistema, devido a diferença de potencial químico, há um equilíbrio de concentrações entre a gota e a solução do reservatório, através da difusão da fase de vapor da solução menos concentrada, a gota, para a mais concentrada, o reservatório. Esse equilíbrio varia de 2-10 dias, no caso de soluções contendo sal até a 25 dias quando usado soluções contendo PEG (Polietilenoglicol) (Dias, 2004).

1.8. Desenvolvimento de Fármacos Capazes de Bloquear a Biossíntese de Selenocisteína

O aminoácido selenocisteína está presente em grande número de enzimas provenientes de eubactérias, arqueobactérias e eucariontes (Forchhammer et al., 1991a), sendo incorporado nas proteínas segundo algumas características próprias como explicado no item 1.3.

O desenvolvimento de fármacos inibidoras das aminoacil-tRNA sintetases, ou ainda de substratos capazes de se ligarem competitivamente ou de maneira irreversível a biomoléculas envolvidas na via biossintética da selenocisteína poderiam bloqueá-la .

Trabalhos como de KIM (2003) e TAO and SCHIMMEL (2000) abordaram vários pontos na tentativa de bloquear reações catalisadas pelos aaRSs como: interromper a ligação de substrato-aaRSs, através de substratos análogos de aminoácidos e ATP, pois o reconhecimento específico dos tRNA pelos aaRSs, possibilita o desenvolvimento de inibidores específico; bloquear o segundo estágio da reação aminoácido-tRNA, pela geração de uma enzima que mimetize a reação intermediária da adenilação do aminoácido; o desenvolvimento de antibióticos contra aaRSs, pois ao longo da evolução os aaRSs acumularam ampla variedade estrutural.

O desenvolvimento de fármacos capazes de bloquear a síntese de aminoácidos é bastante promissor não apenas devido às diferenças

encontradas nas aaRSs dos diferentes organismos vivos, mas devido à abundância de informações das seqüências e estruturas que podem servir de substrato para estudos nessa área.

Assim, o estudo da proteína SELA, uma proteína com função enzimática importante na biossíntese do selenocisteína em bactérias *E. coli* pode auxiliar na compreensão da estrutura e atuação dessa enzima.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um novo protocolo de purificação da proteína Selenocisteína Sintase (SELA) de *Escherichia coli* bem como sua caracterização molecular e bioquímica da, através de estudos estruturais utilizando-se as técnicas de espalhamento dinâmico de luz, dicroísmo circular e por meio de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. Além dos ensaios referentes à enzima SELA, interações *in vitro* com o tRNA^{sec}_{uca}, responsável pelo transporte do Selenocisteína até a tradução em selenoproteínas serem pretendidos, na tentativa de identificar as interações SELA-tRNA^{sec}_{uca}. Abordagem que poderá vir a contribuir no esclarecimento do mecanismo enzimático da SELA na síntese de selenocisteínas. Em conjunto com outras abordagens experimentais e integrado a outros projetos de pesquisa dentro de uma linha seguida pelo nosso grupo, a dissertação apresentada vem a contribuir no entendimento dos mecanismos estruturais e moleculares da síntese de selenocisteínas. A descrição dos diversos objetivos inicialmente proposto neste projeto encontra-se enunciados a seguir:

1. Clonagem do gene selA de *Escherichia coli*;
2. Estabelecimento de um protocolo de expressão e purificação da proteína SELA;
3. Produção de anticorpos policlonais, a partir da proteína pura, para testes utilizando outras espécies para verificação de reação cruzada e possível identificação de homólogos;
4. Caracterização estrutural:
 - a. Por espalhamento de luz dinâmica (DLS)
 - b. Por análise de dicroísmo circular (CD)
 - c. Por espalhamento de luz a baixos ângulos (SAXS)
5. Clonagem do gene selC de *Escherichia coli*;
6. Transcrição *in vitro* e purificação do tRNA^{sec}_{uca} para posterior ensaios de interação com a proteína SELA.

III. JUSTIFICATIVA E PERSPECTIVAS

A via de síntese de selenocisteínas e sua incorporação co-traducional em fase com comuns UGA de terminação representa uma via complexa e intrigante presente em todos os organismos estudados. O entendimento dos mecanismos enzimáticos envolvidos nessa via, através do estudo das enzimas participantes, representa uma área de grande interesse. A enzima SELA participa de forma central nessa via, sendo que seu gene (*sela*) foi apenas identificado em bactérias, não tendo sido identificado em outros organismos por buscas de similaridade seqüencial. Este intrigante fato desperta maior interesse sobre esta enzima, pois pode representar uma divergência na evolução da via de síntese de selenoproteínas com importantes conseqüências.

O presente trabalho faz parte de uma linha de pesquisa estabelecida em nosso grupo com o objetivo de estudar a via de síntese de selenocisteínas através de seus componentes enzimáticos.

Nenhum estudo estrutural, com exceção de ENGELHADT (1992) foi realizado sobre a SELA até o presente momento. Apesar da técnica utilizada STEM ter possibilitado a determinação aproximada da massa, dimensões e forma da proteína SELA, esta apresentou um baixo grau de resolução não permitindo o detalhamento tanto da estrutura da proteína SELA com da interação dela com o respectivo tRNA^{sec}_{uca}.

Apesar do interesse na cristalização e elucidação da estrutura 3D da SELA, este representa um desenvolvimento futuro do trabalho. Uma contribuição importante deste trabalho foi o estudo estrutural da SELA por técnicas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), o espalhamento dinâmico de luz (DLS) e dicroísmo circular (CD). Técnicas que podem ser realizadas sem a necessidade da obtenção de cristais de proteína.

O espalhamento de raios-X a baixos ângulos, mais freqüentemente denominado de SAXS (Small Angle X-ray Scattering) é uma técnica experimental que permite o estudo de características estruturais de “partículas” ou mais geralmente de “heterogeneidades de densidade eletrônica” de

dimensões coloidais (entre 1 e 100 nm). Qualquer processo de espalhamento elástico dos raios-X é sempre caracterizado por uma relação inversa entre o tamanho dessas heterogeneidades e o ângulo de espalhamento. Dessa forma, para partículas de tamanho maior que as distâncias interatômicas e para uma radiação incidente de 1,5Å, o espalhamento produzido se limita a ângulos baixos, entre 0,1° e 5°.

O espalhamento de raios-X a baixos ângulos é amplamente utilizado para estudos estruturais de baixa resolução de macromoléculas em solução. Com esta técnica pode-se obter informações detalhadas sobre raio de giro, volume, superfície molecular e estado de oligomerização da SELA. Cálculos *ab initio* do enovelamento molecular por anelamento simulado ou técnica de algoritmos genéticos também podem ser utilizados. Estas técnicas vem sendo trabalhadas pelo grupo em seus estudos preliminares de proteínas estruturalmente desconhecidas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Foram utilizados para clonagens do DNA referente aos genes de *Escherichia coli* para a proteína Selenocisteína Sintase (SELA) e para o ácido ribonucléico transportador (tRNA^{sec_{uca}}) os plasmídeos pGEM-T (Promega), pET28a+, pET29a+ (Novagen) e pUC19 (Fermentas Life Sciences).

As enzimas de restrição *Nde* I, *Hind* III, *Eco* RI, *Xba* I, *Bst* NI, enzima Ligase T4, enzima Taq DNA Polimerase, enzima Platinum Taq DNA Polimerase “High Fidelity”, enzima T7 RNA Polimerase e seus respectivos tampões e cofatores (Invitrogen Life Technologies, New England Biolabs, Promega), também foram utilizados nas reações de transcrição *in vitro* inibidores de RNase e Pirofosfatase, para a reação de RT-PCR o Kit Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen), bem como para demais soluções e técnicas reagentes provenientes da Merk e Sigma Chemical Co.

Cepas bacterianas *Escherichia coli* DH5 α , BL21, ER2566 competentes por cloreto de cálcio. Meios de cultura líquidos e sólidos para crescimento bacteriano LB e LB-ágar, antibióticos ampicilina e kanamicina.

Estufa (Precision) e agitador (Innova 4430 Incubator Shaker) para cultivo bacteriano, espectrômetro (Hitachi U-2000 Spectrophotometer), sonicador (550 Sonic Dismembrator Fisher Scientific), centrífuga Sorvall RC Plus (Ou Pont), cubas de eletroforese horizontais e verticais e para purificação de proteínas AKTA Explore Automated Liquid Chromatography System (Amersham Bioscience).

Também foram utilizados para extrações de DNA: DNAzolTM Reagent Genomic Dna Isolation Reagent (Life Technologies), Wizard^R Genomic DNA Purification Kit (Promega) e Dneasy^R Tissue Kit (Qiagen) para DNA genômico e Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification System Kit (Promega) para DNA plasmideal; para recuperação e purificação de DNA de géis de agarose Eppendorf Perfect Gel Cleanup Kit (Eppendorf).

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

Oligonucleotídeos para amplificação do gene Selenocisteína Sintase (selA):

SELA3–E1 5' ACTGTATCATATGACAACCGAAACGCGTTTC CTCTATAG 3'

SELA–E2 5' TAGCTAAGCTTTTCATTTCAACAACATCTCCAAAACCG 3'

Oligonucleotídeo interno a seqüência do gene Selenocisteína Sintase (selA) para reação de seqüenciamento:

SELA – I3 5' TACTGGCTAAGATCGACCAGCGAGCCACTG 3'

Oligonucleotídeos para amplificação do gene de Inserção Selenocisteína – tRNA^{sec}_{uca}:

SELC-1 5' ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGGGAAGATCGTCGT CTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATCCAGTTG 3'

SELC-2 5' ACTCTAGACCTGGGGAAGATCACAGGAGTCGAACCTGCCC GGGACCGCTGGCGGCCCAACTGGATTTGAAGTCCAG 3'

SELC-1b 5' GGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGG 3'

SELC-2b 5' TGGCGGAAGATCACAGGAGTCG 3'

O registro do DNA manipulado foi realizado através de câmera digital Kodak Digital Science DC120 (KODAK).

Todas as subclonagens obtidas foram seqüenciadas em seqüenciador automático ABI Prism™ 377 DNA Sequencer. Para as realizações de seqüenciamento utilizou-se os oligonucleotídeos comerciais localizados nos respectivos vetores de clonagem, além de “Sequencing Reagent Premix”, “Formamide Loading Dye” (Amersham Pharmacia Biotech) para reações de amplificações e ressuspensão para posterior aplicação em gel de seqüenciamento.

Para purificação da proteína SELA colunas de cromatografia de troca iônica Deae Sepharose Fast Flow, Hi Trap Q HP (Amersham Bioscience) e Hydroxyapatite (Bio-Rad - ceramic type II). E coluna Hi Trap Desalting (Amersham Bioscience), para retirada do sal da solução protéica.

Para concentração da proteína SELA concentradores 10000 MWCO (Millipore).

A produção de anticorpos policlonais foi realizada em camundongos *Mus musculus*.

E os ensaios estruturais de Espalhamento Dinâmico de Luz - DLS (Protein Solution DynaPro), Dicroísmo Circular - CD (Circular Dichroism J-720 Spectropolarimeter – Jasco) e Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo – SAXS utilizando o feixe de radiação eletromagnética a partir de fonte Síncrotron (LNLS).

4.2. Métodos

Toda a metodologia de manipulação de DNA e microrganismos foi realizada como descrito em SAMBROOK and RUSSEL (2001). A metodologia de expressão e purificação da proteína SELA foi seguida segundo FORCHHAMMAN et al. (1991a), acrescidas de modificações descritas no item 4.2.9 deste trabalho. A produção de anticorpos policlonais foi feita segundo HARLOW and LANE (1988). A transcrição *in vitro* do tRNA^{sec}_{uca} foi realizada segundo AMBERG et al. (1996), acrescidas de algumas modificações descritas no item 4.2.18 deste trabalho.

4.2.1. Amplificação do gene Selenocisteína Sintase (selA)

O gene para Selenocisteína Sintase (selA) foi obtido a partir de DNA genômico extraído e purificado de *Escherichia coli* DH5 α , utilizando-se oligonucleotídeos (SELA3-E1 e SELA-E2) descrito no item 4.1, que flanqueassem as extremidades do gene acrescidos de seqüências reconhecidas por enzimas de restrição que facilitassem a posterior subclonagem aos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+.

Para a reação de amplificação foram utilizados 300ng do DNA genômico molde de *Escherichia coli*, 2,5 unidades da enzima de amplificação Platinum High Fidelity e 5,0 μ L de seu respectivo tampão para uma concentração final de [1X], foram adicionados também 1,0 μ L de dNTPs [10mM], 1,5 μ L de MgSO₂ [50mM] e 1,0 μ L de ambos os oligonucleotídeos (SELA3-E1, SELA-E2) [100pMol/ μ L], resultando em um volume final de 50 μ L, que foi amplificado em termocilcador PTC-100TM, conforme descrito na tabela 4.1:

AMPLIFICAÇÃO GENE SELA					
CICLO	1x	30x			1x
T (°C)	95	95	55	68	4
TEMPO	2 min	45 s	30 s	1,5 min	indefinido

Tabela 4.1: Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene selA de *Escherichia coli* a partir de DNA genômico.

O fragmento de 1392 pb amplificado foi purificado de gel de agarose 1%, utilizando o Kit Eppendorf Perfect Gel Cleanup, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 200ng/ μ L.

4.2.2. Clonagem do inserto selA ao vetor pGEM-T

O inserto selA amplificado conforme descrito no item 4.2.1 foi previamente adenilado para posterior ligação ao vetor de clonagem pGEM-T. Para a reação de adenilação foram utilizados 5 μ L do DNA amplificado

[100ng/μL], 1,0μL de enzima Taq DNA Polimerase [5U/μL] e 1,0μL de seu respectivo tampão para uma concentração final de [1X], foram adicionados também 0,5μL de dATP [1mM], 0,5μL de MgSO₂ [50mM], resultando em um volume final de 10μL. A reação permaneceu a 70° C por 30 minutos.

O inserto adenilado é então ligado ao vetor de clonagem pGEM-T adicionado-se a reação 3,0μL do DNA adenilado [50ng/μL], 1,0μL do vetor [50ng/μL] respeitando a proporção recomendada 3 : 1 (insertos : vetor), 1,0μL enzima T4 DNA Ligase [1U/μL] e 5,0μL de seu respectivo tampão para uma concentração final [1X], resultando em um volume final de 10μL que permaneceu ligando aproximadamente 16 horas a 4° C.

4.2.3. Clonagem do inserto selA aos vetores pET28a+ e pET29a+

A escolha dos vetores de expressão pET28a+ e pET29a+ deve-se aos ótimos resultados de expressão promovidos por tais vetores que utilizam-se de uma região promotora T7 anteriormente localizada ao inserto do gene em estudo e a um bom sistema de controle de indução através da variação da quantidade ministrada do indutor Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside (IPTG). Outra vantagem desses vetores encontra-se na presença de uma seqüência codificante para um grupo de 6 histidinas localizados 5' e 3' respectivamente ao gene de estudo. Na construção pET28a-selA uma cauda de histidina é codificada na região N-Terminal da proteína para posterior auxílio durante sua purificação. Essa cauda de histidina é separada do gene por uma região de reconhecimento pela enzima Trombina para posterior clivagem e retirada dessa cauda após a purificação da proteína SELA. Na construção pET29a-selA apesar de uma seqüência codificante de 6 histidinas ser encontrada na região 3' ao gene inserido, essa não é codificada pela presença de um códon de terminação presente no final da seqüência do gene selA.

Inicialmente o inserto selA amplificado conforme descrito no item 4.2.1 foi digerido utilizando-se as enzimas de restrição *Nde* I e *Hind* III que flanqueiam suas extremidades. Para a reação de digestão utilizou-se aproximadamente 6μg do inserto amplificado, 1,0μL de enzima *Hind* III

[10U/ μ L], 0,5 μ L de enzima *Nde* I [20U/ μ L] e 3,0 μ L de tampão React 2 para uma concentração final [1X] resultando em um volume final de 30 μ L de reação que permaneceu a 37° C por 3 horas.

