

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

CARLOS ALEXANDRE BREYER

**Estudo de Interações Protéicas da Tiorredoxina Peroxidase Nuclear
(nTPx) de *Sacharomyces cerevisiae* nos Eventos de Crescimento
Celular e Silenciamento Telomérico**

**SÃO CARLOS
2011**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARLOS ALEXANDRE BREYER

**Estudo de Interações Proteicas da Tiorredoxina Peroxidase Nuclear
(nTPx) de *Sacharomyces cerevisiae* nos Eventos de Crescimento
Celular e Silenciamento Telomérico**

SÃO CARLOS
2011

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

B848ei

Breyer, Carlos Alexandre.

Estudo de interações proteicas da Tiorredoxina
Peroxidase Nuclear (nTPx) de *Sacharomyces cerevisiae* nos
eventos de crescimento celular e silenciamento telomérico /
Carlos Alexandre Breyer. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
84 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Células
- crescimento. 4. Silenciamento telomérico. I. Título.

CDD: 660.6 (20ª)

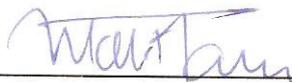
Carlos Alexandre Breyer

Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

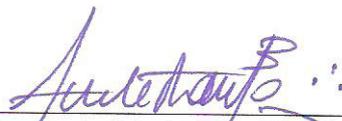
Aprovado em: 26/08/2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira (Orientador)
(UFSCar)



Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama
(UNESP)



Prof. Dr. Fernando M. Araújo-Moreira
(UFSCar)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e nossa Senhora Aparecida, sempre presentes em minha vida, principalmente nos momentos mais difíceis onde não há onde se amparar além da fé.

A Universidade Federal de São Carlos e o Programa de Pós Graduação em Biotecnologia por terem possibilitado a realização dessa importante etapa de minha vida.

Aos meus pais Ivo e Neide e minha irmã Ivone por todo o apoio durante todos esses anos

A minhas tias Edith e Doroteia, minha avó Herta que sempre me ensinaram a importância do trabalho e da dedicação.

Ao professor Marcos Antonio de Oliveira por ter me dado à oportunidade da realização deste trabalho, por sempre estar disposto a dividir conhecimento, pelas broncas e principalmente pela infinita paciência. E não poderia esquecer também por aqueles momentos de descontração. Marcão foi um prazer inenarrável!!!!

Aos membros da banca examinadora Prof. Dr. Fernando M. Araújo Moreira, Prof. Dr. Marcos Hikari Toyama, Prof. Dr. Eucides Matheucci Jr., Prof. Dr. Fernando José Zara, Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo

Aos professores da UFSCar, Prof. Dr. Anderson F. da Cunha e Prof. Dr. Iran Malavazi, pela valiosa participação no exame de qualificação, e também, juntamente com Prof. Dr. Flávio H. Silva, por terem me acolhido em seus laboratórios no início deste trabalho.

A meus prezados colegas de laboratório, Carlos Tairum (Carlão), valeu pela força. Carla (Cumpadi), Renata (Curupira), Vanessa (Vai-q-da), Larissa (Shiboca), Henrique (Baloo), Lucas (Geléia), Rafael (Palha), Cinthia e Luana.

A Mayara e Leonardo pela força nos experimentos, o meu muito obrigado !!!

Aos grandes amigos Douglas, Guilherme, Tais e Rafael fêis companheiros de república.

A meus grandes amigos “Bartira”, Tavin, Leozin, Kegin, Batata, Mineiro, Pedrão, Gex, Farofa, pelo companheirismo, festas, formaturas... E não poderia esquecer meu grande amigo Leo (*in memoriam*) que estava onde estiver sempre estará no coração de todos os Bartira.

A todos os amigos da UFSCar e UNESP-CLP que estiveram presentes em minha vida

A meus ex-orientadores(as) Dr. Cesar Milton Baratto (UNOESC), Dr. Marcelo Fossa da Paz (UNOESC), Dr. João Batista Ribeiro (Embrapa-CNPISA), Dra. Andrea Dell Pillar Penãloza (Embrapa-Cenargen) e Dra. Ana Cristian Sagebin Albuquerque pela oportunidade de elevar meus conhecimentos.

Ao Dr. Marcio Voss por ter sido responsável pela realização de meu primeiro estágio na área de pesquisa o que despertou em mim o gosto pela ciência.

A meu grande amigo Wililam Kopp (Guri) pela amizade desde o início da graduação, e apoio no sonho do ingresso no programa de Biotecnologia da UFSCar. Valeu Guri!!!
A Universidade Estadual Paulista, Campus do Litoral Paulista, por ter oferecido o espaço físico para realização deste trabalho.

A FAPESP pelo amparo financeiro na forma de bolsa e manutenção do projeto.

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei
Conhecer as manhas e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs,
É preciso o amor pra poder pulsar,
É preciso paz pra poder sorrir,
É preciso a chuva para florir.
Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha, e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada,
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,
Estrada eu sou
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,
Um dia a gente chega, no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história,
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,
De ser feliz

RESUMO

As tioredoxinas peroxidases (TPx), constituem um grupo de proteínas antioxidantes que vêm sendo bastante estudadas pela sua atuação na decomposição de diversos tipos peróxidos, como o H₂O₂, peroxinitritos e peróxidos orgânicos. A capacidade de decomposição de peróxidos pelas TPx está relacionada a presença de uma cisteína conservada denominada de cisteína peroxidásica (Cys_P). A maioria das TPx possuem uma segunda cisteína (cisteína de resolução - Cys_R) a qual forma um dissulfeto com Cys_P após a decomposição de um peróxido. Adicionalmente, à atividade peroxidásica, algumas TPx possuem atividade de chaperona molecular e também estão envolvidas em processos de sinalização de crescimento celular induzidos por hidroperóxidos. Já foi demonstrado que a isoforma citosólica de TPx de *Schizosaccharomyces pombe* é capaz de interagir diretamente com uma MAPK (Sty1) através da formação de um dissulfeto misto entre as proteínas, que é estabilizado quando a Cys_R é substituída por um resíduo de serina. Entretanto, nenhuma interação deste tipo foi descrita para outros organismos. Em *Saccharomyces cerevisiae* ocorre uma isoforma de TPx no núcleo (nTPx) e a revisão da literatura demonstra a relevância desta proteína na manutenção do silenciamento dos telômeros e decomposição de peróxidos orgânicos no núcleo. Estudos em escala proteômica utilizando espectrometria de massa e duplo híbrido indicam a associação de nTPx com MAP quinases, entretanto, apesar de sua localização e participação em processos biológicos de relevância, trabalhos relacionados com nTPx são escassos. Estudos em escala proteômica relataram a interação física entre nTPx e as proteínas Mec3, Gts1, Pcl1 e Dog2 relacionadas a sinalização celular ou manutenção do silenciamento telomérico. No entanto, não foram efetuados estudos pontuais visando confirmar estas interações como também averiguar a possibilidade das interações entre nTPx e as proteínas supracitadas serem estabelecidas através de dissulfetos mistos. Este trabalho teve por objetivo a avaliação de interações previamente descritas na literatura entre nTPx e Mec3, Pcl1 e Dog2 por meio da expressão e purificação destas proteínas e avaliação *in vitro* de interações como também *in vivo* através de ensaios de duplo híbrido. Diversos esforços com diferentes abordagens foram efetuados, entretanto não foi possível a superexpressão de Mec3, Pcl1, Dog2, indicando um efeito tóxico destas proteínas sobre as linhagens utilizadas. Por outro lado, obtivemos grande sucesso na superexpressão de nTPx e nTpx^{C112S} (8 mg e 10 mg por litro de cultura de células) em linhagens de *Escherichia coli* BL21 (DE3) C43, o que representa a primeira vez que estas proteínas foram expressas sem trucamentos. Também foi possível expressar na mesma linhagem a proteína Gts1. Estes resultados abrem a possibilidade de estudos posteriores visando a determinação de suas estruturas tridimensionais, por metodologias como cristalografia de raios-X ou ressonância magnética nuclear (RMN). Por fim, os resultados de interação *in vivo* utilizando a técnica de duplo híbrido em levedura, confirmaram a interação entre nTPx e Mec3, Gts1 e Dog2. Entretanto ao contrário dos resultados descritos na literatura, não foi detectada interação entre nTPx e Pcl1, reforçando que experimentos pontuais são necessários em adição aos experimentos de larga escala.

Palavras-chave: Tiorredoxinas Peroxidases. Crescimento Celular. Silenciamento Telomérico.