Do mesmo modo os vetores pET28a+ e pET29a+ foram digeridos utilizando-se as mesmas enzimas que flanqueiam o inserto selA. Dessa forma para a reação de digestão foram utilizado aproximadamente 2,6 μ g do DNA plasmideal pET28a+ e pET29a+, 0,5 μ L de enzima *Hind* III [10U/ μ L] e *Nde* I [20U/ μ L] e 2,0 μ L de tampão react 2 para uma concentração final [1X] resultando em um volume final de 20 μ L de reação que permaneceu a 37° C por 3 horas.

O inserto digerido foi então ligado ao vetor digerido com sítios de clonagens complementares. A reação de ligação de aproximadamente 16 horas a 16° C, utilizou aproximadamente 350ng de DNA plasmideal digerido, 250ng de inserto digerido, 1,0 μ L de enzima T4 DNA Ligase [3U/ μ L] e 2,0 μ L do seu respectivo tampão para uma concentração final de [1X] resultando em um volume final de 20 μ L de reação.

4.2.4. Transformação de células *E. coli* competentes

As células competentes de *E. coli* DH5 α , BL21 e ER2566, pelo método do cloreto de cálcio, mantidas estocadas congeladas a -80° C, foram utilizadas para receber as ligações do gene selA junto aos vetores de clonagem pGEM-T, pET28a+ e pET29a+ assim como cepas de *E. coli* DH5 α utilizadas para receber a ligação do gene selC junto aos vetores pGEM-T e pUC19.

Alíquotas de 30 μ L de células competentes foram descongeladas em gelo, 10 μ L da ligação foi adicionado e homogeneizado cuidadosamente no tubo de células. Em seguida a mistura permaneceu em banho maria 42° C por 90 segundos e transferida em seguida ao gelo onde permaneceu por 5 minutos. 260 μ L de meio LB foi adicionado a mistura que permaneceu sob leve agitação por 1 hora a 37° C. Decorrido esse tempo 100 μ L da mistura foi plaqueada em meio sólido LB-ágar com seu respectivo antibiótico. Os 200 μ L restantes foram concentrado 4X (5000rpm por 2 minutos) e plaqueado em uma segunda placa.

No caso da ligação utilizando-se o vetor pGEM-T e pUC19 o antibiótico em questão foi ampicilina [100µg/mL], para vetores pET28a+ e pET29a+ o antibiótico requerido foi kanamicina [25µg/mL]. Além do antibiótico as placas que receberam cepas contendo o inserto+pGEM-T devem conter 0,5mM de IPTG (Isopropyl-Thio-B-D-Galactopyranoside) e 80µg/mL de X-Gal (5-Bromo 4-Cloro 3-Indocyl β-D-Galactosídeo).

4.2.5. Caracterização das cepas recombinantes

Após a transformação das cepas de *E. coli* segundo descrito no item 4.2.4 as colônias resultantes necessitam de confirmação quanto à aquisição do plasmídeo recombinante.

Para cepas que receberam produto de ligação+pGEM-T uma primeira seleção é feita visualmente pela coloração das colônias transformadas. Colônias azuis (não recombinantes) e colônias brancas (recombinantes). A análise pela coloração das colônias é muito eficiente, devido ao inserto ligado ao vetor pGEM-T retirar de fase o gene para a β-Galactosidase impedindo sua transcrição e evitando que o X-Gal seja degradado o que resultaria na coloração brancas das colônias recombinantes. Entretanto, é preciso ater-se que algumas vezes o inserto clonado no vetor pGEM-T não altera a fase de leitura para o gene β-Galactosidase e mutações ou mesmo a ausência de códons de terminação do inserto podem resultar em recombinantes com coloração levemente azuis.

Além da análise por coloração tanto cepas que possuem ligação inserto+pGEM-T como inserto+demais vetores descrito no item 4.1 foram analisadas utilizando a técnica de PCR de colônia ou análise de restrição utilizando enzimas que flanqueiam o gene. Posteriormente os plasmídeos recombinantes foram submetidos a seqüenciamento como descrito no item 4.2.6.

Na técnica de PCR de colônia, as colônias crescidas em meio sólido LB-ágar após transformação são crescidas em meio líquido LB por aproximadamente 14 horas, 250rpm 37° C. Decorrido esse tempo alíquotas de

5 μ L das culturas crescidas são misturadas com outras alíquotas formando pequenos grupos de 5 colônias. A cada grupo é adicionado 25 μ L de água para posterior ser fervido por 5-10 minutos para rompimento da parede celular e liberação do material genético ao meio. Em seguida uma reação de PCR é preparada, utilizando 5 μ L da mistura de DNA e oligonucleotídeos capazes de alinharem ao vetor em questão. Dessa maneira caso o inserto esteja presente em alguma colônia do grupo analisado uma amplificação referente ao seu tamanho mais uma pequena seqüência da região de múltipla clonagem (polilinker) será visualizada posteriormente em gel de agarose, caso o vetor de clonagem não tenha recebido o inserto em estudo, apenas a região de múltipla clonagem será amplificada indicando a ausência do inserto. A técnica de PCR de colônia é muito utilizada devido a sua fácil, rápida e precisa análise na busca de colônias recombinantes.

4.2.6. Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes

As amostras pGEMT-selA, pET28a-selA e pET29a-selA selecionadas pela técnica de PCR de colônia foram seqüenciadas utilizando oligonucleotídeos comerciais presentes nos vetores de clonagem pGEM-T, pET28a+ e pET29a+. Devido ao tamanho do gene em questão e a limitação da técnica de seqüenciamento, oligonucleotídeos sense SELA3-E1 (anterior ao gene clonado), reverso SELA-E2 (posterior ao gene clonado) e um oligonucleotídeo reverso interno ao gene SELA-I3 foram utilizados para que todo o gene pudesse ser seqüenciado e assim verificado a ocorrência de possíveis mutações.

Na reação e seqüenciamento utilizou-se aproximadamente 500ng do DNA plasmideal recombinante, 2,0 μ L de “Sequencer Reagent Premix” (uma mistura de dNTPs, ddNTPs e enzima), 10pmol do oligonucleotídeo em questão, completando a reação com água milli-Q autoclavada para um volume final de 10 μ L. O fragmento de interesse foi amplificado em termociclador conforme o ciclo abaixo:

PCR DE SEQÜENCIAMENTO					
CICLO	1x	35x			1x
T (°C)	96	96	55	68	4
TEMPO	2 min	20 s	15 s	1 min	indefinido

Tabela 4.2: Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para seqüenciamento das clonagens do inserto selA nos respectivos vetores pGEM-T, pET28a+ e pET29a+.

Após a amplificação a amostra foi purificada com a adição de 80µL de isopropanol 75%, permanecendo em repouso (protegido da luz e a temperatura ambiente) por 15 minutos. Decorrido esse tempo a amostra foi centrifugada 45 minutos a 13000rpm. O sobrenadante é descartado e 200µL de etanol 70% gelado é adicionado ao tubo. A amostra foi novamente centrifugada 10 minutos a 13000rpm. O sobrenadante é descartado e após a secagem do material a temperatura ambiente, a amostra é ressuspendida em 3µL de “Formamide Loading Dye” para posterior aplicação em gel de seqüenciamento.

4.2.7. Primeiros ensaios de expressão da proteína SELA

Após a clonagem e confirmação das construções recombinantes pET28a- selA e pET29a-selA, cepas de expressão BL21 foram transformadas conforme descrito no item 4.2.4. Para os primeiros ensaios de expressão e purificação foi dada preferência a construção pET29a-selA devido a ausência da cauda de histidina (descrito no item 4.2.3).

Dessa maneira um pré-inóculo de 5mL contendo cepas BL21 transformadas com a construção pET29a-selA foram cultivadas em meio de cultura líquido LB aproximadamente 14 horas sob agitação de 250rpm a 37° C, com seu respectivo antibiótico kanamicina [25µg/mL]. Da mesma forma um controle negativo de cepas BL21 transformadas com pET29a+ foi cultivado.

Após atingida a saturação do meio de cultura uma alíquota de 50µL (1:100) de cada um dos pré-inóculos foi transferido para um novo tubo de LB+kanamicina [25µg/mL] que permaneceu por 2 horas sob agitação de

250rpm a 37° C. Decorrido esse tempo 0,1mM do indutor IPTG foi adicionado aos tubos de cultura para início da expressão que prolongou-se por 2 horas sob mesmas condições de agitação e temperatura.

Terminado o período de indução as culturas foram centrifugadas por 5 minutos a 4000rpm. Os precipitados foram ressuspensos em 500µL de tampão G (50mM Fosfato de Potássio pH7,4; 1mM de EDTA; 3mM de DTT) contendo 0,6mM de PMSF e alíquotas referente a cada um dos precipitados ressuspensos foram retiradas e misturadas a tampão TA [3X] contendo β-mercaptoetanol na proporção 1 : 2 (amostra : tampão) e colocadas sob gelo para posterior análise em SDS-PAGE 15%. Ao precipitado ressuspendido (construção pET29a-selA) foi adicionado [3mg/mL] de Lisozima permanecendo em repouso sob gelo por 30 minutos para facilitar o rompimento da parede celular. Decorrido esse tempo a amostra foi sonicada com 4 pulsos de 15 segundos cada (intensidade 4) e intervalos entre eles de 30 segundo. Novamente uma alíquota foi retirada após a sonicação para verificação de eventuais perdas da proteína em estudo.

A cultura sonicada foi centrifugada por 15 minutos a 13000rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e novamente uma alíquota foi retirada. O precipitado formado foi lavado com tampão G e ressuspendido em 500µL de tampão G para retirada de nova alíquota.

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

4.2.8. Primeiros ensaios de purificação da proteína SELA

Os primeiros ensaios de purificação da proteína SELA foram seguidos como sugerido por FORCHHAMMER et al. (1991a).

Dessa maneira pré-inóculos com cepas BL21 contendo plasmídeo pET29a+ (controle negativo) e pET29a-selA foram cultivados por aproximadamente 14 horas em meio contendo antibiótico kanamicina [25µg/mL]. Após atingido a saturação do meio de cultura dos pré-inóculos

contendo as cepas BL21-pET29a-selA estas foram transferidas para erlenmeyers contendo meio de cultura LB e kanamicina [25µg/mL] na proporção 1 : 100 (pré-inóculo : meio de cultura novo). O controle negativo (cepas BL21-pET29a+) foi transferido para um novo tubo de pré-inóculo acompanhando o crescimento das cepas do erlenmeyer.

As culturas nos erlenmeyer permaneceram em cultivo até uma densidade óptica $D.O_{600nm}$ igual a 1, sob agitação constante 250rpm e temperatura 37° C. Após a D.O ser atingida a cultura foi induzida com 0,1mM de IPTG por duas horas sob mesma condição de agitação e temperatura.

Após o tempo de indução a cultura induzida foi centrifugada 10 minutos a 6000rpm, 4° C em um tubo sorvall previamente, pesado para retirada do meio de cultura LB.

O controle negativo também foi induzido com 0,1mM de IPTG conforme os tempos utilizados para a cultura do erlenmeyer e centrifugado 5 minutos 4000rpm, 4° C em um tubo falcon para retirada do meio de cultura LB.

Ambos os precipitados (pellets) foram lavados com tampão G (50mM Fosfato de Potássio pH 7,4; 1mM de EDTA; 3mM de DTT) novamente centrifugados e secos para posterior ressuspensão em tampão H (50mM Fosfato de Potássio pH 7,4; 1mM de EDTA; 3mM de DTT; 0,6mM de PMSF; 10µM de Piridoxal 5'-Fosfato). Para cada 1g de precipitado (peso úmido) adicionar 3mL de tampão H, com relação ao controle negativo, este foi ressuspendido num volume de 60µL de tampão H respeitando a proporção calculada através do peso por volume obtida da cultura positiva.

Alíquotas tanto do controle negativo como da cultura positiva foram retiradas para posterior análises em SDS-PAGE da mesma forma como descrito no item 4.2.7. As manipulações com o controle negativo terminam nesse passo.

Ao ressuspendido positivo adicionou-se [10µg /mL] de lisozima que ficou em repouso 30 minutos sob gelo. Em seguida o ressuspendido foi sonificado para rompimento das células bacterianas com pulsos de 30 segundos cada (potência 4) e intervalos de 1 minuto entre eles até que o ressuspendido bacteriano denso apresentasse mais líquido e homogêneo. Novamente uma

alíquota do sonicado foi retirada e o restante centrifugado por 30 minutos a 30000G, 4° C.

O sobrenadante foi medido, transferido para um novo tubo e aliquoteado. O precipitado é lavado, ressuspendido utilizando o mesmo volume inicial de tampão H e aliquoteado.

Ao sobrenadante foi acrescentado 25% de sulfato de amônio, previamente macerada, sob leve agitação utilizando um agitador eletromagnético (pulga eletromagnética). Após a homogeneização a solução é centrifugada 20 minutos a 20000G, 4° C. O sobrenadante pós-sulfato de amônio é aliquoteado e descartado. O precipitado pós-sulfato de amônio (contendo a proteína SELA) é ressuspendido em média de 6mL de tampão I (20mM Fosfato de Potássio pH7,4; 0,5mM de EDTA; 2mM de DTT; 10µM de Piridoxal 5'-Fosfato) para cada 1 litro de cultura induzido e colocado para dialisar em 2 litros de tampão I (500mL por duas horas, 500mL por duas horas e 1L 14 horas). Após a diálise a solução foi centrifugada 15 minutos a 13000rpm para eliminação que qualquer precipitado. Uma alíquota previamente e posteriormente a diálise foi retirada e a solução protéica foi aplicada à colunas de purificação descritas abaixo.

A partir desse ponto a metodologia empregada por FORCHHAMMER *et al.* (1991a), utiliza-se de duas colunas de troca iônica, uma coluna de exclusão de massa molecular (gel filtração) e mais uma etapa de precipitação com 40% de sulfato de amônio.

Inicialmente a coluna aniônica Deae Sepharose Fast Flow previamente equilibrada com tampão I é usada para purificação da proteína SELA que deve ser eluída contra um gradiente linear de cloreto de potássio (20–220mM).

A fração relativa a proteína SELA (em torno de 180mM do gradiente linear de KCl) é separada e aplicada a segunda coluna de troca iônica BioGel HTP Hydroxyapatite previamente equilibrada com tampão I. A fração adsorvida na coluna deve ser eluída contra um gradiente linear de 20–200mM de fosfato de potássio, capaz de liberar a proteína SELA entre 50–124mM de sal.

A fração relativa à proteína SELA é precipitada com 40% de sulfato de amônio sob gelo. Após a adição do sulfato de amônio a solução protéica é

centrifugada 20 minutos a 20000G, 4° C e o precipitado é ressuspendido em 4,5mL de tampão I e dialisado por 16h contra tampão I para total solubilização da proteína SELA.

Após a diálise uma nova centrifugação por 20 minutos a 20000G, 4° C é realizada para eliminação de possíveis precipitados. A fração solúvel deve ser aplicada em uma terceira coluna de purificação, a coluna de gel filtração Sephacryl S300, equilibrada previamente com o tampão J (50mM Fosfato de Potássio pH7,5; 0,5mM de EDTA; 2mM de DTT; 10µM de Piridoxal 5'-Fosfato).

A fração contendo a proteína SELA é concentrada até aproximadamente 1mg/mL, utilizando-se um saco de diálise contra uma solução de polietileno glicol 20000.

4.2.9. Padronização de um novo protocolo de purificação da proteína SELA

Devido a problemas encontrados durante a purificação utilizando a metodologia desenvolvida por FORCHHAMMER et al. (1991a), apenas parte desse protocolo foi utilizada, desde a expressão até a precipitação com 25% de sulfato de amônio, sendo que a partir dessa etapa uma nova metodologia foi desenvolvida para purificação da proteína SELA como será descrita a seguir.

Dessa maneira o precipitado pós-sulfato de amônio (contendo a proteína SELA) é ressuspendido em média de 6mL de tampão I' (20mM Fosfato de Potássio pH7,4; 10µM de Piridoxal 5'-Fosfato) para cada 1 litro de cultura induzida, e posteriormente passada pela coluna Hi Trap Desalting previamente equilibrada em tampão I' para retirada do sulfato de amônio.