ABSTRACT

The thioredoxin peroxidase (Tpx) is a group of antioxidant proteins that has been widely studied due to its role in the decomposition of different peroxides such as H₂O₂, peroxyxynitrite and organic peroxides. The ability of peroxide decomposition by Tpx is related to the presence of a conserved cysteine called peroxidatic cysteine (Cys_P). Most Tpx has a second cysteine (resolving cysteine - Cys_R) which forms a disulfide with Cys_P after peroxide decomposition. In addition to the peroxidase activity, some Tpx have molecular chaperone activity and are also involved in signaling of cell growth induced by hydroperoxides. It has been demonstrated that the Tpx cytosolic isoform of *Schizosaccharomyces pombe* is able to interact directly with MAPK (Sty1) via mixed disulfide, which is stabilized when the Cys_R is replaced by a serine residue. *Saccharomyces cerevisiae* have a nuclear isoform of Tpx (nTPx) and review of the literature shows the importance of this protein in maintaining the telomere silencing and decomposition of organic peroxides in the nucleus. Scale proteomic studies using mass spectrometry and two-hybrid indicate the nTPx association with MAP kinases. However, despite its location and participation in biological processes of relevance, works related to nTPx are scarce. Scale proteomics studies reported the physical interaction between nTPx and Mec3, Gts1, Pcl1 and Dog2. These proteins are related to cell signaling or maintenance of telomeric silencing. However, no specific studies were performed to confirm these interactions and if they are established by mixed disulfides. This study aimed to evaluate the interactions previously described in the literature between nTPx and Mec3, Pcl1, Dog2 and Gts1 through the expression and purification of these proteins and *in vitro* evaluation of interactions as well as *in vivo* tests using two-hybrid. Several efforts were made with different approaches, nevertheless it was impossible overexpression of Mec3, Pcl1, Dog2, indicating a toxic effect of these proteins on the strains used. Furthermore, we found great success in overexpression of nTPx and nTpx^{C112S} (8 mg and 10 mg per liter of cell culture) in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) C43. This is the first time that these proteins were expressed in native form. It was also possible to overexpress the Gts1 protein in the same strain. These results could lead for new approaches in future studies in order to determine these three-dimensional structures, by methods such as X-ray crystallography or nuclear magnetic resonance (NMR). Finally, the results obtained using the technique of two-hybrid yeast confirmed the interaction *in vivo* among nTPx and Mec3, Gts1, Dog2. However, opposing the results described in the literature, no interaction was detected between nTPx and PCL1, emphasizing the necessity of specific experiments in addition to the large-scale ones.

Key Words – Thioredoxin Peroxidase. Cell Growth. Telomeric silencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cadeia transportadora de elétrons de mamíferos.....	14
Figura 2.	Classificação das TPx.....	17
Figura 3.	Redução de hidroperóxidos e relação com o sistema redutor das TPx.....	18
Figura 4.	Diferentes formas oligoméricas de cTPxI.....	20
Figura 5.	Resultado da extração de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	43
Figura 6.	Resultado da amplificação dos genes <i>nTPx</i> , <i>Mec3</i> , <i>Dog2</i> , <i>Pcl1</i> e <i>Gts1</i>	44
Figura 7.	Resultado de dupla digestão de <i>nTPx</i> com <i>Bam</i> HI e <i>Nde</i> I por diferentes períodos de tempo.....	45
Figura 8.	Alinhamento de trechos dos sequenciamentos dos genes <i>Dog2</i> , <i>nTPx</i> , <i>Mec3</i> , <i>Pcl1</i> e <i>Gts1</i> ligados ao plasmídeo pET15b.....	48
Figura 9.	Teste de expressão das proteínas nTPx e Dog2.....	49
Figura 10.	Teste de expressão de nTPx e Dog2 a 20°C.....	49
Figura 11.	Expressão de nTPx e Dog2 em BL21 (DE3) C43.....	50
Figura 12.	Purificação de nTPx por meio de cromatografia de afinidade.....	51
Figura 13.	Avaliação da decomposição de peróxido de hidrogênio por meio da oxidação do DTT	51
Figura 14.	Resultado de seqüenciamento e análise do plasmídeo pET15b- <i>nTPx</i> ^{C112S}	53
Figura 15.	Resultado dos procedimentos de purificação de nTPx ^{C112S}	54
Figura 16.	Resultado de indução da expressão das proteínas Dog2, Mec3 e Pcl1 em BL21(DE3).....	55
Figura 17.	Resultado de purificação por IMAC do extrato proteico de linhagens de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) carreando plasmídeos (pET15b) para a expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2.....	56
Figura 18.	Resultado de indução da expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2 em linhagens de <i>E. coli</i> BL21(DE3) a 20°C.....	57
Figura 19.	Resultado de indução da expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2 em linhagens de <i>E. coli</i> BL21(DE3) C43.....	57
Figura 20.	Resultado de purificação por IMAC do extrato proteico de linhagens de <i>E. coli</i> BL21(DE3) C43 carreando plasmídeos (pET15b) para a expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2.....	58
Figura 21.	Teste de expressão das proteínas Mec3, Pcl1 e Dog2 em Origami (DE3).....	59

Figura 22.	Resultado de purificação por IMAC do extrato proteico de linhagens de <i>E. coli</i> Origami (DE3) carreando plasmídeos para a expressão das proteínas Pcl1 Mec3 e Dog2.....	60
Figura 23	Resultado de indução da expressão da proteína Gts1 em BL21(DE3).....	61
Figura 24.	Resultado dos procedimentos de purificação de Gts1.....	61
Figura 25.	Resultado de indução da expressão da proteína Gts1 em BL21(DE3) C43.....	63
Figura 26.	Resultado dos procedimentos de purificação de Gts1.....	63
Figura 27	Representação do sistema duplo híbrido de levedura.....	67
Figura 28.	Mapas dos plasmídeos de duplo híbrido pGADT7AD e pGBKT7.....	68
Figura 29.	Alinhamento de trechos dos sequenciamentos dos genes, <i>nTPx Dog2</i> , <i>Pcl1</i> , <i>Gts1</i> e <i>Mec3</i> , ligados aos plasmídeos de duplo híbrido.....	70
Figura 30.	Eletoferograma do sequenciamento do plasmídeo pGBKT- <i>nTPx</i> ^{C112S}	71
Figura 31.	Resultado dos ensaios de duplo híbrido para avaliação de interações nTPx × Mec3 e nTPx × Dog2.....	72
Figura 32.	Resultado dos controles negativos e positivos utilizados nos ensaios de duplo híbrido de em meio seletivo contendo <i>t</i> -BOOH.....	74
Figura 33.	Resultado de ensaio de duplo híbrido para nTPx × Mec3.....	74
Figura 34.	Resultado dos ensaios de duplo híbrido para nTPx × Dog2.....	75
Figura 35.	Resultado dos ensaios de duplo híbrido para nTPx × Gts1.....	75
Figura 36.	Resultado dos ensaios de duplo híbrido para nTPx × Pcl1.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CDK	Ciclina dependente de quinase
cTPx I	Tiorredoxina Peroxidase citosólica I
cTPx II	Tiorredoxina Peroxidase citosólica II
cTPx III	Tiorredoxina Peroxidase citosólica III
Cys_P	Cisteína peroxidásica
Cys_R	Cisteína de resolução
Dog2	<i>2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase1</i>
DTT	1,4 Ditioneitol
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Gpx	Glutationa peroxidase
Gts1	<i>Glycine Threonine Serine repeat protein 1</i>
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
Hog1	<i>High Osmolarity Glycerol response</i>
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
LB	Luria-Bertani
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitose
Mec3	<i>Mitosis Entry Checkpoint 3</i>
MPF	Fator promotor de fase M
mTPx	Tiorredoxina Peroxidase mitocondrial
NADPH	Nicotimida Adenina Dinucleotídeo Fosfato -H
nTPx	Tiorredoxina Peroxidase nuclear
O₂^{•-}	Radical ânion superóxido
OD₆₀₀	Densidade óptica de 600nm
OH⁻	Hidroxila
•OH	Radical Hidroxila
Pcl1	<i>Pho85 Cyclin1</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
Prx	Peroxirredoxina
SA	Sítio Ativo
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida -SDS
Srx	Sulfiredoxina
TAE	Tris-ácido Acético-EDTA
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina
TPx	Tiorredoxina Peroxidase
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TrxR	Tiorredoxina Redutase
Trx	Tiorredoxina
Tsa1	<i>Thiol specific antioxidant protein 1</i>
X-Gal	<i>5-bromo 4 chloro 3 indolyl-beta-D-galactopyranoside</i>
X-α-Gal	<i>5-bromo 4 chloro 3 indolyl-alpha-D-galactopyranoside</i>
Yap1	<i>Yeast activator protein 1</i>
YPD	<i>Yeast extract-Peptone- Dextrose</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Espécies Reativas de Oxigênio	15
1.2	Proteínas Antioxidantes: Tiorredoxinas Peroxidases	17
1.3	Características Catalíticas e Estruturais das TPx	18
1.4	Transdução de Sinal	22
1.5	Tiorredoxina Peroxidase Nuclear	24
2	OBJETIVO GERAL	32
2.1	Objetivos Específicos	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Reagentes	30
3.2	Meios de Cultura e Linhagens de Bactérias e Leveduras	30
3.3	Extração de DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	31
3.4	Amplificação dos Genes por PCR	32
3.5	Reação de ligação com pTZ57r/t	33
3.6	Obtenção dos transformantes em <i>E. coli</i> DH5 α	33
3.7	Mini preparação plasmidial	34
3.8	Dupla digestão <i>Bam</i> HI e <i>Nde</i> I	34
3.9	Reação de ligação em pET15b	35
3.10	Triagem dos transformantes	35
3.11	Mutação sítio dirigida de nTPx	36
3.12	Sequenciamento dos plasmídeos	36
3.13	Transformação em <i>E. coli</i> BL21 (DE3), BL21 (DE3) C43 e Origami (DE3)	37
3.14	Purificação das proteínas recombinantes	38
3.15	Ensaio de atividade de nTPx através da oxidação do DTT	39
3.16	Construção dos plasmídeos de duplo híbrido	39
3.17	Reação de digestão de pGADT7 e pGBKT7	39
3.18	Preparo de células competentes de <i>S. cerevisiae</i>	40
3.19	Transformação das linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	41
3.20	Cruzamento das Linhagens Y2HGold e Y187	41
3.21	Confirmação da interação entre as proteínas	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.2	Extração do DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	43
4.3	Amplificação dos Genes	43
4.4	Ligação dos genes em pTZ57r/t	44
4.5	Ligação dos genes <i>nTPx</i> e <i>Dog2</i> em pET15b	45
4.6	Expressão das Proteínas nTPx e <i>Dog2</i>	48
4.7	Ensaio de atividade de nTPx através da oxidação do DTT	51
4.8	Mutação Sítio Dirigida de nTPx	52
4.9	Experimentos de Expressão das Proteínas <i>Mec3</i> , <i>Dog2</i> , <i>Pcl1</i> e <i>Gts1</i>	54
4.10	Indução da expressão em linhagem <i>E. coli</i> BL21 (DE3) C43	57
4.11	Expressão em <i>E. coli</i> Origami (DE3)	59
4.12	Avaliações de interações proteicas utilizando o sistema duplo híbrido	65
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	77
6	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies Reativas de Oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas durante o metabolismo normal de organismos aeróbicos e, em determinadas condições, seus níveis podem aumentar consideravelmente gerando uma condição de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Quantidades elevadas de EROs podem causar danos a biomoléculas e estão relacionadas a processos biológicos normais ou deletérios e doenças genéticas degenerativas como o mal de Alzheimer, processos inflamatórios, diabetes, câncer e envelhecimento. Segundo Stadtman e colaboradores (1990), a presença destas espécies, mesmo em pequenas quantidades, representa risco para a célula em virtude da sua grande capacidade de danificar componentes celulares.

EROs tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) são formados durante o metabolismo aeróbico normal (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é a principal fonte de ATP nas células e, portanto, é essencial para a vida aeróbia. Entretanto, durante a produção de energia, um pequeno número de elétrons "vaza" como radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e dados na literatura apontam que cerca de 0,1 a 5% de todo o produto da cadeia transportadora de elétrons escapa na forma de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Estas moléculas podem receber elétrons através de reações com metais divalentes, pela reação de Fenton (1) ou diretamente pela reação de Haber Weiss (2) e formar o radical hidroxila ($\bullet OH$) que por sua vez é altamente reativo e conseqüentemente extremamente tóxico para a célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).



A figura 1 representa a cadeia transportadora de elétrons de mamíferos e os complexos responsáveis pelo transporte.

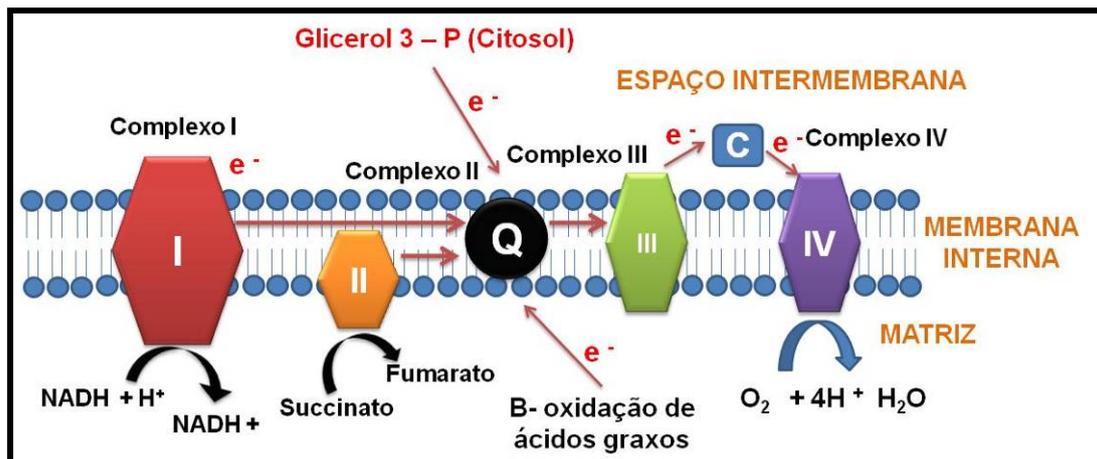


Figura 1. Cadeia transportadora de elétrons de mamíferos. Os elétrons entram na cadeia transportadora por diferentes pontos. Nos complexos I e II, os elétrons oriundos do catabolismo de ácidos graxos e do glicerol 3-fosfato são transferidos para a ubiquinona (Q). A ubiquinona desloca-se na membrana interna da mitocôndria transferindo os elétrons para o complexo 3. O citocromo C (C), transfere os elétrons para o complexo IV e ocorre a etapa final da cadeia, onde os elétrons são transferidos para o oxigênio, acceptor final, gerando H₂O. Compilado de COX e MICHAEL (2011).

Durante muito tempo acreditou-se que a produção de EROs era, em princípio, prejudicial para as células (RHEE e col., 2006). No entanto pesquisas têm demonstrado que a sinalização celular por EROs existe e é essencial para a vida. Este tipo de sinalização é denominada sinalização redox (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; WITENBOURN, 2008; LUKOSZ e col., 2010). As EROs possuem uma ampla gama de ação por causa de sua capacidade de interagir com quase todas as moléculas biológicas, sendo que seu modo de ação é também dependente da localização de suas moléculas-alvo (LUKOSZ e col., 2010). Estudos demonstraram que algumas EROs endógenas como o H₂O₂ são produzidos nas células de forma transiente em resposta à ativação de receptores da superfície celular e tem sido reconhecido como um importante mensageiro intracelular sendo capaz de ativar e inativar fatores de transcrição, canais de membrana, enzimas metabólicas e também modular vias dependentes de cálcio e fósforo, principalmente através de oxidações de resíduos de aminoácidos que contém tióis como metioninas e cisteínas (KANG e col., 2005; RHEE e col., 2006; WINTERBOURN, 2008; WINTERBOURN e HAMPTON, 2008). No caso das cisteínas estas oxidações podem resultar em uma ampla variação no estado redox. Estes incluem o tiolato (-S⁻) através de uma transição de um elétron, ácido sulfênico (-SOH) e dissulfeto (-S-S) por uma transição de dois elétrons, ácido sulfinico (-SO₂H) por uma transição de quatro elétrons e eventualmente, ácido sulfônico (-SO₃H) por uma transição de seis elétrons (FORMAM e col., 2010). Esta variação pode atuar na ativação/repressão ou mesmo na modulação da atividade enzimática, como também

promove a formação de dissulfetos intra e/ou intermoleculares que estão relacionadas a transições estruturais entre formas oligoméricas distintas, que podem ter grandes implicações na função de proteínas e complexos proteicos (HALL e col., 2009). Embora a concentração de H₂O₂ gerado no nível intracelular em resposta à estimulação seja da ordem de micromolar, a sua presença mesmo por um curto período de tempo representa um risco à célula, pois pode ser convertido em espécies radicalares tóxicas como o \bullet OH e O \bullet^- que podem danificar componentes celulares (KANG e col., 2005; RHEE, 2006).

1.2 Proteínas Antioxidantes: Tiorredoxinas Peroxidases

Proteínas antioxidantes utilizam diversas formas de catálise para a decomposição de EROs. Uma das mais importantes e muito estudadas atualmente são as proteínas que apresentam o aminoácido cisteína em seus sítios ativos e possuem mecanismo catalítico baseado na oxidação e redução do grupo tiól presente na cadeia lateral deste aminoácido (FORMAM e col., 2010; FERRER-SUETA e col., 2011; NAGYE col., 2011).

Dentre as enzimas que degradam H₂O₂ utilizando cisteínas, damos um papel de destaque às tiorredoxinas peroxidases (TPx), também conhecidas como peroxirredoxinas (Prx) (RHEE e col., 2005). Essa classe de proteínas foi descrita inicialmente em *Saccharomyces cerevisiae* por Kim e colaboradores (1985) e foi denominada de *Thiol specific antioxidant protein 1* (Tsa1), pois foi sugerido que a especificidade por tióis se devia à suposta capacidade de inativação de EROs centrados no enxofre. Posteriormente foi demonstrado que Tsa1 é uma peroxidase dependente de tiól, assim sua especificidade por tióis se devia ao fato que somente esses redutores regeneram sua forma oxidada (RHEE e col., 2005). A importância desta proteína como antioxidante foi evidenciada em ensaios específicos de pressão oxidativa incubando a levedura em 100% O₂, ou por ensaio na presença de Fe³⁺, resultando em um aumento na síntese de Tsa1, chegando até 0,7% do total de proteínas solúveis produzidas, ou seja, uma das proteínas solúveis mais abundantes da célula. Em seguida, foi evidenciado que o redutor fisiológico de Tsa1 era a proteína tiorredoxina (Trx), que será detalhada posteriormente, esta proteína também recebeu a denominação de tiorredoxina peroxidase citosólica I (cTPxI) (PARK e col., 2000). Inicialmente as tiorredoxinas

peroxidases foram identificadas em microrganismos e posteriormente em diversos organismos, desde *Archea* até plantas e mamíferos (TRIVELLI e col., 2003; RHEE e col., 2005; FLOHÉ e HARRIS, 2007).