Após a retirada do sulfato de amônio, a solução protéica será passada na coluna de troca iônica Hydroxyapatite, previamente equilibrada em tampão I'. Parte da proteína SELA é eluída durante a lavagem da coluna enquanto que outra parte da proteína SELA é eluída entre 80-100% do gradiente linear de 20–500mM de fosfato de potássio.

A fração contendo a proteína SELA obtida durante a lavagem da coluna de Hydroxyapatite foi aplicada em uma segunda coluna aniônica Hi Trap Q HP

previamente equilibrada em tampão I' e eluída durante o gradiente linear de cloreto de potássio (20–1000mM) em dois picos, entre 443–544mM e 544–661mM respectivamente.

A fração referente ao pico eluído entre 443–544mM de sal foi passada novamente na coluna Hi Trap Desalting previamente equilibrada em tampão I' para retirada do cloreto de potássio e concentrada até 7,5mg/mL.

Esse novo método de purificação foi desenvolvido com a ajuda da Dra. Raquel Kelly Bortoleto Bugs do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

4.2.10. Esquemas de purificação utilizados

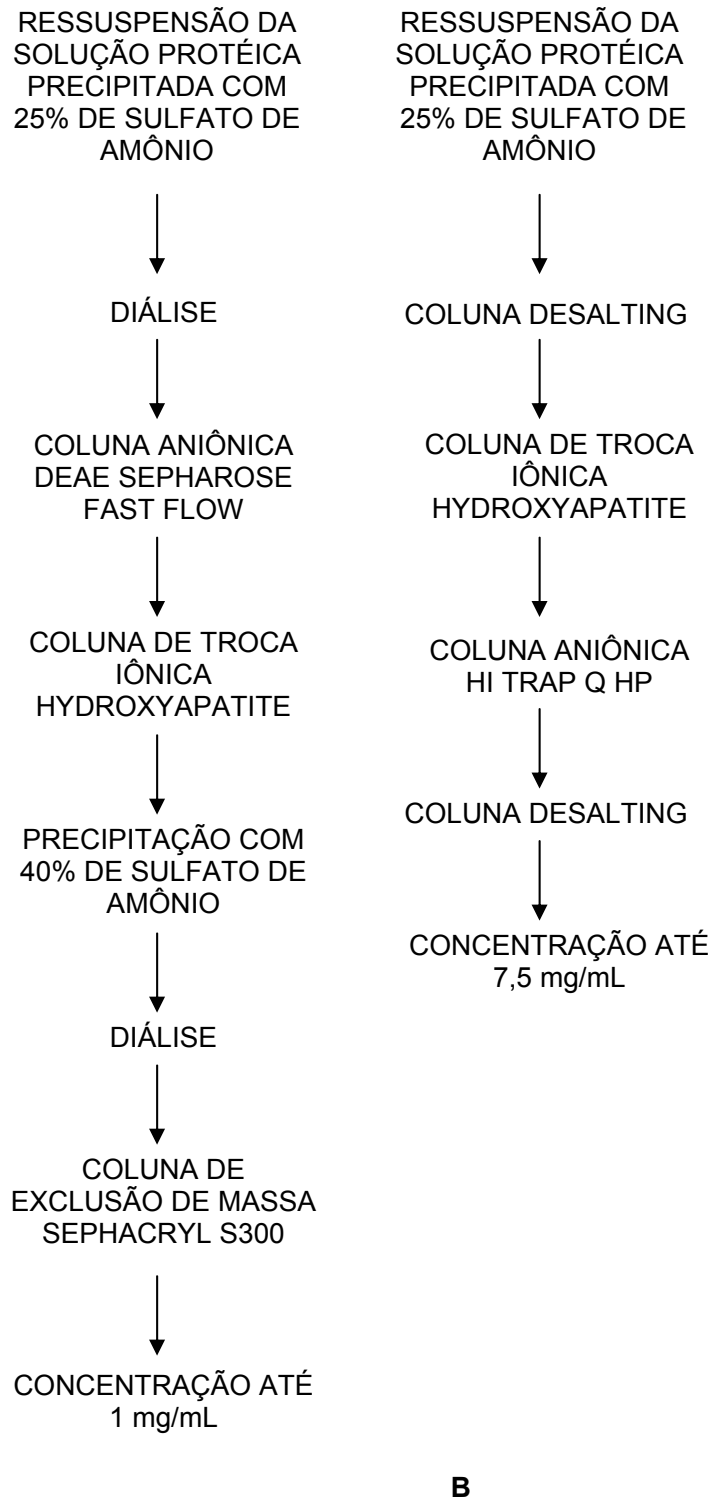


Figura 4.1: Etapas envolvidas na purificação da proteína SELA de *Escherichia coli* descrita no texto item 4.2.8 e 4.2.9. Em **A**- a partir do método de Forchhamaer et. al., 1991a; em **B**- a partir do método desenvolvido neste trabalho.

4.2.11. Produção de Anticorpos Policlonais anti-SELA

Os ensaios na produção de anticorpos policlonais da proteína SELA foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Heloísa Sobreiro S. de Araújo no Laboratório de Fármacos e Bioquímica da Universidade Federal de São Carlos.

Foi usado o protocolo de indução de anticorpos, em que 100-150µL de proteína SELA (aproximadamente 500µg/mL) diluída em tampão I' (20mM Fosfato de Potássio pH7,4; 10µM de Piridoxal 5'-Fosfato) foi homogeneizada em igual volume do adjuvante completo de Freund para imediata aplicação de 50µL subcutaneamente em três camundongos *Mus musculus*.

Decorrido no mínimo 45 dias uma nova dose (booster), de 100µL de proteína SELA [100µg/mL] diluída em tampão I' foi aplicada na região peritoneal de cada um dos camundongos.

Após dez dias da segunda aplicação os camundongos foram sacrificados e o sangue coletado permaneceu sob temperatura controlada de 37° C por 4 horas para sua total coagulação. Após esse período o sangue coagulado foi centrifugado por 3 minutos a 5000rpm, temperatura ambiente. O sobrenadante (soro) foi coletado e congelado a -20° C, para posterior titulação.

4.2.12. Titulação dos Anticorpos Produzidos

Os anticorpos policlonais produzidos como descrito no item 4.2.11 foram titulados contra a proteína alvo SELA de *Escherichia coli*. A metodologia utilizada foi semelhante à técnica de Immunoblotting descrita em SAMBROOK and RUSSEL (2001).

Dessa maneira a proteína SELA aplicada em gel SDS 15% e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose, foi incubada com os anticorpos produzidos pelos três camundongos (anti-SELA – 1, 2, e 3) numa diluição 1:5000 (anticorpo : tampão), resultando em três análises independentes umas das outras. Os passos seguintes seguem conforme descrito para Immunoblotting no item 4.2.13.

Com a verificação positiva dos anticorpos, o anticorpo anti-SELA - 3 por apresentar melhor especificidade foi titulado até a diluição 1:60000.

4.2.13. Busca de Formas Homólogas da Proteína SELA a partir de Anticorpos Policlonais

Os ensaios de imunoblotting seguem conforme metodologia descrita em SAMBROOK and RUSSEL (2001).

Inicialmente extrato celulares de *Leishmania major* [5×10^7 cel/mL], *Trypanosoma cruzi* [-] e *Homo sapiens* [$3,2 \times 10^5$ cel/mL] foram lisados através de choques térmicos, 10 repetições de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho a 42° C. 20µL do lisado foi aplicado em gel SDS 15%, transferido para membrana de nitrocelulose. A verificação da transferência pode ser feita corando-se a membrana de nitrocelulose com o corante de Ponceau.

Após verificação da transferência do lisado celular dos organismos de interesse, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-SELA – 3, na diluição 1:5000 por 2 horas, lavada e incubada por mais 2 horas com anticorpos comerciais anti IgG de camundongos. Novamente essa membrana é lavada e revelada para verificação de interações entre anticorpos anti-SELA e proteínas homólogas a SELA de *Escherichia coli*.

4.2.14. Determinação Estrutural da Proteína SELA

Nosso trabalho teve como objetivo a caracterização estrutural da proteína Selenocisteína Sintase (SELA) através das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz, Dicroísmo Circular, Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo.

4.2.14.1. Espalhamento Dinâmico de Luz

Variadas concentrações de proteína SELA foram medidas utilizando-se o software DynaPro Dynamic Light Scattering versão 5.26.60.

Aproximadamente 14 μ L de proteína SELA diluída em tampão I' (20mM Fosfato de Potássio pH7,4; 10 μ M de Piridoxal 5'-Fosfato) contendo 10% de glicerol foram medidos nas concentrações protéicas de 0,1 – 7,5mg/mL a temperatura constante de 4° C.

Os parâmetros utilizados foram:

- modelo molecular de comparação – Ave 24 – 110 KDa;
 - solvente – aquoso 10% de glicerol
 - tempo de aquisição – 2,5 segundos
 - sensibilidade – variação de 80 – 100%
 - pH da solução – 7,4
- concentração da proteína – de 0,15 – 7mg/mL

As coletas e análises desses dados foram realizadas com a ajuda da Dra. Raquel Kelly Bortoleto Bugs do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

4.2.14.2. Dicroísmo Circular

Os ensaios de CD da proteína SELA foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Leila Maria Beltrami do Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo e do Dr. Milton Roque Bugs.

Aproximadamente 300 μ L de proteína SELA [0,1mg/mL] diluída em tampão I' (20mM Fosfato de Potássio pH7,4; 10 μ M de Piridoxal 5'-Fosfato) contendo 10% de glicerol foram medidos no espectropolarímetro Jasco J-720, variando-se o comprimento de onda de 195 – 240 nm, a temperatura constante de 22° C, com uma média de 16 medidas consecutivas usando uma cubeta de quartzo de 1mm de caminho óptico.

As análises dos espectros de CD foram realizadas através do programa Self Consistent (SELLCON-2) (Sreerama and Woody, 2000), que possui um banco de dados de 33 proteínas distintas usadas para as diferentes análises de

desconvoluções das contribuições espectrais de cada estrutura secundária. O que é conseguido pelo método matemático de análise de “cluster” (Venyaminov *et. al.*, 1994), em que o espectro de CD é incluído em uma matriz com dados espectrais de CD e é selecionada inicialmente uma estrutura de uma proteína referencial ao acaso. Essa solução primária é substituída por outra em um processo de repetições sucessivas até que uma auto-consistência seja alcançada (Sreerama *et. al.*, 2000).

4.2.14.3. Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo

A proteína SELA foi utilizada nos estudos de espalhamento de raios-X a baixos ângulos objetivando-se a determinação do estado de oligomerização e de seu envelope molecular. Estes estudos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Íris L. Toriani e Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) de Campinas – SP e do aluno de doutoramento Mario de Oliveira do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Toda a parte experimental foi realizada no LNLS, utilizando-se a linha SAXS, com um comprimento de onda do raio incidente de $\lambda = 1.488\text{\AA}$. As distâncias entre amostra e detector utilizadas foram de 1135,2mm e 427mm. Para aquisição dos dados utilizou-se um detetor 1D sensível à posição (DSP), e com a ajuda de um multicanal adquiriu-se a curva de intensidade de espalhamento em função do número de canal.

O espalhamento parasita do ar, janelas e das fendas foi subtraído da intensidade total espalhada. Foi necessário também ser realizado um “desmearing”, isto é, uma correção dos dados experimentais para eliminar o efeito de “borrão” (smearing) introduzido pela janela de entrada dos fótons do DSP (que era de 8mm).

A solução de proteína SELA utilizada nesse experimento encontrava-se na concentração de [5,6mg/mL] em sua forma decamérica homogeneamente diluída em tampão I' (20mM Fosfato de Potássio pH7,4; 10 μ M de Piridoxal 5'-Fosfato) contendo 10% de glicerol, como determinado previamente em ensaios

de DLS.

Devido ao LNLS encontrar-se em fase de implementação as medidas de SAXS foram realizadas no modo “Single Bunch”, com uma corrente de feixe variando de 9,0 – 2,0mA e tempos de coleta de aproximadamente 15 minutos, diferentemente da corrente normal oferecida de 250 – 70mA com tempos de coletas de aproximadamente 90 segundos.

As análises dos dados foram realizadas nos seguintes programas: OriginPro 7,0 para tratamento e normalização dos dados coletados; Gnom, para os cálculos do raio de giro, massa dentre outros; Gasbor, para gerar o modelo PDB (Protein Data Bank) da proteína SELA e para visualização do PDB gerado o programa PyMOL.

4.2.15. Amplificação do gene de Inserção Selenocisteína-tRNA^{sec}_{uca} (selC)

O gene de Inserção Selenocisteína-tRNA^{sec}_{uca} (selC) foi amplificado a partir de oligonucleotídeos (SELC-1 e SELC-2) descritos no item 4.1, que possuem uma região interna complementar de 20 nucleotídeos e seqüências flanqueadoras de reconhecimento por enzimas de restrição para facilitar a clonagem em vetores pGEM-T e pUC19. Na seqüência do gene selC também foi acrescido prontamente a ele uma seqüência promotora T7 e posteriormente ao gene um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *Bst* NI para posterior utilização nos ensaios de transcrição *in vitro*.

Para a reação de amplificação foram utilizados 1,0µL dos respectivos oligonucleotídeos (SELC-1 e SELC-2) [100pmol/µL], 2,5U da enzima de amplificação Taq rec. Polimerase e 5,0µL de seu respectivo tampão para um concentração final e [1X], foram adicionados também 1,0µL de dNTP [10mM], 1,5mM de MgCl₂ [50mM], resultando em um volume final de 50µL que foi amplificado em termociclador PTC-100TM, conforme descrito abaixo:

AMPLIFICAÇÃO GENE SELC					
CICLO	1x	30x			1x
T (°C)	96	96	40	72	4
TEMPO	3 min	30 s	30 s	30 s	indefinido

Tabela 4.3: Programa utilizado na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene de Inserção Selenocisteína-tRNA^{sec}_{uca} + região promotora T7 totalizando 132pb.

O fragmento de 132pb amplificado foi purificado de gel de agarose 2%, utilizando o Kit Eppendorf Perfect Gel Cleanup, obtendo-se uma concentração final de aproximadamente 150ng/μL.

4.2.16. Clonagem do inserto selC em vetores de clonagem

O inserto selC amplificado conforme descrito no item 4.2.15 foi previamente adenilado para facilitar a ligação ao vetor de clonagem pGEM-T, como descrito para a proteína SELA (item 4.2.2).

Para clonagem em vetor pUC19 o inserto selC foi digerido utilizando-se as enzimas de restrição *Eco* RI e *Xba* I que flanqueiam suas extremidades. Para a reação de digestão utilizou-se aproximadamente 4μg do inserto amplificado, 0,5μL de enzima *Eco* RI [10U/μL], 0,5μL de enzima *Xba* I [20U/μL], 0,5μL de BSA [100X] e 3,0μL de tampão NEbuffer 2 para uma concentração final [1X] resultando em um volume final de 30μL de reação que permaneceu a 37° C por 3 horas.

Do mesmo modo o vetor pUC19 foi digerido utilizando-se as mesmas enzimas que flanqueiam o inserto selC. A reação de digestão utilizou aproximadamente 2,5μg do DNA plasmideal pUC 19, 0,5μL de enzima *Eco* RI [10U/μL], 0,5μL de enzima *Xba* I [20U/μL], 0,5μL de BSA [100X] e 2,0μL de tampão NEbuffer 2 para uma concentração final [1X] resultando em um volume final de 20μL de reação que permaneceu a 37° C por 3 horas.

A reação de ligação pUC19-selC segue como descrito para o inserto pET28a-selA e pET29a-selA descritas no item 4.2.3.

4.2.17. Seqüenciamento dos plasmídeos recombinantes

As amostras pGEMT-selC e pUC19-selC selecionadas pela técnica de PCR de colônia foram seqüenciadas utilizando oligonucleotídeos comerciais presentes nos vetores de clonagem pGEM-T e pUC19. Desta forma a metodologia e reações de seqüenciamento seguem como descrito no item 4.2.6.

4.2.18. Transcrição *in vitro* e purificação do tRNA^{sec_{uca}}

Os ensaios de transcrição *in vitro* do tRNA^{sec_{uca}} foram realizados segundo AMBERG et al. (1996).

Dessa maneira o gene selC amplificado por PCR e o DNA plasmideal pUC19-selC foram digeridos com a enzima de restrição *Bst* NI proporcionando a terminação correta CCA 3' encontrada nos tRNAs. A reação de ambas as digestões foram realizadas com aproximadamente 5µg do gene selC (DNA plasmideal), 2,5µL de enzima *Bst* NI [10U/µL], 5µL de tampão NEbuffer 2 para uma concentração final de [1X] e 1µL de BSA [100X] resultando num volume final de 50µL que permaneceu a 60° C por 4 horas.

Após a digestão gene selC e o DNA plasmideal foram precipitados com acetato de amônio, segundo o protocolo descrito em SAMBROOK and RUSSEL (2001) para precipitação de ácidos nucléicos, e ressuspendido em 30µL de água livre de RNase.

Para a realização da reação de transcrição *in vitro* os 30µL de DNA precipitado, 20µL de um mix de rNTP [25mM], 1µL de inibidor de RNase [39,8µL/mL], 1µL de enzima T7 RNA polimerase [100Un/µL] e 10µL de tampão [10X] (tris-HCl 0,4M; NaCl 0,05M; MgCl₂ 0,22M; DTT 0,1M; Spermidine 0,02M) foram misturados para um volume final de 100µL e incubados a 37° C por 24 horas (Figura 4.2).

As amostras transcritas foram misturadas com tampão de corrida (20mM MOPS, 1mM EDTA pH 7,0; 31% formamida; 6% formaldeído; 3,5% loading

buffer (2% bromophenol blue; 2% xylene cyanol; 99% glycerol)) na proporção 1:1, desnaturadas a 70 ° C por 5 minutos e posterior incubação em gelo para seguida aplicação em gel desnaturante de formaldeído (0,5g agarose; 2,5mL tampão 10X (200mM MOPS, 10mM EDTA pH 7,0); 1,5mL formaldeído; 20mL água).

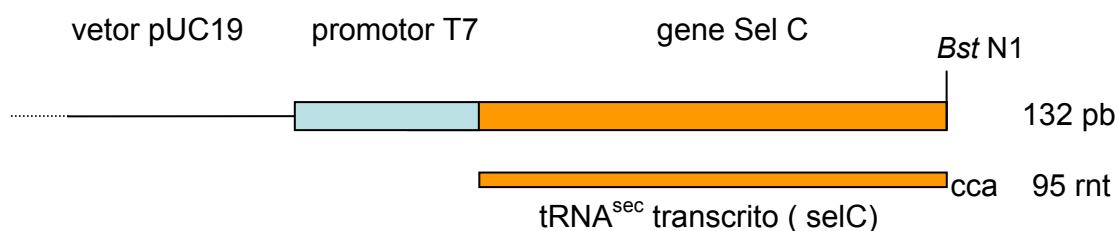


Figura 4.2: Esquema representativo da digestão do vetor pUC19-selC com a enzima *Bst* N1 e posterior transcrição *in vitro* do tRNA^{sec_{uca}}.

4.2.19. Verificação do tRNA^{sec_{uca}} transcrito por RT-PCR

Para verificação quanto ao tRNA^{sec_{uca}} transcrito no item 4.2.18 foi realizado uma reação de RT-PCR, isto é, uma transcrição reversa utilizando-se como molécula molde o produto da transcrição (item 4.2.18), oligonucleotídeos (SELC-1b e SELC-2b) específicos descritos no item 4.1 e uma mistura de enzimas presentes no Kit Quiagen OneStep RT-PCR.

Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 1,0µL dos respectivos oligonucleotídeos (SELC-1b e SELC-2b) [100pmol/µL], 2,0µL da mistura de enzima Qiagen OneStep RT-PCR e 10,0µL de seu respectivo tampão para um concentração final [1X], foram adicionados também 2,0µL de dNTP [10mM], 1,0µL inibidor de RNase [39,8µL/mL] e 10,0µL do transcrito (item 4.2.18), resultando em um volume final de 50µL que foi amplificado em termociclador PTC-100TM, conforme descrito abaixo:

TRANSCRIÇÃO REVERSA DO tRNA SELC								
CICLO	1x	1x	1x	35x			1x	1x
T (°C)	94	50	95	94	50	72	72	4
TEMPO	1 mim	30 mim	15 mim	30 s	30 s	45 s	10 mim	indefinido

Tabela 4.4: Programa utilizado na Reação de Transcrição Reversa para verificação do produto relativo a transcrição *in vitro* do tRNA^{sec_{uca}}.

V. RESULTADOS

5.1. Resultados referentes ao gene Selenocisteína Sintase (selA)

5.1.1. Amplificação do gene selA

Como descrito no item 4.2.1 o gene para Selenocisteína Sintetase (selA) amplificado e purificado pode ser visualizado em gel de agarose abaixo.

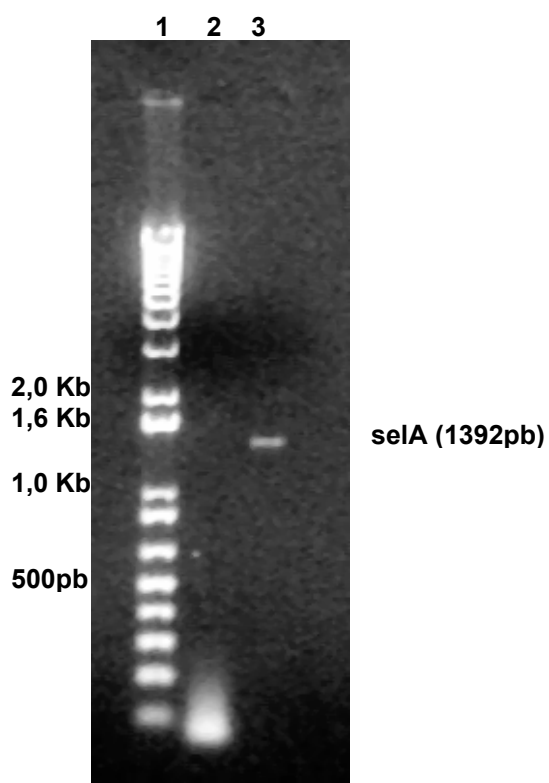


Figura 5.1: Amplificação do gene selA de *Escherichia coli* visualizado em gel de agarose 1% e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Na coluna 1- padrão molecular “1Kb Plus DNA Ladder”; coluna 2- controle negativo e coluna 3- purificação do gene selA amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *Escherichia coli*.

5.1.2. Caracterização dos transformantes pET28a-selA e pET29a-selA

Após a amplificação e purificação do gene selA este foi clonado em vetores de expressão pET28a+ e pET29a+ conforme descrito no item 4.2.3. Os recombinantes foram determinados pela técnica de PCR de colônia como descrito no item 4.2.5 e visualizado em gel de agarose abaixo.

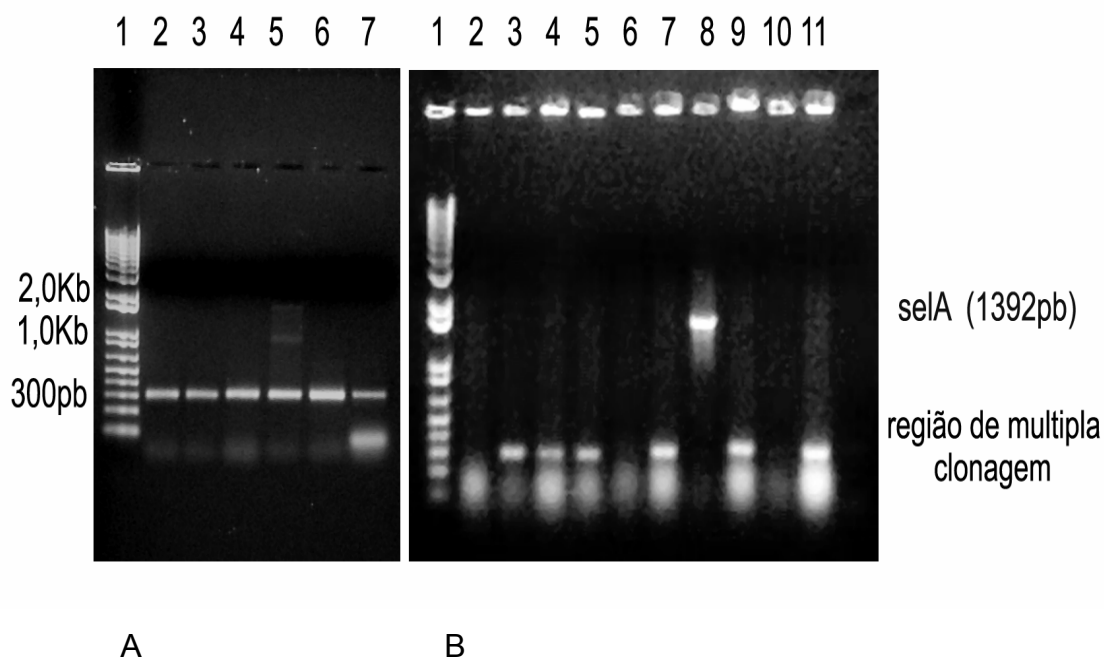


Figura 5.2: Caracterização dos transformantes pET28a-selA e pET29a-selA visualizada em gel de agarose 1% e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Em **A**, PCR de colônia (grupos de cinco colônias cada) na procura de recombinantes pET28a-selA-, na coluna 1- padrão molecular “1Kb Plus DNA Ladder”; colunas 2,3,4,6 e 7- amplificação da região de múltipla-clonagem (\approx 300pb) indicando ausência de recombinantes nesses grupos; na coluna 5- além da amplificação da região de múltipla clonagem é visualizado amplificação do gene selA. Nesse grupo novamente foi realizada uma reação de PCR para identificação de qual colônia possuía o inserto selA. Em **B**, amplificação de um dos grupos positivos (colônias individualizadas) para a reação de PCR na busca de recombinantes pET29a-selA, indicando a presença do gene SelA na colônia referente a coluna 8.

5.1.3. Seqüenciamento dos recombinantes pET28a-selA e pET29a-selA

Os vetores recombinantes determinados pelas análises de PCR de colônia foram seqüenciados em seqüenciador ABI Prism™ 377 como descrito no item 4.2.6. As seqüências resultantes do seqüenciamento foram analisadas no programa de alinhamento via Internet MultiAlin (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) e Blastn 2.2.10 – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) como visualizado na figura 5.3 pela representação de Dot-Plot de identidade.

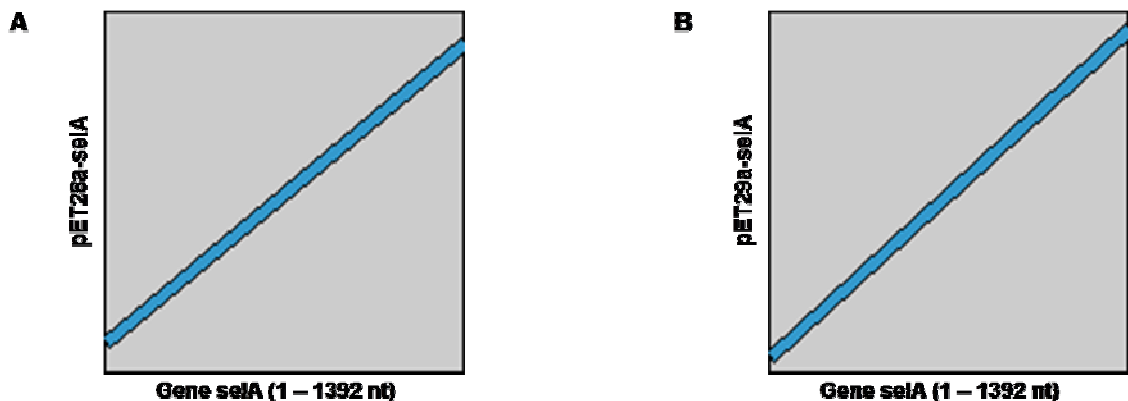


Figura 5.3: Alinhamento utilizando Blastn no modo Dot-Plot (NCBI) das seqüências selA clonadas nos respectivos vetores de expressão pET28a (A) e pET29a (B) seqüenciados em seqüenciador ABI Prism™ 377. Nas linhas verticais encontram-se as seqüências dos vetores e inserto selA (pET28a-selA e pET29a-selA) obtidas após o seqüenciamento, enquanto que na linha horizontal encontra-se o gene selA disponibilizado no banco de dados NCBI.

5.2. Resultados referentes à proteína Selenocisteína Sintase (SELA)

5.2.1. Primeiros ensaios de expressão da proteína SELA

Nos primeiros ensaios de expressão da proteína SELA descritos no item 4.2.7, demonstraram que esta apresentava-se solúvel como visualizada no gel de poliacrilamida 15% abaixo. O mesmo ensaio foi realizado utilizando o tampão PBS em substituição ao tampão G, com resultados similares (gel não mostrado).

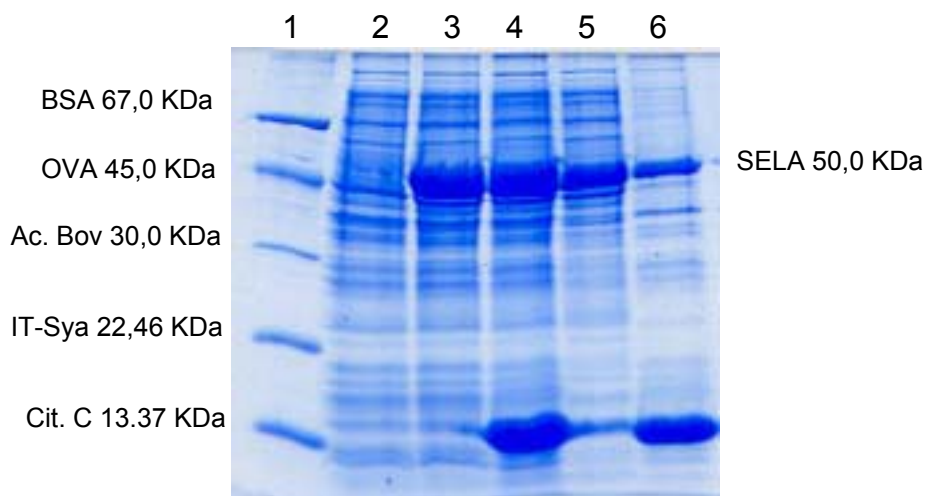


Figura 5.4: Expressão da proteína SELA, visualizada em SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue. Na coluna 1- padrão com suas respectivas massas moleculares indicados; nas colunas 2- controle negativo (BL21-pET29a+); 3- extrato bruto (BL21-pET29a-selA); 4- extrato bruto após adição de Lisozima e sonicação; 5- fração precipitada ressuspensa; 6- sobrenadante indicando que a proteína SELA encontra-se solúvel. A banda de expressão localizada na altura dos 13 kDa é resultado de um excesso de Lisozima utilizado durante este ensaio.

5.2.2. Primeiros ensaios de purificação da proteína SELA

A proteína SELA apresenta-se em grande quantidade solúvel como visualizada pelas alíquotas coletadas ao longo da primeira etapa de lise e purificação descrita no item 4.2.8.

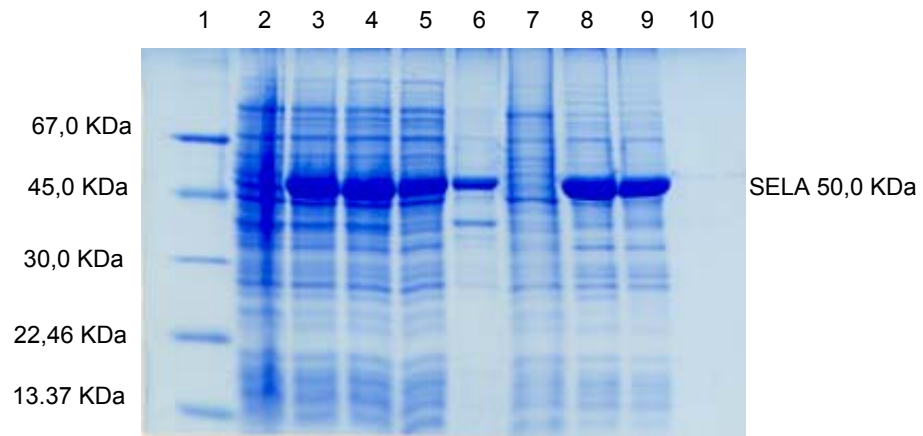


Figura 5.5: Etapas de expressão da proteína SELA anteriormente a sua aplicação em coluna aniônica DEAE Sepharose Fast Flow, visualizada em SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue: na coluna **1**- padrão com suas respectivas massas moleculares indicados; nas colunas: **2**- controle negativo (BL21-pET29a+); **3**- extrato bruto (BL21-pET29a-selA); **4**- extrato bruto após adição de Lisozima e sonicação; **5**- sobrenadante contendo SELA solúvel; **6**- fração precipitada; **7**- sobrenadante após a adição de 25% de sulfato de amônio; **8**- fração precipitada após a adição de 25% de sulfato de amônio; **9**- pré-coluna após diálise; **10**- precipitado após diálise.