Em nível celular estas proteínas apresentam várias isoformas podendo ser encontradas nos mais diversos compartimentos celulares. Em *S. cerevisiae*, as isoformas cTPxI, II e III estão localizadas no citossol, mTPx na mitocôndria e nTPx localizada no núcleo (PARK e col., 2000). Alguns trabalhos apontaram que a eficiência catalítica para decomposição de H₂O₂ das TPx ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) eram menores que a da catalase ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ou glutathione peroxidase ($\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Mas estudos recentes têm demonstrado que a eficiência catalítica das TPx podem alcançar $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (PARSONAGE e col., 2005; OGUSUCU e col., 2006; HORTA e col., 2010). Além de decompor H₂O₂ já foi demonstrado que as TPx são capazes de decompor com elevada eficiência catalítica peróxidos de nitrito, peróxidos orgânicos e até mesmo peróxidos de aminoácidos e proteínas (PARK e col., 2000; MUNHOZ e NETTO, 2004; REINARTZ e col., 2008; HORTA e col., 2010).

Em *S. cerevisiae* cTPxI apresenta na fase *log* de crescimento celular cerca de 378000 moléculas por célula (mol/cel), cTPxII apresenta 4820 (mol/cel), cTPxIII 16228 (mol/cel), mTPx apresenta 4510 (mol/cel) e nTPx 1840 (mol/cel) (GHAEMMAGHAMI e col., 2003). A título de comparação, enzimas antioxidantes muito estudadas como a catalase citosólica, catalase peroxissomal e a glutathione peroxidase citosólica estão presentes em menor proporção que cTPxI (320, 600 e 8000 mol/cel, respectivamente) o que demonstra que as isoformas compartimentalizadas (mTPx e nTPx) possuem uma abundância significativa. Neste contexto, as TPx aparentam ter papel de grande importância para a célula em virtude de diversas características como representação, abundância e eficiência catalítica.

1.3 Características Catalíticas e Estruturais das TPx

Diferente de outras proteínas envolvidas no combate ao estresse oxidativo, as tioredoxinas peroxidases não possuem grupamentos prostéticos, mas possuem um resíduo de cisteína em seus sítios ativos (SA), denominada de cisteína peroxidásicas (Cys_p), envolvido diretamente na redução dos peróxidos (NETTO e col., 2006). A grande maioria das TPx já descritas possui um segundo resíduo de cisteína,

denominada de cisteína de resolução (Cys_R) e ambas estão envolvidas no ciclo catalítico (RHEE e col., 2005; HALL e col., 2010; NAGYE e col., 2011; WOOD e col., 2003, HORTA e col., 2010).

De acordo com suas características estruturais e pelo número de cisteínas presentes no sítio ativo, as TPx podem ser divididas em três classes: 1-Cys, que possuem somente uma cisteína em seu sítio ativo; as 2-Cys típicas, que possuem duas cisteínas e durante o ciclo catalítico formam um dissulfeto intermolecular; e as 2-Cys atípicas, que também possuem dois resíduos de cisteína, mas diferentemente das anteriores formam uma ponte dissulfeto intramolecular (WOOD e col., 2003). As diferentes classes de TPx são representadas na figura 2. Recentemente foi proposta uma nova classificação que leva em conta aspectos estruturais do sítio ativo e divide as TPx em seis subfamílias (AhpC-Prx1, TPx, BCP-PrxQ, Prx5, Prx6 e AhpE) (NELSON e col., 2011).

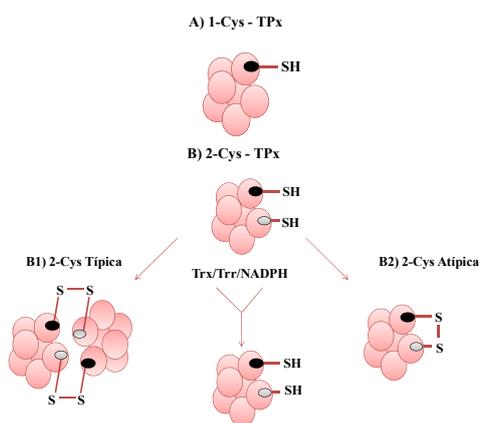


Figura 2. Classificação das TPx. Classificação das TPx conforme o número de cisteínas presentes no sítio ativo: **A)** 1- Cys TPx: compreende as tiorredoxinas peroxidases que possuem apenas uma cisteína em seu sítio ativo. Seu sistema redutor é pouco estudado, segundo Monteiro (2007), essa classe de proteínas pode ser reduzida por ácido ascórbico. **B)** 2-Cys TPx. Possuem duas cisteínas em seus sítios ativos, uma cisteína peroxidásica (em preto) e uma cisteína de resolução (em cinza). **B1)** 2-Cys TPx Típica. Apresenta-se em forma de dímero, em sua forma oxidada forma ligação dissulfeto entre a cisteína peroxidásica de um monômero com a cisteína de resolução de outro monômero. **B2)** 2-Cys TPx Atípica. Apresenta-se na forma de monômero e forma ligação dissulfeto entre a cisteína peroxidásica e a cisteína de resolução.

Nas TPx após a redução dos peróxidos ocorre a oxidação do resíduo catalítico, sendo necessário que estas proteínas tenham seus resíduos de cisteína reduzidos para que possam degradar uma nova molécula de peróxido (Figura 3). Com exceção das formas 1-Cys, para as quais foi recentemente demonstrado que podem ser reduzidas também por ácido ascórbico (MONTEIRO e col., 2007), a grande maioria das TPx são reduzidas por uma proteína de baixo peso molecular, altamente conservada durante a evolução, denominada de tiorredoxina (Trx). Os elétrons necessários para a

redução das TPx são oriundos também de resíduos de cisteínas presentes nos SA das Trx (YOSHIOKA, 2006). Após a transferência de equivalentes redutores as cisteínas de Trx se tornam oxidadas em dissulfeto e são reduzidas pela enzima TrxR utilizando elétrons provenientes do NADPH (OLIVEIRA e col., 2010). O sistema redutor composto por Trx, TrxR e NADPH é denominado de sistema tioredoxina. A figura 3 ilustra a transferência de elétrons entre peróxidos (ROOH), TPx, Trx e TrxR.

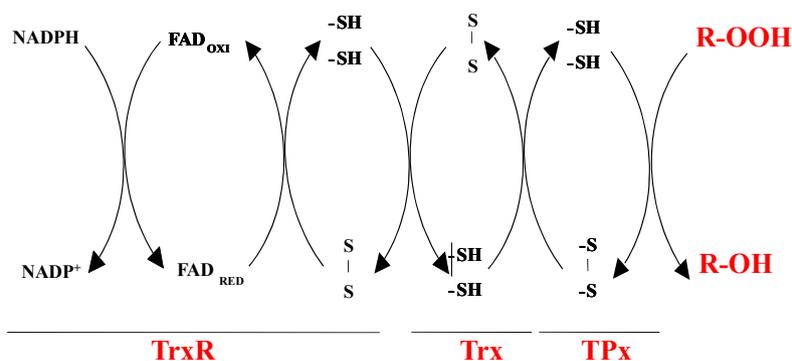


Figura 3. Redução de hidroperóxidos e relação com o sistema redutor das TPx. TPx na forma reduzida reage com um peróxido liberando H₂O, no caso da redução de H₂O₂, ou um álcool, no caso de peróxidos orgânicos, tornando-se oxidada formando uma ligação dissulfeto entre as duas cisteínas de TPx. TPx oxidada é reduzida por Trx e volta a sua forma reduzida. Trx oxidada é reduzida pela proteína TrxR (Tioredoxina redutase) com elétrons provenientes de NADPH.

Com exceção das 2-Cys atípicas todas as TPx se encontram na forma de dímeros obrigatórios (WOOD e col., 2003; OLIVEIRA e col., 2007). Entretanto, algumas TPx 2-Cys típicas em determinadas condições podem formar estruturas mais complexas, como decâmeros, através da organização de cinco dímeros (α 2[5]) (WOOD e col., 2003; OLIVEIRA e col., 2007; ARANE col., 2009). A função celular destes oligômeros era desconhecida, até 2004 quando Jang e colaboradores demonstraram em seus estudos novas funções celulares e atividades das TPxs em leveduras. Quando os níveis de peróxidos estão moderados cTPxI e cTPxII se comportam como peroxidases, mas em condições de alto estresse oxidativo e/ou choque térmico estas proteínas apresentam atividade de chaperona molecular, com conseqüente eliminação da atividade peroxidásica. Esta atividade apresentada por cTPxI foi de 3 a 5 vezes mais eficiente do que as descritas para chaperonas reconhecidamente eficientes como α -cristalina e Hsp16.5 (JANG e col., 2004). Esta mudança na atividade é efetivada através de uma reorganização estrutural, obtida através oligomerização dos dímeros formando decâmeros do tipo $[\alpha$ 2]5 e estruturas de maior peso molecular (Figura 4). Quando as doses de peróxidos são muito altas, a reorganização é regulada pela hiperoxidação da cisteína peroxidásica com formação de cisteína ácido sulfinico (Cys_p-SO₂H) ou cisteína

ácido sulfônico ($\text{Cys}_P\text{-SO}_3\text{H}$). Este processo acarreta na perda da atividade peroxidásica dessas proteínas, pois estes intermediários não podem ser reduzidos por Trx. Entretanto, Biteau e colaboradores (2003) demonstraram que a forma hiperoxidada ($\text{Cys}_P\text{-SO}_2\text{H}$) pode ser reduzida ($\text{Cys}_P\text{-SH}$) através da ação da sulfirredoxina (Srx), uma proteína de baixo peso molecular dependente de ATP, Mg^{2+} e um tiól, a qual pode restaurar a capacidade peroxidásica de TPx. Entretanto, a oligomerização por choque térmico ainda é pouco compreendida. Cabe salientar que posteriormente ao trabalho inicial, já foi detectada a atividade de chaperona de TPx de diferentes organismos, incluindo humanos (MOON e col., 2005; CHUANG e col., 2006; KUMSTA e col., 2009; AN e col., 2010). Adicionalmente, nas formas decaméricas de TPx também já foi detectada atividade peroxidásica (JANG e col., 2004; HALL e col., 2009).

Devido às características apresentadas, foi proposto o monitoramento do estado de oligomerização das TPx como marcador celular de resposta ao estresse oxidativo e térmico (LIM e col., 2008). Os motivos da agregação de proteínas devido ao choque térmico estão diretamente ligados à desnaturação parcial ou total das proteínas e como consequência, ocorre à exposição dos sítios hidrofóbicos de diferentes proteínas levando a agregações não específicas (JANG e col., 2004). Adicionalmente sob condições de estresse oxidativo os tióis presentes na superfície da proteína podem contar para a formação de dissulfetos inespecíficos entre proteínas, o que também resulta em agregação (DALLE-DONNE e col., 2007; THORPE e COPPOCK, 2007). Leveduras mutantes ΔctpxI são sensíveis a choques de temperatura e acumulam proteínas agregadas quando ocorre choque térmico (JANG e col. 2004). Neste contexto, a atuação das TPx como chaperonas parece ter grande importância uma vez que recentemente foi detectada forte interação entre TPx e ribossomos (TROTTER e col., 2008; SIDERI e col., 2010).

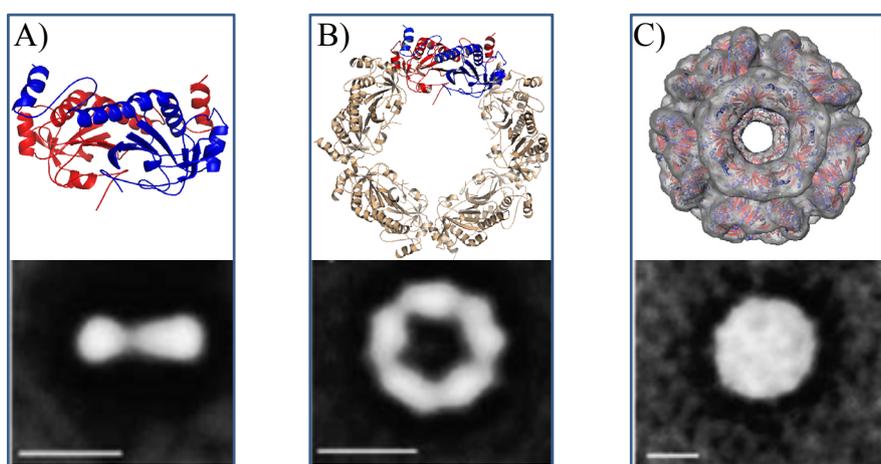


Figura 4. Diferentes estruturas quaternárias apresentadas por Tpx 2-Cys típicas. A) Formação de uma estrutura dimérica. B) Junção de cinco estruturas diméricas formando um decâmero. C) Conexão de decâmeros formando uma super chaperona. As imagens superiores A e B foram geradas por PyMOL (<http://www.pymol.org/>) e imagem C compilada de Meissner e col. 2004. As imagens inferiores representam as estruturas quaternárias de cTPxI observadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A barra de escala (em branco) equivale a 10nm. Imagens inferiores foram compilada de Jang e col., 2004.

1.4 Transdução de Sinal

Por muitos anos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi visto como um subproduto do metabolismo aeróbico. Em razão do poder oxidante do H_2O_2 , assumiu-se que quanto mais rápida fosse sua eliminação, melhor seria para o metabolismo celular. Atualmente sabe-se que as células produzem H_2O_2 para mediar diversas respostas fisiológicas, tais como a proliferação celular, diferenciação e migração (RHEE, 2005). Uma das fontes de produção de EROs nas células se dá pela ação das enzimas NADPH oxidases, conhecidas como Nox (LAMBETH e col., 2004). Essas enzimas apresentam ampla distribuição nos tecidos e promovem a redução do oxigênio molecular a radical ânion superóxido a custas de elétrons doados por NADPH, então o superóxido pode ser convertido em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (LAMBETH e col., 2004).

Recentemente, um novo papel para as TPx tem sido demonstrado onde essas enzimas consomem H_2O_2 em baixas concentrações, mas acabam sendo inativadas em altas concentrações, sendo oxidadas a cisteína ácido sulfínico (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008). Assim, sua atividade como antioxidante é colocada em discussão, pois as tioredoxinas peroxidases atuam como antioxidantes em determinadas condições. Desta forma, postulou-se que as TPx podem estar envolvidas em transdução de sinais redox (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008).

Acredita-se que a forma de ação dos oxidantes, ocorre levando a eventos de oxidação e redução de tióis protéicos (HALL e col., 2009). A oxidação de tióis de proteínas pode alterar sua atividade, sua forma e, conseqüentemente, suas características de ligação aos seus substratos ou mesmo na interação com outras proteínas. Entretanto, para se alcançar os critérios de sinalização, é necessário que ocorra a oxidação preferencial de proteínas e resíduos específicos e o processo necessita ser rápido e reversível (WINTERBOURN e HAMPTON, 2008). No entanto, para que a mensagem seja interpretada corretamente, é necessário que os níveis de H_2O_2 sejam extremamente

regulados, uma vez que a hiperoxidação ou mesmo a hipoxidação dos alvos celulares poderia tornar todo o processo comprometido. Desta forma, a modulação de seus níveis é de suma importância para que ocorra uma resposta celular adequada nos processos em que participa (STONE e col., 2006; FORQUET e col., 2008).

Em *Schizosaccharomyces pombe*, a proteína Sty1 (uma MAP quinase) e seu ativador Wis1 (MAPKK) são necessárias para o controle do ciclo celular e, assim como seus correspondentes em mamíferos (JNK e p38, respectivamente), são ativados por estresse osmótico, térmico e oxidativo, sendo que esta via é regulada negativamente por Trx (LIU e col., 2000). Recentemente, Veal e colaboradores (2004) demonstraram que SpcTPxI, proteína equivalente a PrxII de mamíferos, responde pela ativação de Sty1 por meio da formação de uma ponte dissulfeto misto entre Sty1-SpcTPxI, através da Cys³⁵ de Sty. Os autores observaram que a cisteína peroxidásica (Cys_{SP}⁴⁸) está diretamente envolvida neste processo uma vez que substituição deste resíduo por uma serina impossibilita a formação do complexo. De forma contrária, células expressando SpcTPxI carreando uma substituição Cys→Ser na cisteína de resolução (Cys_R¹⁶⁹), apresenta uma grande elevação do número de complexos Sty-SpcTPxI, quando comparados com o tipo selvagem. Adicionalmente a expressão heteróloga de cTPxI^{C170S} de *S. cerevisiae* também leva ao aparecimento de complexos protéicos entre Sty-SpcTPxI, o que demonstra a conservação desta via em *S. cerevisiae* (VEAL e col., 2004).

S. cerevisiae possui o fator Hog1 (High osmolarity glycerol 1) que corresponde a Sty1 de *S. pombe*, apresentando 82% de identidade (90% de similaridade). Esta proteína foi inicialmente descrita pela observação que *Ahog1* apresenta grande atraso no crescimento em meios hiperosmóticos. Posteriormente, a proteína foi caracterizada como uma MAPK que está envolvida em diversas vias de sinalização, e sua deleção afeta largamente a expressão gênica e a progressão do ciclo celular em G1 e G2 (WESTFALL e col., 2004). Também em *S. cerevisiae*, foi descrito um mecanismo semelhante de regulação Sty1-cTPxI para o ativador de transcrição Yap1 (*Yeast activator protein 1*). Yap1 está largamente envolvido em eventos de ativação de transcrição de diversas proteínas envolvidas na resposta celular ao estresse oxidativo, incluindo as TPx (WU e col., 1994; LEE e col., 1999). Nesta levedura, o ativador de transcrição forma uma ponte dissulfeto transitória com GPx3 (uma tiól peroxidase relacionada com as TPx) durante os eventos de ativação gênica promovida por Yap1 (DELAUNAY e col., 2002). Cabe ressaltar que recentemente as GPx estão

sendo consideradas como uma nova classe de TPx (HORTA e col., 2010). Bozonet e colaboradores (2005) demonstraram que SpTPxI de *S. pombe* é essencial para a manutenção da atividade de Pap1, o fator de transcrição equivalente a Yap1 de *S. cerevisiae*. Os autores também demonstraram que o papel de SpTPxI é dependente de um gene homólogo à sulfiredoxina de *S. cerevisiae* e de mamíferos, demonstrando dados adicionais à regulação descrita para *S. cerevisiae* e mamíferos (CHANG e col., 2004; JANG e col., 2004).