Após diálise a fração protéica contendo a proteína SELA foi aplicada na coluna aniônica DEAE Sepharose Fast Flow, em que parte da proteína SELA não conseguindo ligar-se a resina foi eluída durante a lavagem da coluna com tampão I. O restante da proteína SELA que interagiu com a resina foi eluído durante o gradiente linear entre 216–407mM de KCl.

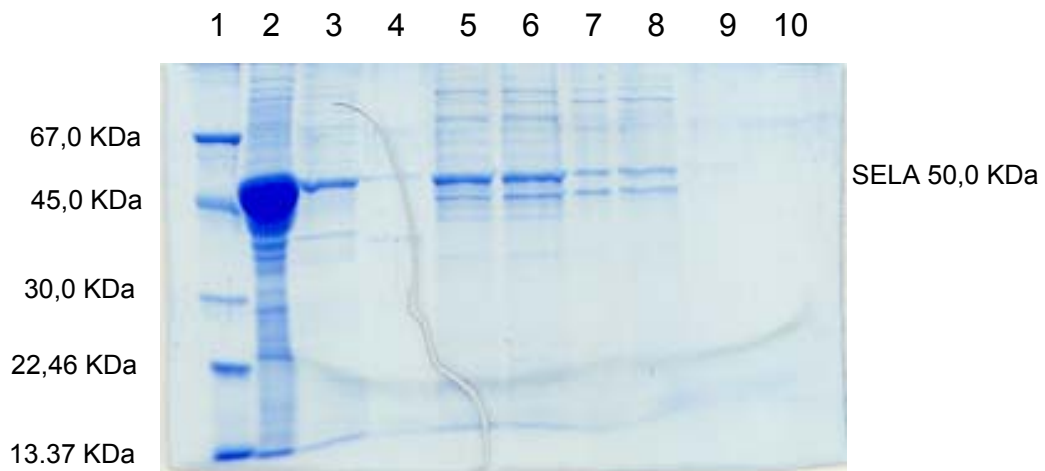


Figura 5.6: Purificação da proteína SELA utilizando coluna aniônica DEAE Sepharose Fast Flow, visualizada em SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue: na coluna 1- padrão com suas respectivas massas moleculares; nas colunas: 2- amostra pré-coluna; 3- fração de proteína SELA durante lavagem da coluna; 4,9,10- referentes a proteínas contaminantes; 5,6,7,8- referente a proteína SELA e alguns contaminantes eluídos durante gradiente linear 216-407mM de KCl.

As frações de proteína SELA purificadas pela coluna aniônica DEAE Sepharose Fast Flow foram unidas e aplicadas na segunda coluna de troca iônica Hydroxyapatite. Entretanto, nem a proteína SELA nem os contaminantes interagiram com a coluna sendo eluídos durante sua lavagem, inviabilizando os passos subsequentes.

5.2.3. Padronização de um novo protocolo de purificação da proteína SELA

Devido aos passos de purificação da proteína SELA segundo FORCHHAMMER *et al.* (1991a) não terem proporcionado resultados como o esperado, novos testes foram realizados na tentativa de obter a proteína SELA purificada em grande quantidade.

Inicialmente na tentativa de aumentarem os rendimentos durante a primeira etapa de purificação por cromatografia, a coluna aniônica Hi Trap Q HP foi testada, objetivando a redução das perdas de proteína SELA que ocorriam durante a lavagem da coluna aniônica Deae Sepharose Fast Flow, como visualizado na figura 5.7.

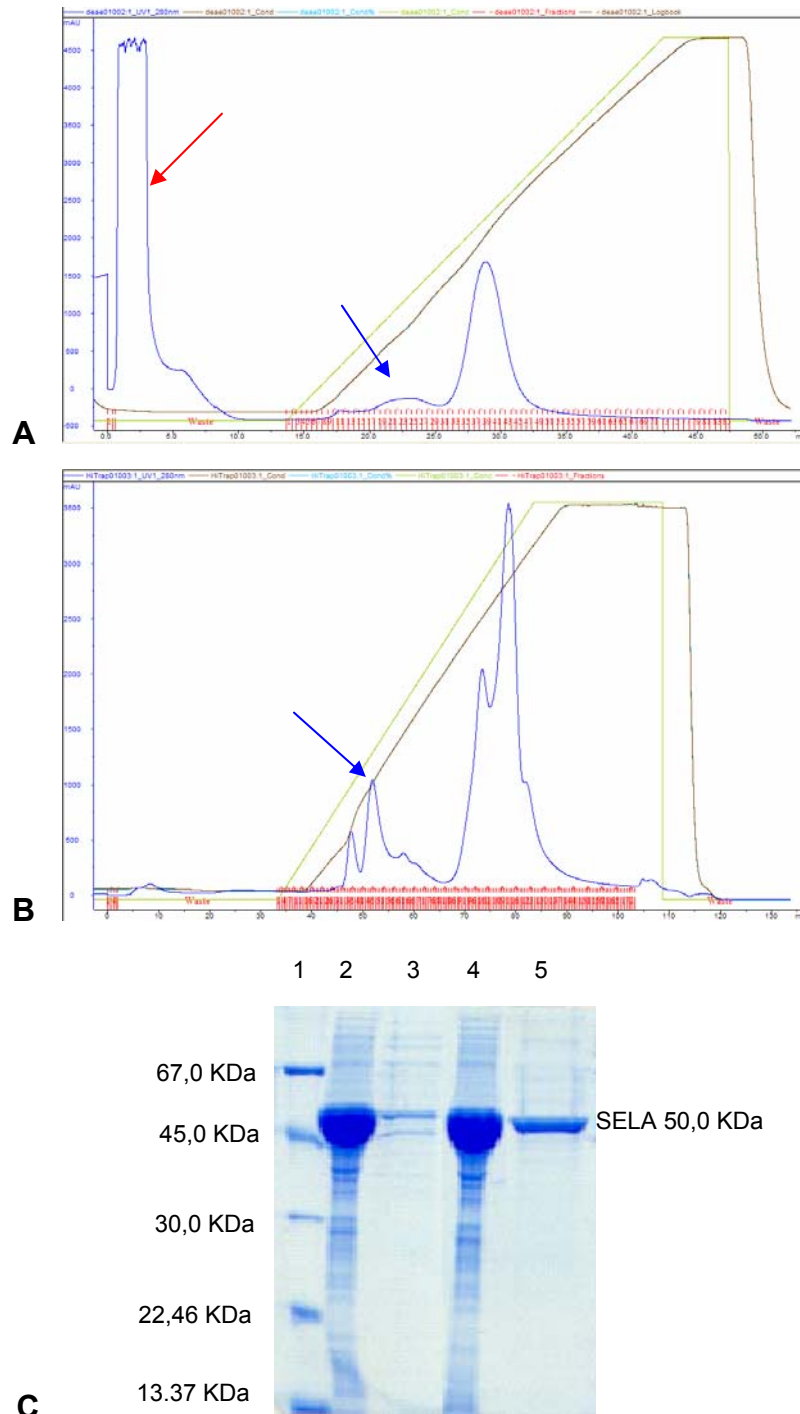


Figura 5.7: Comparação dos rendimentos resultantes da purificação da proteína SELA utilizando as colunas aniônicas DEAE Sepharose Fast Flow e Hi Trap Q HP. **A-** Cromatografia utilizando coluna DEAE Sepharose FF: a seta em vermelho indica grande quantidade de proteína SELA eluída durante a lavagem da coluna, a seta em azul indica a proteína SELA eluída durante o gradiente linear de KCl (226-400mM). **B-** Cromatografia utilizando coluna Hi Trap: a seta em azul indica a proteína SELA eluída durante gradiente linear de KCl (332-460mM). **C-** SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue: na coluna 1- padrão com suas respectivas massas moleculares; 2- pré coluna; 3- SELA purificada utilizando coluna aniônica DEAE Sepharose FF; 4- pré coluna; 5- SELA purificada utilizando coluna aniônica Hi Trap.

O rendimento de proteína SELA purificada utilizando essa nova coluna foi melhorado, tanto no aumento da quantidade de proteína SELA, devido a eliminação das perdas de proteínas durante a lavagem da coluna, como na qualidade de purificação, devido a eliminação de uma forte banda de proteína contaminante logo abaixo à proteína SELA, que a coluna DEAE não foi capaz de eliminar (Figura 5.7c).

Entretanto quando a proteína SELA foi concentrada após sua purificação na coluna Hi Trap uma grande quantidade de proteínas contaminantes pode ser observada, além de perdas entre 60-80% de proteína SELA na forma de precipitados.

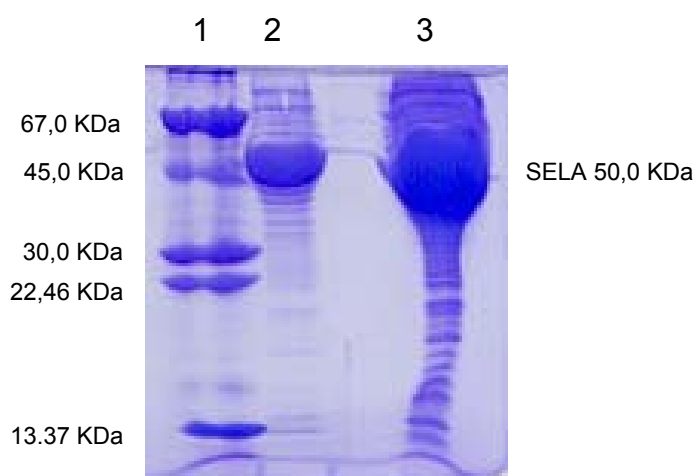


Figura 5.8: Concentração da proteína SELA após purificação em coluna aniônica Hi Trap Q HP, visualizado em SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue: coluna 1- padrão com suas respectivas massas moleculares; 2- proteína SELA concentrada a 2mg/mL; 3- proteína SELA concentrada a 4mg/mL.

Em vista dos resultados obtidos uma nova metodologia capaz de melhorar a purificação da proteína SELA era necessária. O que foi conseguido com a utilização primeiramente da coluna de troca iônica Hydroxyapatite e posterior coluna de troca iônica Hi Trap Q HP devido a seus melhores resultados quando comparados com a coluna DEAE Sepharose Fast Flow. Além disso o EDTA foi removido das soluções tampões devido a sua ação quelante extremamente prejudicial para a resina de cálcio presente na coluna de Hydroxyapatite. Dessa forma um novo protocolo de purificação como descrito no item 4.2.9 foi testado e os resultados podem ser visualizados na

figura 5.9.

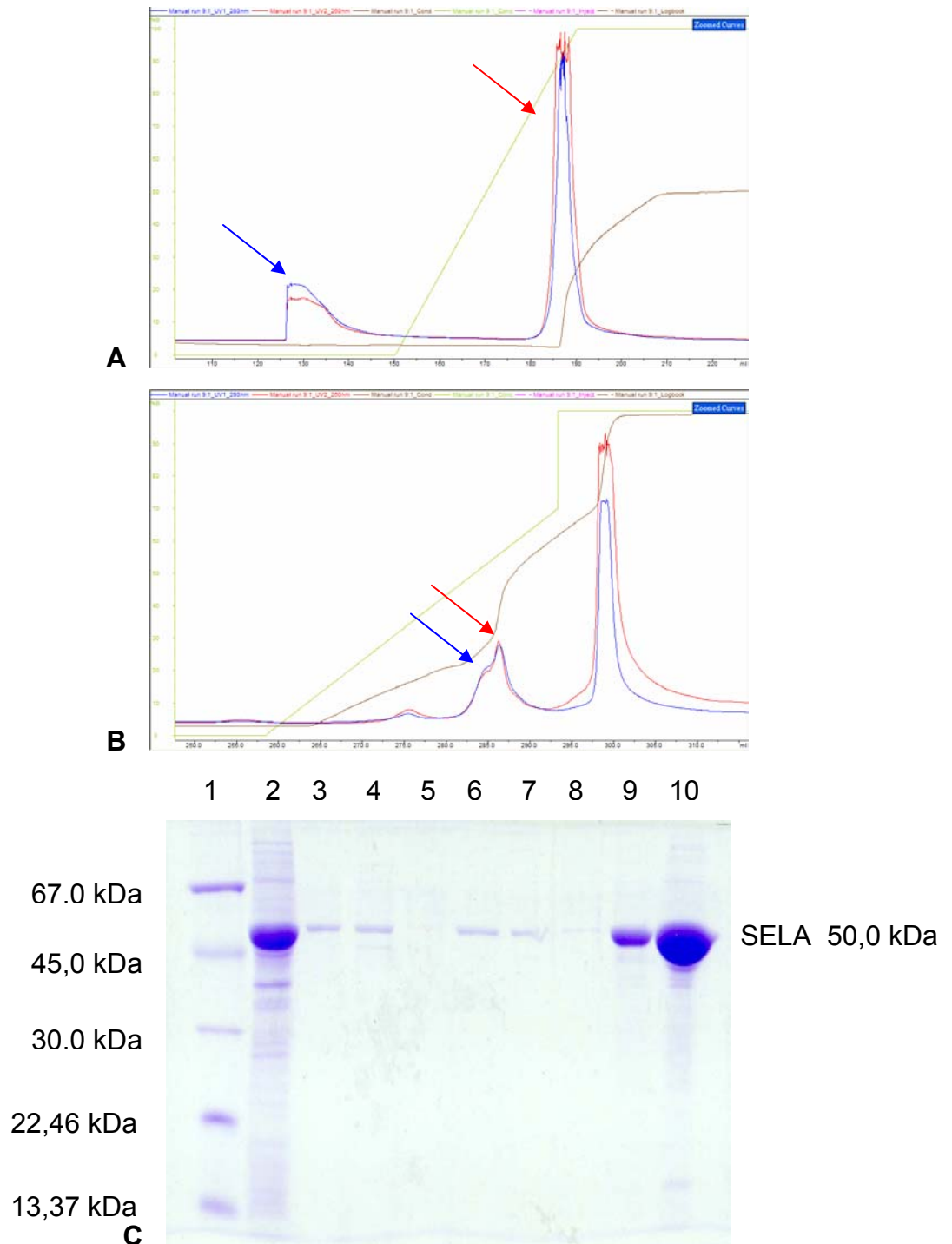


Figura 5.9: Nova estratégia de purificação da proteína SELA utilizando colunas de troca iônica Hydroxyapatite e posterior coluna Hi Trap Q HP. **A-** Cromatografia utilizando coluna Hydroxyapatite: a seta em azul indica parte da proteína SELA eluída durante a lavagem da coluna, a seta em vermelho indica parte da proteína SELA eluída durante gradiente linear de fosfato de potássio (400-500mM). **B-** Cromatografia utilizando coluna Hi Trap: a seta em azul e a seta em vermelho indicando o primeiro e segundo pico de proteína SELA eluído entre 443-544mM e 544-661mM respectivamente do gradiente linear de KCl. **C-** SDS-PAGE 15% corado por Coomassie Blue: 1- padrão com suas respectivas massas moleculares; 2- pré coluna; 3- proteína SELA eluída durante lavagem da coluna Hydroxyapatite; 4- proteína SELA eluída 80-100% gradiente linear de fosfato de potássio na coluna de Hydroxyapatite; 5 e 8- nenhuma proteína eluída; 6,7- proteína SELA eluída durante gradiente linear KCl na coluna Hi Trap, 443-544mM e 544-661mM respectivamente; 9, 10- proteína SELA referente a eluição da coluna 6 concentrada a 2mg/mL e 7,5mg/mL respectivamente.