Iwai e colaboradores (2010) descreveram que cTPxIII de levedura também está envolvida na ativação de fatores de transcrição. Foi constatado que cTPxIII possuindo uma substituição na cisteína localizada na posição 120 pode interagir covalentemente com Cad1, um fator de transcrição da família Yap1 que contém dois domínios que são semelhantes aos domínios em Yap1: um domínio bZIP e um domínio carboxi-terminal rico em cisteínas. Esta ligação dissulfeto ocorre entre a cisteína 62 de cTPxIII e Cad1 e é fortemente induzida por peróxidos orgânicos (tert-butilhidroperóxido – *t*-BOOH) e resulta na indução da transcrição da proteína Hsp82, que possui função de chaperona molecular (Iwai e col., 2010). Já foi descrita também interações entre cTPxIII de *S. cerevisiae* e Yak1, uma serina treonina quinase envolvida no controle de crescimento celular, e também com Cka1, um componente da holoenzima caseína quinase envolvida no crescimento e proliferação celular (HO e col., 2002; KROGAN e col., 2006).

Como pode ser observado acima, os trabalhos da literatura atual apontam envolvimento das TPx 2-Cys típicas na transdução de sinal. Entretanto, os estudos de interações em escala proteômica também apontam relações de TPx 2-Cys atípicas com proteínas envolvidas no crescimento celular. Contudo, não há nenhum trabalho que relata interações entre 2-Cys atípicas com proteínas reguladoras do ciclo celular por meio de interações covalentes, através de dissulfetos mistos como descrito entre cTPxI de *S. pombe* e Styl.

1.5 Tiorredoxina Peroxidase Nuclear

A tiorredoxina nuclear (nTPx) possui dois resíduos de cisteínas, um localizado na posição 107 (Cys¹⁰⁷) e outro na posição 112 (Cys¹¹²) e é classificada como

uma 2-Cys TPx atípica, pois forma um dissulfeto intramolecular (CHA e col., 2003; CHOI e col., 2005), ainda, de acordo com a nova classificação pertence à subclasse 5, uma das menos estudadas até o presente momento (NELSON e col., 2010). Estudos comparativos sobre a atividade peroxidásica de nTPx para H₂O₂, *t*-BOOH (terbutilhidroperóxido) e Cu-OOH (hidroperóxido de cumeno) demonstraram que nTPx possui maior atividade na decomposição de alquil hidroperóxidos (Cu-OOH > *t*-BOOH > H₂O₂) (CHA e col., 2003; CHOI e col., 2005). Esses dados indicam que nTPx possui maior afinidade por substratos hidrofóbicos e volumosos. Esta atividade de alquil hidroperóxido redutase também já havia sido relatada para outra tiorredoxina peroxidase de levedura, cTPxIII, que atua no citoplasma (PARK e col., 2000).

Como mencionado anteriormente, *S. cerevisiae* possui em sua fase *log* de crescimento 1840 unidades de nTPx, uma quantidade significativa para uma proteína localizada somente no núcleo, quando comparada a outras proteínas com função antioxidante como a catalase (CAT) que se localiza no citoplasma e possui 319 moléculas por célula na fase *log* de crescimento e a glutathiona peroxidase (GPx) localizada no citoplasma e núcleo e apresentando 2010 moléculas por célula na fase *log* de crescimento (GHAEMMAGHAMI e col., 2003). Várias funções têm sido relacionadas à nTPx, tais como papel no silenciamento telomérico, regulação das dimensões do telômero e também na decomposição de alquil-hidroperóxidos durante a fase *log* de crescimento celular (SINGER e col., 1998; CHA e col., 2003; IZAWA e col., 2003). Segundo Singer e col. (2003), a super expressão de nTPx tem um forte efeito sobre o silenciamento telomérico e sobre o crescimento do telômero. Segundo estes mesmos autores, nTPx pode não ser exigida pela telomerase, mas possivelmente deve interagir com algum fator exigido neste processo. A função de nTPx no metabolismo telomérico já foi cogitada uma vez que inicialmente ela foi chamada de Dot5 (*disrupter of telomeric silencing*), e depois foi caracterizada como uma tiorredoxina peroxidase (PARK e col., 2000).

Em leveduras, quando células são cultivadas em um meio líquido rico, onde a maior fonte de carbono são carboidratos fermentáveis, ocorrem duas fases distintas de crescimento, seguidas por uma fase estacionária na qual as células deixam de se dividir (CHA e col., 2003). Na primeira fase as células satisfazem suas necessidades energéticas principalmente por fermentação (CHA e col., 2003) e a segunda fase de crescimento é iniciada quando a fonte de carbono fermentável se esgota e as células deixam de produzir energia através da fermentação e passam a respirar

consumindo o etanol produzido durante a fase fermentativa. Este processo resulta em grandes mudanças fisiológicas, principalmente pela maior produção de EROs devido a ativação da cadeia de transporte de elétrons e, conseqüentemente, ocorre a ativação de genes que respondem por proteínas antioxidantes, dentre estas proteínas a nTPx (CHA e col., 2003). Estudos revelam que a atividade transcricional de nTPx não é ativada durante a primeira fase exponencial de crescimento. Portanto, isso sugere a possibilidade de que o gene de *nTPx* pode ser induzido na fase diaúxica de crescimento celular atuando como uma alquil hidropoxidase (CHA e col., 2003).

A grande diversidade de funções atribuídas a nTPx pode estar relacionada à sua capacidade de interações com outras proteínas responsáveis por diversas funções celulares, como crescimento celular, resposta a choque térmico, silenciamento telomérico e regulação do tamanho do telômero (IZAWA e col., 2003; CHA e col., 2003). Desta forma interações com diferentes proteínas podem conferir a nTPx uma ampla variedade de funções celulares. Estudos proteômicos de larga escala revelam a detecção de diversas proteínas capazes de efetuar interações com nTPx (HO e col., 2002; ITO, e col., 2001; PTACEK e col., 2005; KROGAN e col., 2006). A avaliação dos resultados revela a interação com importantes fatores relacionados a eventos como crescimento celular e silenciamento telomérico (Tabela 1).

Tabela 1. Proteínas que interagem com nTPx.

Proteína	Função	Referência
Mec3	Crescimento Celular Silenciamento Telomérico <i>Check Point</i> de DNA	Corda e col., 1999 Torre-Ruiz e Lowndes, 1999 Majka e Burgers, 2003
Gts1	Crescimento Celular Chaperona Molecular	Yaguchi e Tsurugi, 2003
Pcl1	Crescimento celular	Espinoza e col, 1994 Iwaki, e col, 2004
Dog2	Estresse oxidativo Estresse osmótico	Tsujimoto, e col. 2000

A seguir os fatores apresentados acima são detalhados.

Mec3

Mec3 é uma proteína de localização nuclear envolvida em processos celulares de reparo de DNA, controle do crescimento celular e silenciamento telomérico (WEINERT e col., 1994; CORDA e col., 1999; TORRE-RUIZ e LOWNDES, 1999; MAJKA e BURGERS, 2003).

Em células eucarióticas os cromossomos devem estar totalmente replicados e íntegros antes que a mitose se inicie (WEINERT e col., 1992). Neste contexto, existe um controle negativo da mitose denominado de verificação do DNA (DNA *checkpoint*) (WEINERT e col., 1992). Neste controle de ciclo celular, a mitose é interrompida em determinados pontos para que ocorram os reparos necessários para a continuação do ciclo celular (WEINERT e col., 1992). A proteína Mec3 funciona em complexo com os fatores nucleares Rad9, Rad17 e Rad24, todos envolvidos no controle do ciclo celular e reparo de danos ao DNA (WEINERT e col., 1992). Segundo Weinert e colaboradores (1992) as células de levedura possuem dois pontos importantes de *checkpoint*, sendo um no início da fase S e outro no início da fase G2 da mitose. Na fase G2 são exigidos seis fatores para que a célula fique retida nesta fase e ocorra a reparação do DNA (Rad9, Rad17, Rad24, Mec1, Mec2 e Mec3). Já para a célula entrar na fase S são essenciais as proteínas Mec1 e Mec2.

Uma das funções relatadas para Mec3 é o seu envolvimento no processo de silenciamento telomérico (CORDA e col., 1999; LONGHESE e col., 2000), indicando que os processos de crescimento celular e silenciamento telomérico podem estar intensamente relacionados. Os dados na literatura apontam o envolvimento de proteínas de reparo de DNA, como Mec3, na manutenção dos telômeros (CORDA e col., 1999, LONGHESE e col., 2000). Além da enzima telomerase, os telômeros apresentam proteínas em íntima relação com DNA telomérico, que fornecem tanto efeito de proteção dos telômeros como também atuam impedindo o acesso da telomerase após a replicação da célula (GRANDIN e CHARBONNEAU, 2007). Estudos recentes demonstraram a interação de Mec3 com Ste1, uma proteína requerida para silenciamento telomérico e integridade do telômero (CORDA e col., 1999). Esses autores demonstraram que deleções de Mec3 levam a um aumento de cerca de 100pb no tamanho dos telômeros. Mec3 e Ste1 possivelmente possuem papel indireto na regulação do tamanho dos telômeros através da ativação da expressão de genes envolvidos neste processo ou mesmo de forma direta através da interação com outros fatores protéicos (CORDA e col., 1999; LONGHESE e col., 2000). Longhese e colaboradores (2000) demonstraram que não apenas Mec3, mas Rad9, Rad17, Rad24 e

Mec1 também possuem grande importância na manutenção dos telômeros, o que indica que além do *checkpoint* de DNA estas proteínas possuem grande importância na manutenção da integridade telomérica.