Neste novo protocolo de purificação além da redução dos passos e consideravelmente do tempo na obtenção da proteína purificada como visualizado no item 4.2.10, foi possível aumentar o rendimento da proteína SELA de 1mg/mL a partir de 10L para 4,5mg/mL a partir de 3L de cultura bacteriana, um aumento de 15 vezes comparados com o resultados obtidos na literatura.

5.2.4. Titulação dos Anticorpos Produzidos

Os anticorpos produzidos e titulados como descrito nos itens 4.2.11 e 4.2.12 respectivamente, podem ser visualizados na figura 5.10 em que inicialmente foram testados em baixas diluições (1:5000) para verificação da existência de anticorpos e de suas respectivas especificidades.

O anticorpo anti-SELA – 3 por apresentar menores reações cruzadas foi titulado até uma diluição 1:60000.

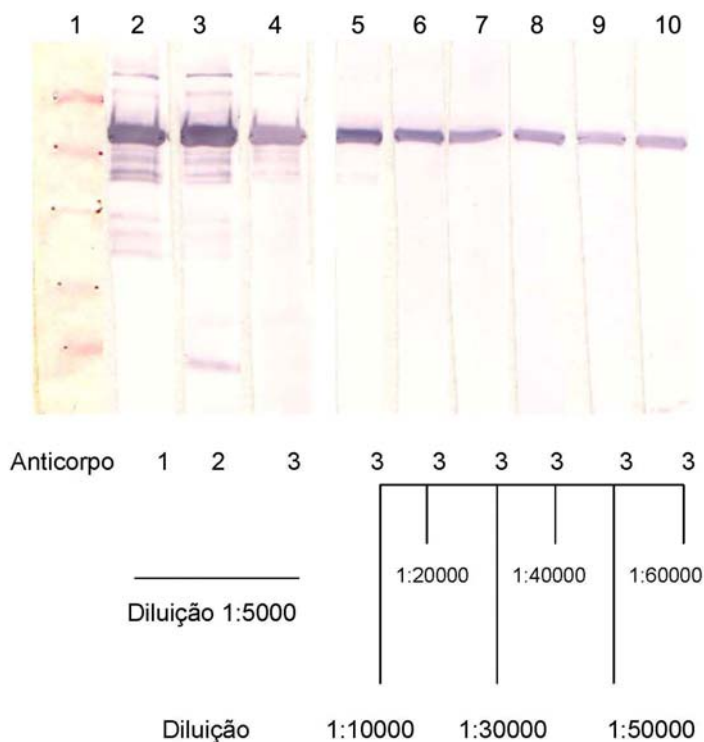


Figura 5.10: Titulação dos anticorpos anti-SELA produzidos em camundongos (*Mus musculus*): na coluna 1- marcador de peso molecular corado com Ponceau; em 2, 3 e 4- os respectivos anticorpos anti-SELA – 1, 2 e 3 na diluição 1:5000; de 5 a 10- o anticorpo anti-SELA – 3, nas titulações de 1:10000 a 1: 60000.

5.2.5. Busca de Formas Homólogas da Proteína SELA a partir de Anticorpos Policlonais

Foram realizados ensaios de Imunoblotting para busca de formas homólogas em células de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Homo sapiens* visto que até o momento a proteína SELA apenas é descrita em eubactérias.

Entretanto como visualizado na figura 5.11 até o momento não foi possível a detecção de proteínas homólogas nesses organismos.

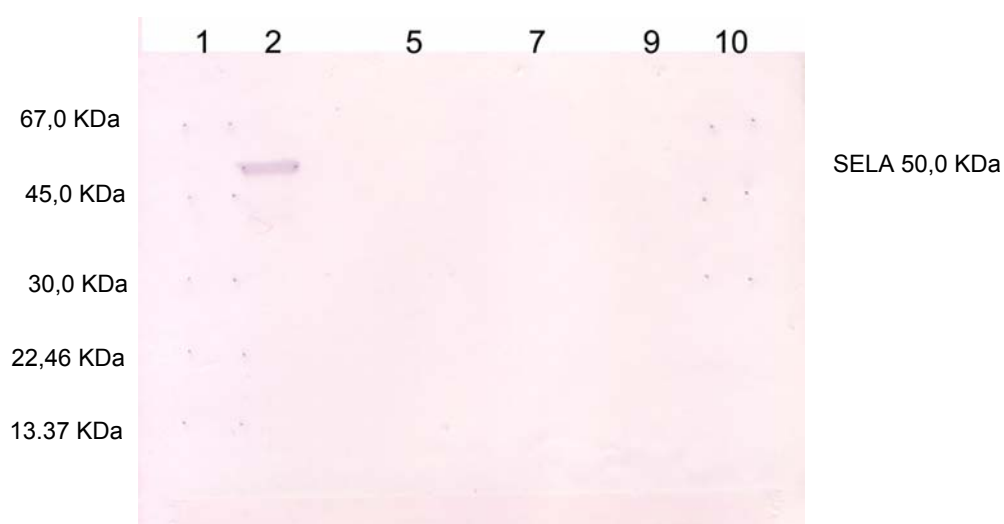


Figura 5.11: Imunoblotting utilizando anticorpo anti-SELA – 3 produzido em camundongos *Mus musculus* e extratos celulares de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Homo sapiens*: em 1 e 10- marcadores de peso molecular; em 2- controle positivo proteína SELA; em 5- extrato celular de *Leishmania major*; em 7- extrato celular de *Trypanosoma cruzi*; em 9- extrato celular de *Homo sapiens*.

5.2.6. Espalhamento Dinâmico de Luz

Os ensaios de DLS foram capazes de estimarem a massa molecular hidratada da proteína decamérica SELA em aproximadamente 442 kDa a partir do raio hidrodinâmico de 6,32 μ m (Figura 5.12). A medida foi realizada utilizando-se proteínas na concentração de [0,1mg/mL] e sensibilidade do aparelho ajustada para 100%, o que resultou em grande espalhamento durante as coletas das medidas do experimento. O ideal seria ter ajustado a

sensibilidade para 60%, resultando em medidas mais confiáveis. Apesar do histograma apresentar uma escala decrescente de colunas, essa solução pode ser tida como homogênea e comportando-se dessa maneira devido à excessiva sensibilidade como mencionado. Essa amostra foi posteriormente utilizada para ensaios de CD.

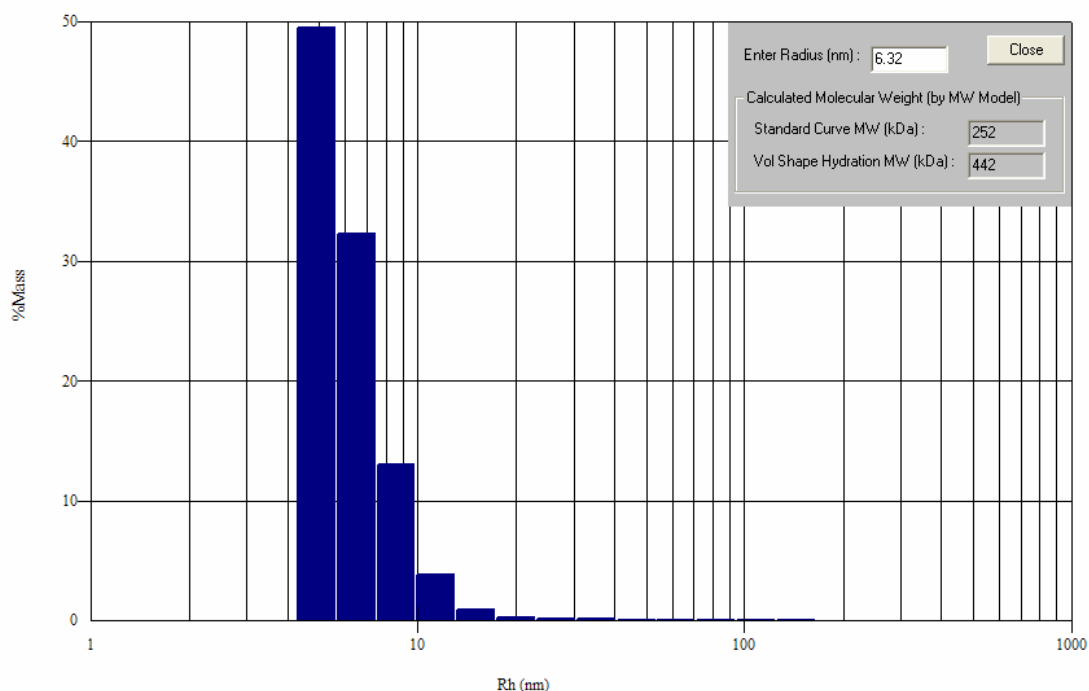


Figura 5.12: Ensaio de DLS utilizando proteína SELA purificada [0,1mg/mL] diluída em tampão I' contendo 10% de glicerol. O histograma mostra o raio hidrodinâmico de 6,32nm e a estimativa da massa molecular hidratada de 442 kDa.

5.2.7. Dicroísmo Circular

Os ensaios de CD foram capazes de identificar hélices α como estrutura secundária predominante na proteína SELA (Figura 5.13). As medidas foram realizadas utilizando-se proteínas na concentração de [0,1mg/mL], primeiramente analisadas por DLS para atestar sua homogeneidade.

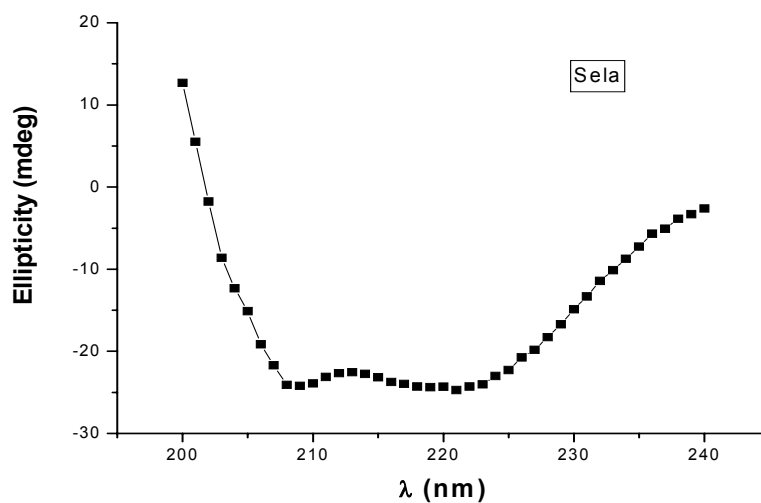


Figura 5.13: Espectro de CD utilizando proteína SELA purificada [0,1mg/mL] diluída em tampão l' contendo 10% de glicerol. O espectro de CD realizado de 195 – 250nm em cubeta com caminho óptico de 1mm com uma média de 16 medidas a 22° C.

A partir do espectro acima análises de desconvoluções foram realizadas pelo programa SELCON-2 e seus respectivos resultados são ilustrados na tabela 5.1 abaixo.

Estrutura secundária	Estimativa	Erro
Hélices - α	0.77	0.06
Folhas - β	0.04	0.03
Turn	0.07	0.01
Elementos de estruturas não regulares	0.12	0.05

Tabela 5.1: Desconvoluções obtidas pelo programa SELCON-2 a partir do espectro de CD realizado com a proteína SELA entre 195 – 250nm, uma média de 16 medidas a 22° C

5.2.8. Difração de Raios X a Baixo Ângulo

Os ensaios de SAXS foram capazes de determinar a estrutura global da proteína SELA na concentração de [5,6mg/mL] como visualizado na curva de espalhamento experimental e da função de distribuição de distâncias (Figura 5.14).

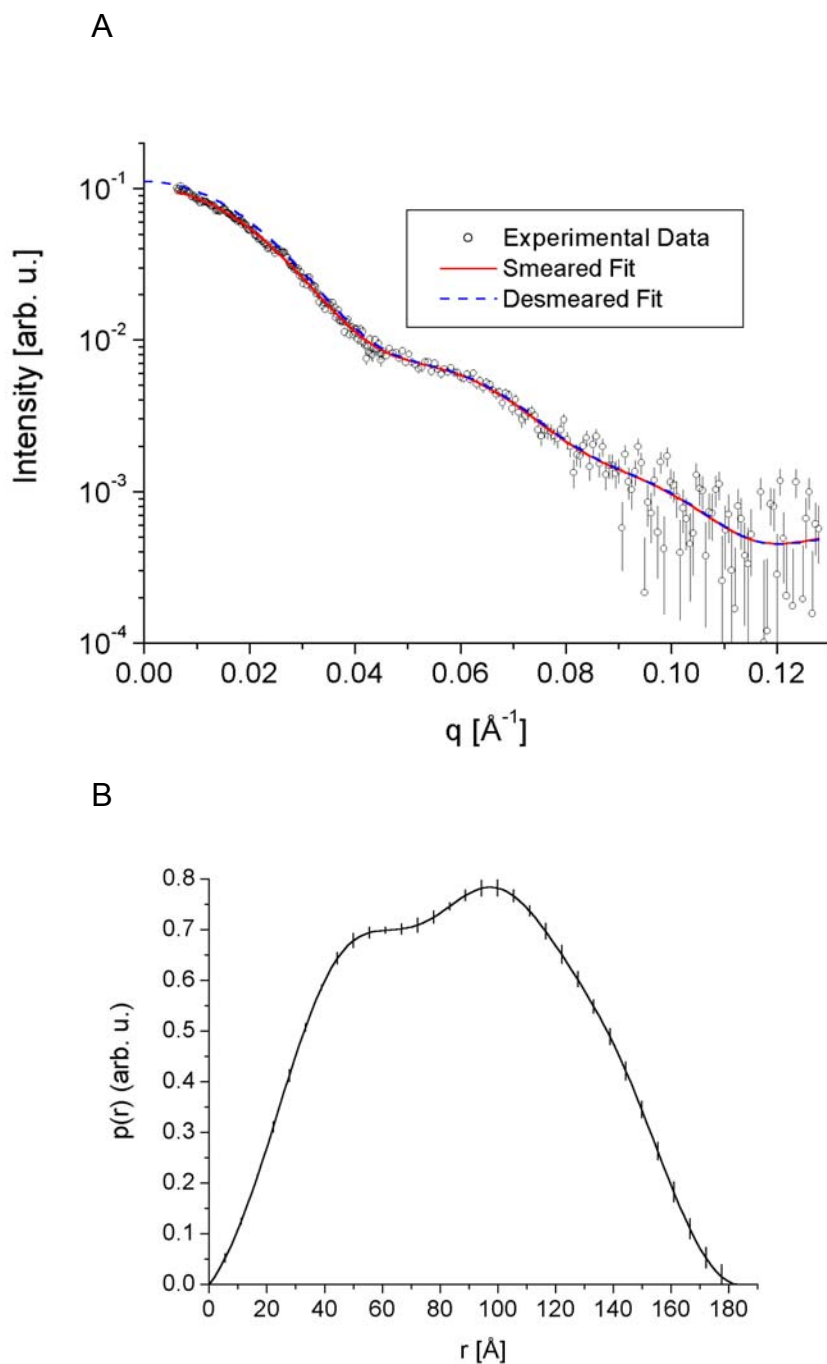


Figura 5.14: Curvas experimentais obtidas nos experimentos de SAXS para a proteína decamérica SELA: Em **A**- curva experimental de espalhamento da proteína SELA; em **B**- curva teórica da distribuição de Distâncias.

A partir dos dados acima obtidos foi possível determinar o raio de giro, massa, diâmetro máximo, bem como, a estrutura global da proteína SELA utilizando-se os programas Gnom e Gasbor (Figura 5.15) e (tabela 5.2).

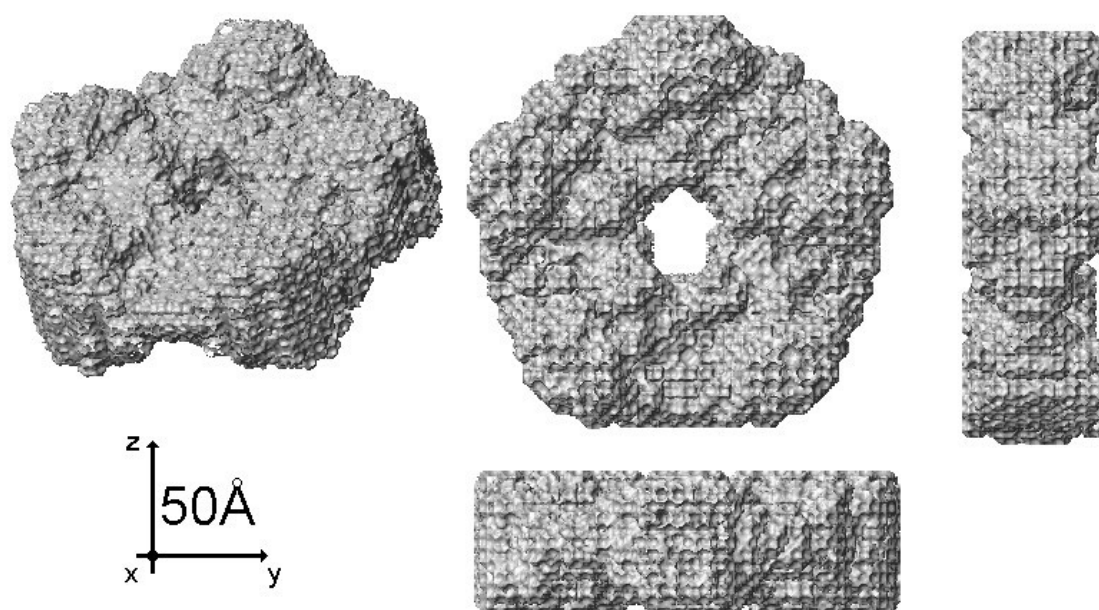


Figura 5.15: Determinação da estrutura global da proteína decamérica SELA a partir da média espacial de 10 modelos calculados independentemente e visualizados em diferentes ângulos.

Parâmetros	SAXS
Diâmetro (Å)	185
Massa Molecular (kDa)	527 +/-28
Raio de Giro (Å)	67,3 +/-0,3

Tabela 5.2: Parâmetros obtidos a partir dos ensaios da proteína decamérica SELA a partir da média espacial de 10 modelos calculados independentemente.

5.3. Resultados referentes ao Selenocisteína-tRNA^{sec}_{uca} (selC)

5.3.1 Amplificação do gene Selenocisteína-tRNA^{sec}_{uca} (selC)

Como descrito no item 4.2.15 o gene de Inserção Selenocisteína-tRNA^{sec}_{uca} (selC) amplificado e purificado pode ser visualizado em gel de

agarose 2%.

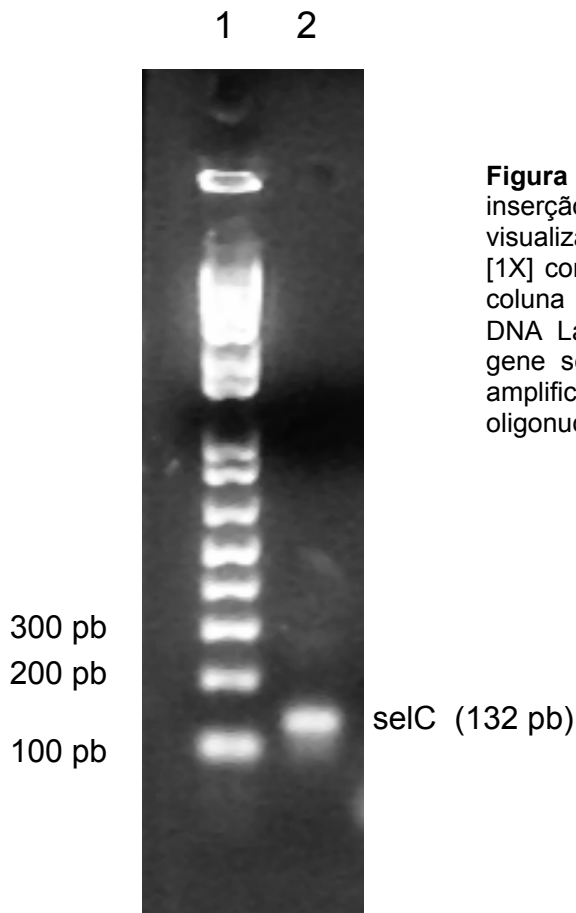


Figura 5.16: Amplificação do gene de inserção selenocisteína $tRNA^{sec}_{uca}$ (selC) visualizado em gel de agarose 2% e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Na coluna **1**- padrão molecular “1Kb Plus DNA Ladder”; coluna **2**- purificação do gene selC e sua região promotora T7 amplificado por PCR a partir de oligonucleotídeos específicos.

5.3.2. Clonagem do inserto selC em vetores de clonagem

Após a amplificação e purificação do gene selC este foi clonado em vetores pGEM-T e pUC19 conforme descrito no item 4.2.16. Os recombinantes foram determinados pela técnica de PCR de colônia como descrito no item 4.2.5. Dessa forma como visualizada para subclonagens pUC19-selC na figura 5.17 , as colônias negativas apresentam uma amplificação de 76pb referente a região de múltipla-clonagem e colônias positivas apresentam 208pb (soma de 76pb multiplaclonagem +132 gene Sel C e região promotora T7)

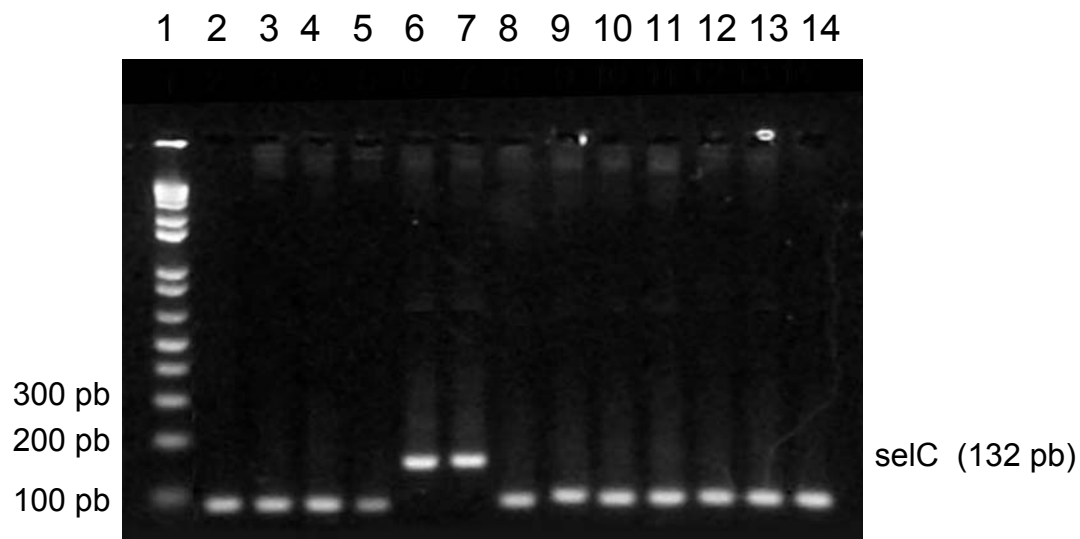


Figura 5.17: Caracterização dos transformantes pUC19-selC visualizados em gel de agarose 2% e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Na coluna 1- padrão molecular “1Kb Plus DNA Ladder”; coluna 6 e 7- ampliações positivas (208pb) pUC19-selC; colunas 2 a 5 e 8 a 14- ampliações negativas (76pb) pUC19.

5.3.3. Seqüenciamento dos recombinantes pUC19-selC

Os vetores recombinantes determinado pelas reações de PCR de colônia foram seqüenciados em seqüenciador ABI Prism™ 377 como descrito no item 4.2.6 e os respectivos alinhamentos podem ser visualizadas abaixo.

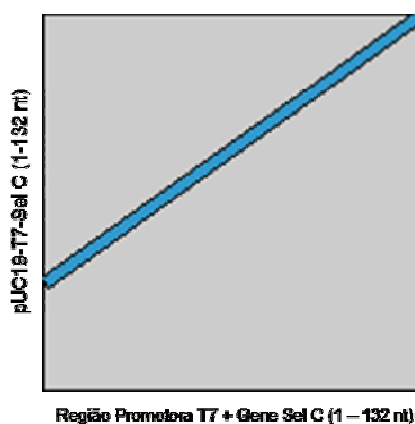


Figura 5.18: Alinhamento utilizando Blastn no modo Dot-Plot (NCBI) da seqüência T7 – selC clonadas no vetor de clonagem pUC19 seqüenciado em seqüenciador ABI Prism™ 377. Devido ao pequeno tamanho do fragmento clonado apenas o oligonucleotídeo M13 sense do vetor pUC19 foi utilizado e sendo capaz de percorrer os 132 nucleotídeos da região promotora T7 ligada ao gene Sel C.

5.3.4. Transcrição *in vitro* e purificação do tRNA^{sec}_{uca}

O produto da transcrição *in vitro* realizados tanto com o gene selC como com o DNA plasmideal pUC19-selC digeridos e purificados como descrito no item 4.2.18 pode ser visualizado no gel de desnaturante de formaldeído (Figura 5.19).

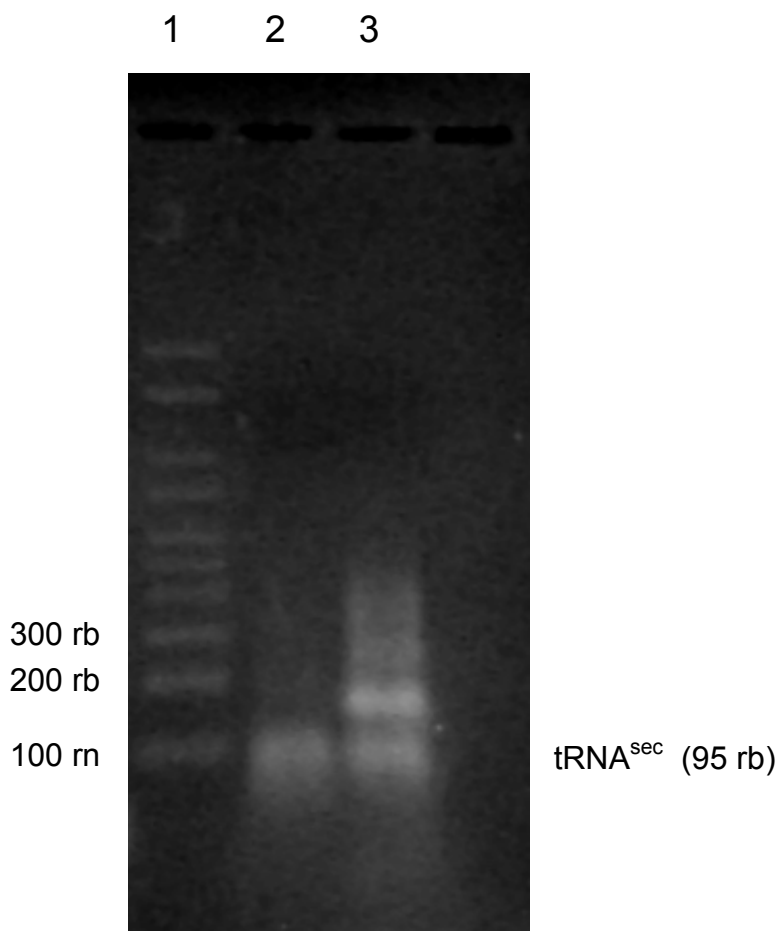


Figura 5.19: Transcrição *in vitro* do tRNA^{sec}_{uca} visualizado em gel desnaturante de formaldeído e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Na coluna **1**- padrão molecular “0,1-2,0 Kb RNA Ladder”; **2**- transcrição do tRNA^{sec}_{uca} (95 ribonucleotídeos) a partir do gene selC amplificado por PCR e digerido com enzima *Bst* NI e **3**- transcrição do tRNA^{sec}_{uca} a partir do DNA plasmideal pUC19-selC digerido com enzima *Bst* NI.

Para verificação quanto ao produto transcrito no item 4.2.18 uma reação de RT-PCR foi realizada (item 4.2.19) confirmando a transcrição do tRNA^{sec}_{uca} de *Escherichia coli* como pode ser visualizado na figura 5.20.

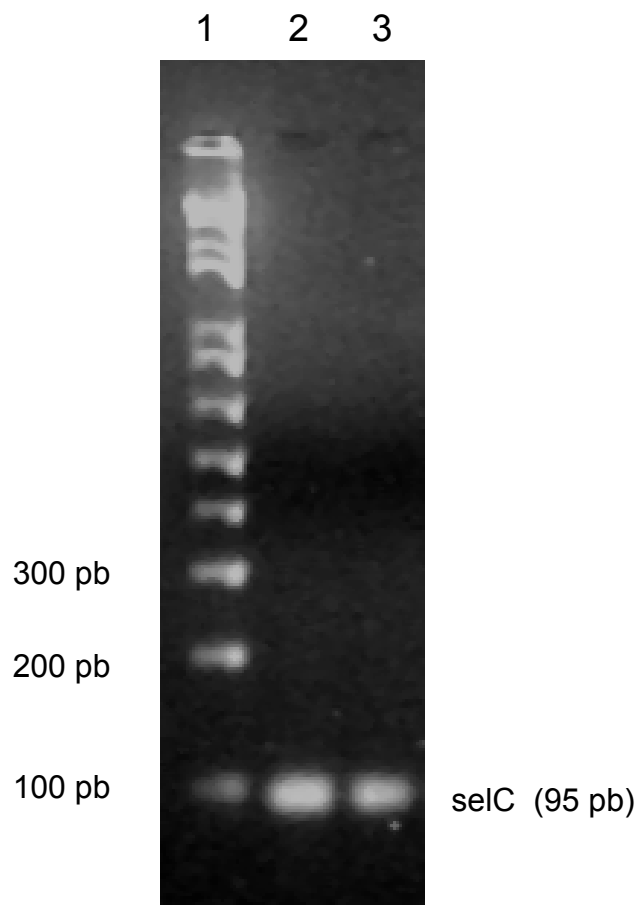


Figura 5.20: Amplificação por RT-PCR do gene de inserção selenocisteína $tRNA_{uca}^{sec}$ (selC) visualizado em gel de agarose 2% e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Na coluna **1**- padrão molecular “1Kb Plus DNA Ladder”; coluna **2**- amplificado a partir da transcrição utilizando o gene selC como molde e **3**- amplificado a partir da transcrição utilizando o DNA plasmideal pUC19-selC como molde.

VI. DISCUSSÃO

Tendo em vista da universalidade da via de biossíntese e incorporação do aminoácido selenocisteína, isto é, presente em eubactérias, arqueobactérias e eucariotos, através de inúmeras proteínas atualmente identificadas e classificadas de forma geral como selenoproteínas e seu intrigante mecanismo de incorporação através do códon de terminação (UGA) auxiliado por uma complexa interação entre proteínas e moléculas de RNA têm despertado interesse no sentido de caracterizar as proteínas atuantes nesta via.

Como descrito no tópico 1.3 da introdução desse trabalho são necessárias algumas proteínas para que a biossíntese e incorporação do aminoácido selenocisteína ocorram, tais como SELA, SELB, SELD além de um tRNA próprio ($\text{tRNA}^{\text{sec}}_{\text{uca}}$) e uma seqüência específica localizada no mRNA denominada SECIS, quando em procariotos (Leinfelder, 1988). Entretanto, quando essa via é comparada com a encontrada em arqueobactérias e em eucariotos novas particularidades são descritas como: a posição e seqüências específicas da seqüência SECIS, a necessidade de mais uma proteína denominada de SBP2 e a ausência da proteína SELA.

A posição assumida pela seqüência SECIS em procariotos ocorre ao longo da seqüência traduzível do mRNA, logo seguida ao códon de terminação/inserção_{Sec} UGA. Comparado com as SECIS de arqueobactérias e eucariotos localizadas na região não traduzível jusante (3' UTR) a aproximadamente 25 e de 51-111 nucleotídeos após o códon de terminação respectivamente, bem como a presença de seqüências específicas de reconhecimento encontradas ao longo das SECIS (Liu et. al., 1998; Hatfield et. al., 2002; Korotkov et. al., 2002; Rother et. al., 2001).