Pcl1

Pcl1 é uma proteína envolvida na regulação do crescimento celular em situação de privação de nutrientes e também possui papel importante na regulação do ciclo celular entre a fase G1 e S (ESPINOZA e col, 1994; IWAKI e col, 2004). Pcl1 faz parte de uma ampla família de proteínas CDKs, conhecida como família Pcls, as quais são divididas em duas subfamílias baseadas na similaridade das seqüências da região do sítio ativo Pho80 e Pcl (MEASDAY e col., 2002; HUANG e col., 2007). A subfamília Pho80 é composta pelas proteínas Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 e Pcl10, e possuem grande importância na regulação do metabolismo em resposta a alterações ambientais (MEASDAY e col., 2002; HUANG e col., 2007). Já a segunda subfamília compreende as proteínas Pcl1, Pcl2 e Pcl9. Essas proteínas possuem maior expressão na fase G1 do ciclo celular. Pcl9 e Pcl2 são expressas em maior quantidade no final da fase M e início da fase G1, sendo que Pcl2 é expressa até o final da fase G1 e Pcl1 é expressa no final desta fase. Esses dados indicam que Pcl9 tem um papel no início da fase G1, já Pcl1 e Pcl2 aparentam ter um papel redundante na regulação do ciclo celular no final da fase G1 (MEASDAY e col., 2002; HUANG e col., 2007).

Futcher (1996) relata a participação de 11 ciclinas no ciclo celular de *S. cerevisiae*. As proteínas Cln1, 2, 3, 4, 5 e 6 se ligam a Cdc28 e ativam eventos do ciclo celular. As proteínas Pcl1 e Pcl2 se ligam e ativam a Pho85. As diferentes ciclinas presentes em um organismo muitas vezes sobrepõem suas funções, o que acaba tornando seu papel celular controverso. De uma forma mais simplificada a proteína Cln3, principal fator responsável acompanhamento do crescimento da célula, ativa a transcrição dos fatores de transcrição SPF e MPF, que ocasionam a transcrição de Cln1, Cln2, Pcl1, Pcl2, Clb5, Clb6 e muitos outros genes envolvidos na síntese da parede celular e na replicação de DNA. Cln1 e Cln2 são as principais proteínas envolvidas no início da fase *star*, ponto onde a célula obrigatoriamente entra na fase S (FUTCHER, 1996). Cln1 e Cln2 são provavelmente auxiliados por Pcl1, Clb5 e Clb6, sendo que estas duas últimas são as principais responsáveis pelo início da fase S, mas também apresentam sobreposição de funções com Cln1 e Cln2 na fase G1 e com Clb3 e Clb4 na

fase G2/M. Clb3 e Clb4 são os principais responsáveis pelos primeiros eventos da mitose como a formação do fuso mitótico enquanto que Clb1 e Clb2 são os principais responsáveis pelos eventos de final da mitose e alongamento do fuso mitótico (FUTCHER, 1996).

Dog2

A proteína Dog2 é um membro da família das proteínas fosfatases de alto peso molecular, e está envolvida em processos celulares de respostas ao estresse oxidativo e osmótico. Dog2 é encontrada no citoplasma e núcleo e células na fase *log* de crescimento apresentam em média 2400 moléculas desta proteína (NORBECK e col., 1996; RANDEZ-GIL e col., 1995; TSUJIMOTO e col., 2000).

Tsujimoto e colaboradores (2000) demonstraram a importância de Dog2 em resposta ao estresse oxidativo e osmótico, através do aumento da expressão quando submetidas a estresse oxidativo com *t*-BOOH e também por estresse osmótico. Dog2 é regulado em resposta ao estresse osmótico pelos fatores de transcrição Snf1, Pbs2 e Hog1. Hog1 é uma quinase que é fosforilada por Pbs2, resultando na resposta ao estresse osmótico. Mutantes para os fatores Pbs2 e Hog2 possuem a expressão diminuída de Dog2 quando expostas a estresse osmótico. Já mutantes Snf1 e Hog1 possuem total perda da expressão de Dog2 o que sugere que estas proteínas cooperativamente transmitem sinal de estresse osmótico para o promotor de Dog2 (TSUJIMOTO e col., 2000). A exposição a gradientes hiperosmóticos induz as células à expressão de proteínas que regulam as respostas celulares a esse tipo de estresse (NORBECK e col., 1996). Enquanto os estudos proteômicos de larga escala revelam a associação entre Dog2 e nTPx, vale a pena lembrar que o homólogo em *S. pombe* Hog1 (Sty1) é capaz de formar dissulfeto misto com a forma citosólica de TPx (spTPx) (VEAL e col., 2004), o que pode sugerir uma grande intimidade desta via com diferentes TPx.

Gts1

A proteína Gts1 está relacionada à resistência ao calor na fase estacionária quando a célula encontra-se em crescimento aeróbio e também está envolvida no crescimento celular, estando envolvida na determinação do momento da mitose (YAGUCHI e TSURUGI, 2003). O nome Gts1 deriva de repetições dos

aminoácidos glicina, treonina e serina presentes na proteína, sendo descrita inicialmente por Mitsui e col. (1994) os quais relataram o envolvimento de Gts1 no crescimento celular. Quando o gene desta proteína é deletado as células de *S. cerevisiae* iniciam o processo de brotamento prematuramente, ocasionando a formação de células menores. Já quando ela é super expressa na célula, o brotamento é retardado e células anormalmente grandes são formadas, o que indica que Gts1 possui grande importância na sincronia do crescimento celular (MITSUI e col., 1994).

Yaguchi e colaboradores (1996) estudaram diferentes funções da proteína Gts1, tolerância à temperatura, esporulação e tempo de vida das células e se referem a Gts1 como uma proteína pleiotrófica, isto é com diferentes funções celulares. Foi constatado neste estudo que Gts1 possui função na resistência a choque térmico na fase estacionária de crescimento celular. Isso foi determinado através da comparação entre linhagens de *S. cerevisiae* Δ *gts1*, selvagem e uma linhagem que super expressa Gts1 e constatou-se que através da análise da taxa de crescimento após choque térmico de 50° C que a linhagem que super expressava Gts1 obteve uma maior taxa de crescimento quando comparado ao tipo selvagem e a Δ *gts1*. Neste mesmo estudo também se constatou que Gts1 possui uma influência sobre o processo de esporulação de *S. cerevisiae*, pois quando super expressa, aumenta a esporulação. Também foi relatada a influência na longevidade de *S. cerevisiae*, sendo que linhagens Δ *gts1* apresenta um tempo de vida inferior ao apresentado pela levedura selvagem e pela linhagem que super expressa Gts1 (YAGUCHI e col., 1996).

Adicionalmente, a proteína Gts1 também está envolvida na ativação da transcrição das proteínas Hsp104 e Tps1. Enquanto que Hsp104 possui atividade de chaperona, a função metabólica de Tps1 é restringir a quantidade de glicose que vai para a via glicolítica, assim esta proteína seria umas das responsáveis pela transição do metabolismo fermentativo para o metabolismo respiratório (XU e col., 2007). Os processos de ativação da transcrição de Tps1 ocorrem através de interações entre Gts1 e a proteína Snf1, a qual atua como um sensor metabólico em eucariotos, e regula diversas reações metabólicas dependendo do estado energético da célula (XU e col., 2007).

Coletivamente, os dados presentes na literatura apontam importantes funções de proteínas envolvidas em eventos como resistência a choque térmico, ativação de fatores de transcrição e controle do ciclo celular. Entretanto, estas interações foram detectadas somente por experimentos em larga escala e a confirmação cuidadosa

destas interações é bastante desejável uma vez que os processos relacionados possuem elevada importância biológica. Adicionalmente, estudos recentes demonstram interação direta de TPx, ou proteínas relacionadas (GPx), com fatores de transcrição e MAPK através de dissulfetos mistos transitórios (DELAUNAY e col., 2002; VEAL e col., 2004; IWAI e col., 2010). Cabe-se ressaltar que nos complexos detectados a substituição da Cys_R por um resíduo de Ser leva a estabilização dos complexos gerados e sugere que Cys_R seja necessária para a redução do dissulfeto misto entre TPx e seu alvo biológico. Entretanto, apesar da aparente importância de nTPx, nenhum estudo abordando este tipo de interação foi descrito na literatura até o momento.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo a confirmação de interações entre nTPx e as proteínas envolvidas na sinalização celular relacionadas a crescimento ou manutenção do silenciamento telomérico Mec3, Gts1, Pcl1 e Dog2, os quais foram observados por experimentos em escala proteômica. Também foi objetivo desta investigação constatar se as interações descritas são efetuadas através de dissulfetos mistos entre nTPx e os fatores supracitados. Dados da literatura apontam associações transitórias entre TPx e fatores de transcrição e MAPK que se tornam estáveis com a substituição de Cys_R. Desta forma foi gerado o mutante nTPx^{C112S} e expresso em sistemas heterólogos assim como as proteínas nTPx, Mec3, Gts1, Pcl1 e Dog2, visando ensaios de co-purificação após estresse oxidativo por peróxidos. A obtenção de complexos unidos por dissulfetos mistos poderia permitir experimentos de cristalização e determinação da estrutura 3D dos complexos, permitindo uma análise detalhada das interações moleculares. Também foi nosso objetivo utilizar construções em sistema duplo híbrido para avaliar *in vivo* se as interações ocorrem por meio de dissulfetos.