Em eucariotos também foi verificado a existência da Proteína ligante a Seqüência SECIS (SBP2) capaz de ligar-se a proteína SELB portando o $\text{tRNA}^{\text{sec}}_{\text{uca}}$ carregando o respectivo aminoácido selenocisteína a seqüência SECIS localizada na região 3' UTR, encaminhando ao ribossomo o selenocisteil-tRNA^{sec}_{uca}, dando continuidade ao processo de incorporação do selenocisteína a selenoproteínas (Hatfield and Gladyshev, 2002; Atkins and

Gesteland, 2000). Entretanto o que permanece ainda obscuro em arqueobactérias e eucariotos é como ocorre a conversão do aminoácido precursor serina no vigésimo primeiro aminoácido selenocisteína, visto da ausência da proteína SELA ou de formas homólogas desta nesses organismos (Low and Berry, 1996).

A proteína SELA foi identificada e purificada no início da década de 90 (Forchhammer et. al., 1991) e desde então nenhuma forma homóloga a ela foi encontrada em nenhum outro organismo que não fosse procarioto.

Tendo em vista da importância do elemento selênio na dieta dos organismos vivos e sabendo que sua forma ativa encontra-se incorporado especificamente as selenoproteínas sob a forma do aminoácido selenocisteína, como detalhado no tópico 1.5 e 1.6 dessa dissertação. Este estudo visa à caracterização molecular e estrutural da proteína Selenocisteína Sintase de *Escherichia coli*, visto que o único trabalho estrutural com essa proteína ter sido realizado em 1992 por Engelhardt, através de microscopia eletrônica de transmissão (STEM), gerando bons dados quanto às dimensões e massa aproximada da proteína SELA, mas dados pouco elucidativos quanto sua estrutura e interação com o respectivo selenocisteil-tRNA^{sec}_{uca} devido as limitações dessa técnica.

No decorrer deste trabalho, uma nova metodologia de purificação da proteína SELA foi sugerida com várias vantagens comparada com a descrita pela literatura (Forchhammer et. al., 1991) (tópico 4.2.8). Nessa nova metodologia os dois passos de diálises são substituídos pela passagem da proteína de interesse em coluna Hi Trap Desalting, agilizando em muito o processo de retirada do sal da solução protéica. A coluna de troca iônica DEAE Sepharose FF foi substituída pela coluna aniônica Hi Trap Q HP, capaz de reter em sua resina uma quantidade superior de proteína SELA quando comparada a coluna anterior. E por fim a ordem da utilização das colunas foi alterada, sendo primeiramente utilizado a coluna de troca iônica de Hydroxyapatite e posteriormente a coluna Hi Trap, como descrito no tópico 4.2.9 e no sumário no esquema 4.2.10. Tal alteração resultou na separação de duas populações de proteína SELA, uma eluída durante a lavagem da coluna e

posteriormente utilizada nos passos subseqüentes e uma segunda fração de proteína SELA eluída em 500mM de fosfato de potássio e que em aproximadamente 30 minutos após a saída da coluna apresenta-se completamente precipitada. Também eliminou a necessidade de uma segunda precipitação com 40% de sulfato de amônio e passagem por uma terceira coluna (gel filtração).

É suposto que a super expressão da proteína SELA resultasse em uma população de proteínas mau enoveladas e que durante as fases de concentrações após a utilização de apenas a coluna Hi Trap, durante a purificação, ajudasse na alta taxa de proteína precipitadas (até 80%), visto que essa coluna foi incapaz de separar essas duas populações de proteínas SELA e além de apenas a utilização dessa coluna resultar em altos graus de proteínas contaminantes.

Dessa maneira o desenvolvimento de um novo protocolo de purificação além da redução dos passos e conseqüentemente do tempo na obtenção da proteína purificada, foi possível o aumento do rendimento da proteína SELA de 1mg/mL a partir de 10L para 4,5mg/mL a partir de 3L de cultura bacteriana. Um aumento de 15 vezes quando comparado aos resultados descritos na literatura.

Com a purificação da proteína SELA anticorpos policlonais utilizando camundongo *Mus musculus* foram obtidos na tentativa de encontrar proteínas homólogas em organismos como *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Homo sapiens*, visto que ainda não foi caracterizada uma proteína ou mais de uma proteína responsável pela conversão de serina em selenocisteína em organismos eucarióticos. Entretanto, os ensaios de “Imunobloting” não detectaram proteína homóloga nesses organismos.

Nesse trabalho uma combinação de técnicas como DLS e CD foram utilizadas na determinação de alguns parâmetros da proteína SELA e posterior determinação da estrutura global desta foi conseguida pela técnica de SAXS.

O ensaio de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) foi capaz de determinar a massa aproximada da molécula em 442 kDa e a homogeneidade da solução protéica, um requisito fundamental para a realização dos demais experimentos.

Com ensaios de Dicroísmo Circular (CD) foi possível a predição das estruturas secundárias encontradas na proteínas SELA, como sendo predominantemente de hélices α . Foram encontrados também pequenas porcentagens de folhas β e estruturas não periódicas, mas devido ao grande erro associado a essas medidas esses dados foram reduzidos.

Com concentrações próximas a 6mg/mL experimentos de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) foram possíveis de serem realizados. A vantagem dessa abordagem é a obtenção de dados estruturais a baixas resoluções de proteínas em soluções, o que em muitos casos é a única alternativa visto das dificuldades na obtenção de cristais bons para a metodologia de Difração de Raios-X

Os dados gerados por SAXS, apesar das coletas terem sido realizadas em modo “Single Bunch” com uma corrente muito menor do que a rotina do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron disponibiliza a seus usuários, foram muito bons. Isto é devido ao grande tamanho da proteína homodecamérica SELA e a simetria nela encontrada.

Desta forma as análises de SAXS foram capaz de determinar o diâmetro máximo da proteína em 185Å, sua massa molecular em 527 +/- 28 kDa e o raio de giro de 67,3 +/- 0,3Å, além da estrutura global da proteína SELA com uma resolução próxima a 20Å.

Essa metodologia de SAXS é muito eficaz quando utilizada em conjunto com resultados obtidos na difração em cristais, pois permite a sobreposição das imagens obtidas e comparação da forma protéica em solução e em cristais, ilustrando uma maior dinâmica das proteínas em estudos, bem com ensaio entre proteínas e ligantes específicos dessas proteínas (Fisher *et. al.*, 2003).

Experimentos de transcrição *in vitro* para a síntese do tRNA^{sec}_{uca} de *Escherichia coli*, foram realizados e confirmados pela técnica de transcrição reversa (RT-PCR), para posteriores ensaios de interação com a proteína SELA através de experimento simples como “Gel Shift” e para posteriores medidas de DLS, CD e SAXS, variando-se as concentrações do tRNA ligante.

VII. PERSPECTIVAS FUTURAS

É objetivo a continuidade deste trabalho através:

- Tentativas de aumentar a quantidade obtida de proteína SELA purificada para posteriores ensaios de cristalização;
- Ensaios de interação Proteína-tRNA^{sec}_{uca}, através da técnica de retardamento da migração em gel (Gel Shift);
- Ensaios estruturais em solução do complexo Proteína-tRNA^{sec}_{uca}, utilizando-se das metodologias de DLS, CD e SAXS;
- Tentativa de cristalização do complexo Proteína-tRNA^{sec}_{uca};
- Caso seja possível a cristalização do complexo Proteína-tRNA^{sec}_{uca}, comparação dos dados obtidos em solução (SAXS) e por cristais.

VIII. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. and WALTER, P. How cells read the genome: From DNA to protein. In _____ **Molecular biology of the cell. 4. ed.** New York: Garland Science Taylor & Francis Group, 2002. p. 335-342.

AMBERG, R.; MIZUTANI, T.; WU, XIN-QI and GROSS, H. J. Selenocysteine synthesis in mammalia: An identity switch from tRNA^{ser} to tRNA^{sec}. **J. Mol. Biol.**, v. 263, p. 8-19, 1996.

ARMEZ, J. G. and MORAS, D. Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 211-216, 1997.

AXLEY, M. J.; GRAHAME, D. A. and STADTMAN, T. C. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 265, n. 30, p. 18213-18218, 1990.

AXLEY, M. J.; BÖCK, A. and STADTMAN, T. C. Catalytic properties of an *Escherichia coli* formate dehydrogenase mutant in which sulfur replaces selenium. **Proct Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 8450-8454, 1991.

ATKINS, J. F. and GESTELAND, R. F. The twenty-first amino acid. **Nature.**, v. 407, p. 463-464, 2000.

BERNE, B. J. and PECORA, R. **Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics.** New York: John Wiley, 1976. p. 1-52.

BÖCK, A.; FORCHHAMMER, K.; HEIDER, J.; and BARON, C. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. **Trends Biochem Sci.**, v. 16, p. 463-467, 1991.

BRACEWELL, R. N. **Fourier transform and its applications**. New York: McGraw-Hill, 1965.

BRANDEN, C. and TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York: Garland, 1999.

BURK, F. R. Molecular biology of selenium with implication for its metabolism. **The FASFR Journal.**, v. 5, p. 2274-2279, 1991.

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

DIAS, S. M. G. **Estudos estruturais dos receptores nucleares humanos dos hormônios tireoidianos isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$) e do ácido retinóico 9-cis isoforma α (hTXR α)**. 2004. 210f. Tese (Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

EHRENREICH, A.; FORCHHAMMER, K.; TORMAY, P.; VEPREK, B. and BÖCK A. Selenoprotein synthesis in *E. coli*: purification and characterization of the enzyme catalyzing selenium activation. **Eur. J. Biochem.**, v. 206, p. 767-773, 1992.

ENGELHARDT, H.; FORCHHAMMER, K.; MÜLLER, S.; GOLDIE, K. N. and BÖCK, A. Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and Location of tRNA in the Seryl-tRNA^{sec}-enzyme complex. **Molecular Microbiology**., v. 6, n. 23, p. 3461-3467, 1992.

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

FISCHER, H.; DIAS, S. M. G.; SANTOS, M. A. M.; ALVES, A. C.; ZANCHIN, N.; CRAIEVICH, A. F.; APRILETTI, J. W.; BAXTER, J. D.; BEBB, P.; NEVES, F. A. R.; RIBEIRO, R. C. J. and POLIKARPOV, I. Low resolution structures of the retinoid X receptor DNA-binding and ligand-binding domains revealed by synchrotron X-ray solution scattering. **The Journal of Biological Chemistry**., v. 278, n. 18, p. 16030-16038, 2003.

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

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

FORCHHAMMER, K. and BÖCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichi coli*. Analysis of the reaction sequence. **The Journal of Biological Chemistry**., v. 266, n. 10, p. 6324-6328, 1991b.

GLATTER, O. The interpretation of real-space information from small angle

scattering experiments. **J. Appl. Cryst.**, v. 12, p.166-175, 1979.

GLATTER, O. and KRATKY, O. **Small angle X-ray scattering**. London: Academic Press, 1982.

GUINIER, A.; FOURNET, G. and WALKER, C. B. **Small angle scattering of X-ray**. New York: John Wiley, 1955.

HARLOW, Ed.; LANE, D. **Antibodies: A laboratory manual 3. ed.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Press, 1988.

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

JONES, J. B. and STADTMAN, T. C. Selenium-dependent and selenium-independent formate dehydrogenases of *Methanococcus vannielii*. **The journal of Biological Chemistry.**, v. 256, n. 2, p. 656-663, 1981.

KIM, S.; LEE, S. W.; CHOI, E. C. and CHOI, S. Y. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 61, p. 278-288, 2003.

KOROTKOV, K. V.; NOVOSELOV, S. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Mammalian selenoprotein in which selenocysteine (sec) incorporation is supported by a new form of sec insertion sequence element. **Molecular and Cellular Biology.**, v. 22, n. 5, p. 1402-1411, 2002.

KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A.

V.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R. and GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science.**, v. 300, p. 1439-1444, 2003.

LACOURCIERE, G. M. and STADTMAN, T. C. Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis. **BioFactor.**, v. 14, p. 69-74, 2001.

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

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

LEINFELDER, W.; STADTMAN, T. C.; and BÖCK, A. Occurrence *in Vivo* of selenocysteyl-tRNA^{sec}_{uca} in *Escherichia coli*. **J. Biological Chemistry.**, v. 264, n. 17, p. 9720-9723, 1989.

LEINFELDER, W.; FORCHHAMMER, K.; VEPREK, B.; ZEHELEIN, E. and BÖCK, A. *In vitro* synthesis of selenocysteinyl-tRNA_{uca} from seryl-tRNA_{uca}: Involvement and characterization of the selD gene product. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p. 543-547, 1990.

LESCURE, A.; FAGEGALTIER, D.; CARBON, P. and KROL, A. Protein Factor Mediating Selenoprotein Synthesis. **Current Protein and Peptide Science.**, v. 3, p. 143-151, 2002.

LINDNER, P. and ZEMB, TH. **Newtron, X-ray and light scattering**. [S.l]: Elsevier Science Publishers B. V.,1991. p. 33-78.

LIU, Z.; ROCHES, M.; GROISMAN, I.; ENGELBERG-KULKA, H. The nature of the minimal selenocysteine insertion sequence (SECIS) in *Escherichia coli*. **Nucleic Acid Research.**, v. 26, n. 4, p. 896-902, 1998.

LOW, S. C. and BERRY, M. J. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. **TIBS.**, v. 21, p. 203-208, 1996.

LOW, S. C.; GRUNDNER-CULEMANN, E.; HARNEY, J. W. and BERRY, M. J. SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. **The EMBO Journal.**, v. 19, n. 24, p. 6882-6890, 2000.

LYN PATRICK, N. D. Seleniun biochemistry and cancer: a review of the literature. **Alternative Medicine Review.**, v. 9, n. 3, p. 239-258, 2004.

MALTA, V. R. S. **Apostila de cristalografia**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas/Departamento de Química, 2003. 114p. Notas de Aula.

MultiAlin – Multiple sequence alignment. Disponível em: <<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>> Acesso em: mar. 2005.

Nacional Cancer Institute. Disponível: <http://cis.nci.nih.gov/fact/4_20s.htm>. Acesso em: 15 jan. 2005.

Nacional Center for Biotechnology Information. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: mar. 2005.

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

OLIVEIRA, C. L. P. **Simulação do espalhamento de raios X por macromoléculas em solução através da construção de modelos tridimensionais de baixa resolução.** 2001. 111f. Dissertação (Física Aplicada) – IFGW, UNICAMP, Campinas.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual 3. ed.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Press, 2001.

SREERAMA, N. and WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal. Biochem.**, v. 287, p. 252-260, 2000.

STADTMAN, T. C. Biosynthesis and Function of Selenocysteine-containing Enzymes. **The journal of Biological Chemistry.**, v. 266, n. 25, p. 16257-16260, 1991.

SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. and SERDYUK, I. N. Structural model of the 50S subunit of *Escherichia coli* ribosomes from solution scattering I. X-ray synchrotron radiation study. **J. Mol. Biol.**, v. 240, p. 66-77, 1994.

TAO, J. and CHIMMEL, P. Inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases as novel anti-infectives. **Exp. Opin. Invest. Drugs.**, v. 9, n. 8, p. 1767-1775, 2000.

TORMAY, P.; WILTING, R.; HEIDER, J.; and BÖCK, A. Genes coding for the selenocysteine-Inserting tRNA species from *desulfomicrobium baculatum* and *Clostridium thermoaceticum*: Structural and evolutionary implications. **J. Bacteriology.**, v. 176, n. 5, p. 1268-1274, 1994.

VENYAMINOV, S. Y. and VASSILENKO, K. S. Determination of tertiary structure class from circular dichroism spectra. **Anal. Biochem.**, v. 222, p. 176-184, 1994.

VOET, D.; VOET, J. G. and PRATT, C. W. Translation. In _____. **Fundamentals of biochemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc, 1999. p. 844-861.

ZINONI, F.; BIRKMANN, A.; LEINFELDER, W. and BÖCK, A. Cotranslational insertion of selenocysteine into formate dehydrogenase from *Escherichia coli* directed by a UGA codon. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 3256-3160, 1987.