2.1 Objetivos Específicos

1) Clonagem, expressão e purificação de nTPx; 2) Obtenção, expressão e purificação do mutante nTPx^{C112S}; 3) Clonagem, expressão e purificação de Mec3, Gts1, Pcl1 e Dog2; 4) Co-purificação de nTPx/nTPx^{C112S} com Mec3, Gts1, Pcl1 e Dog2; 5) Identificação dos peptídeos envolvidos nas ligações através de espectrometria de massa; 6) Experimentos de duplo híbrido envolvendo nTPx/nTPx^{C112S} e Mec3, Gts1, Pcl1 e Dog2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Peptona, triptona, extrato de levedura, NaCl, ágar, etanol, isopropanol, ácido acético, glicose, brometo de etídeo, acrilamida, bisacrilamida, persulfato de amônia, TEMED, acetato de lítio, polietileno glicol 3350, dimetil sulfóxido, ampicilina, canamicina, IPTG, X-gal, X- α -gal foram adquiridos junto a Sigma e Merck. Enzimas de restrição, marcadores de peso molecular, agarose, *Taq* DNA polimerase, High Fidelity DNA polimerase, T4 DNA ligase, oligonucleotídeos, areobasidina, foram adquiridos junto a Invitrogen, GE Healthcare, Fermentas, New England BioLabs e Clontech.

3.2 Meios de Cultura e Linhagens de Bactérias e Leveduras

a) Meios de cultura para bactérias:

1- LB: 0,5% de NaCl, 0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona. Quando o meio foi utilizado para seleção de mutantes foram adicionado ampicilina a 100 μ g/ml + 2 μ g/ml de X-Gal.

2- SOC: 0,3% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose.

b) Meios de Cultura para Leveduras:

1- YPD: extrato de levedura 1%, triptona 2% e glicose 2%.

2- Meio Mínimo (SD) (-Leu/-Trip): 20 mg/l hemissulfato de adenina, 20mg/l de arginina HCl, 20mg/l de histidina monobásica HCl, 30mg/l de isoleucina, 30mg/l de lisina HCl, 20mg/l de metionina, 50mg/l de fenilalanina, 200 mg/l de treonina, 30mg/l de tirosina, 20mg/l de uracila, 150mg/l de valina, 0,17% de fonte básica de nitrogênio sem aminoácidos, 2% de glicose e 0,5% de (NH₄)₂SO₄.

*Os meios de cultura sólidos foram preparados adicionando-se ágar em uma concentração final de 2%.

c) Linhagens de *Escherichia coli*

1. *E. coli* DH5 α : F' - F' (Z80dlacZ_(lacZ)M15)_(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (r_k⁻,m_k)
2. *E. coli* BL21 (DE3): [F⁻, amp^r T, hsdS_b (r_B⁻ m_B⁻), gal, dcm (DE3)];
3. *E. coli* XL1Blue: (genótipo: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]).
4. *E. coli* Origami (DE3): Δ ara-leu7697 araD139 Δ lacX74 galE galK rpsL Δ phoAPvuIIphoR F'[lac + (lacIq)pro] gor522::Tn10 (Tetr) trxB::kan (DE3)
5. *E. coli* BL21 (DE3) C43: F⁻ ompT gal dcm hsdSB(rB- mB-)(DE3).

d) Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

1. *S. cerevisiae* BY4741: Mat α ; His3 Δ 1; Leu2 Δ 0; Met15 Δ 0;Ura3 Δ 0;
2. *S. cerevisiae* Y2HGold: MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2: GAL1_{UAS} - Gal1_{TATA}-His3, GAL2_{UAS} - Gal2_{TATA} - Ade2 URA3::MEL1_{UAS}-Mell_{TATA} AURI-C MEL1:
3. *S. cerevisiae* Y187: MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112,gal4 Δ , gal80 Δ , met⁻,URA3 : : GAL1_{UAS}- Gal1_{TATA}- LacZ, MEL1

e) Plasmídeos

1. Clonagem: pTZ57r/t (Fermentas);
2. Expressão: pET15b (Novagen);
3. Duplo Híbrido: pGADT7 e pGBKT7 (Clontech);

3.3 Extração de DNA genômico de *S. cerevisiae*

O DNA foi extraído da linhagem de *S. cerevisiae* BY 4641 pelo método do fenol/clorofórmio conforme AUSUBEL e colaboradores (1998).

3.4 Amplificação dos Genes por PCR

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados a partir de seqüências dos genes presentes nos bancos de dados específicos para *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>) e são apresentados na tabela 1. Para a clonagem direcional dos genes *nTPx*, *Dog2*, *Pcl1* e *Mec3* foram inseridas seqüências adaptadoras para as enzimas de restrição *Nde* I e *Bam* HI, já para o gene *Gts1* foram inseridos seqüências adaptadoras para as enzimas *Nde* I e *Xho* I, pois este gene possui um sítio para *Bam* HI no seu interior.

Tabela 1. Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos	Seqüência **
Específicos	
<i>nTPxF</i>	5' CGCGATCC <u>CATATG</u> ATGAGGTTTAGGAGTTCTTCCCATAGC 3'
<i>nTPxR</i>	5' CGCAAGCTTGGATCCGAAATGTAAAATTCAATCAGCTTG 3'
<i>MEC3F</i>	5' CGCGATCCATATGATGAAATTTAAAATTGATAGTAAATGG 3'
<i>MEC3R</i>	5' CGCAAGCTTGGATCC TTACAAGCCCTTCGATCTTGC 3'
<i>GTSIF</i>	5' CGCGATCCATATGATGGCGCCCATCTTTAGAAATTACC 3'
<i>GTSIR</i>	5' CGCAAGCTTGGATCCCTCAAGCTGATTGAATTTTACATTTCC 3'
<i>PCL1F</i>	5' CGCGATCCATATGATGTGTGAATACAGCAAGGCTC 3'
<i>PCL1R</i>	5' CGCAAGCTTGGATCCCTTAAAACCCATGTTGACTC 3'
<i>DOG2F</i>	5' CGCGATCCATATGATGCCACAATTTTCAGTAGATC 3'
<i>DOG2R</i>	5' CGCAAGCTTGGATCCCTTAATCTCTCGTCAAAGGG 3'
Mutagênicos	
<i>nTPx^{C112S}F</i>	5' TCTCCACCATCTTCTTTCAATGGG 3'
<i>nTPx^{C112S}R</i>	5' CCCATTGAAAGAAGATGGTGGAGA 3'
Seqüenciamento	
<i>T7 Promoter</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
<i>T7 Terminator</i>	5' TGCTAGTTATTGCTCAGGCGG 3'

*Os nucleotídeos sublinhados representam sítios de restrição. **Os nucleotídeos em vermelho representam os códons substituídos (Cys→Ser).

As reações de amplificação foram efetuadas em volume final de 50µl e consistiram em: 5µl de tampão sem magnésio (10×); 5µl MgCl₂ (25mM); 4µl DNPs (2,5mM); 5,0 µl DNA molde (100 ng/µl); 2,5µl iniciador direto (15 pmol); 2,5 µl

iniciador reverso (15 pmol); 0,5 µl *High Fidelity* DNA-polimerase (5U/µl) e 25,5µl H₂O Mili-Q. A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorff Mastercycle, sendo que o programa ótimo para a amplificação consistiu de desnaturação inicial de 4 minutos a 95° C seguido de 30 ciclos de: 15 seg/ 95°C, 15 seg/ 60°C e 1 mi/68°C. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e foram visualizados e foto documentados utilizando o transluminador UV acoplado ao documentador ImageQuant 150 (GE Healthcare).

3.5 Reação de ligação com pTZ57r/t

Após a reação de amplificação, as amostras foram purificadas em kit de purificação GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas), seguindo as orientações do fabricante e as reações de ligação com o plasmídeo pTZ57r/t foram realizadas na razão molar de 4:1, sendo adicionados 4 equivalentes de amplificado para 1 equivalente de vetor. Para um correto escalonamento da reação a concentração de inserto/plasmídeo foi calculada utilizando a seguinte fórmula.

$$\frac{\text{Vetor(ng)} \times \text{Tamanho do Fragmentos(kb)} \times \text{razão molar inserto : plasmídeo}}{\text{Tamanho do vetor (kb)}} = \text{ng de inserto}$$

As reações de ligação foram efetuadas em volume de 20 µl e consistiram: 2,0 µl tampão (10x); inserto (0,52 pMol de volume final); 0,5 µl DNA ligase (5 U/µl); 1µl plasmídeo pTZ57r/t (55 ng/µl) e H₂O Mili-Q para completar volume. As reações de ligação foram então incubadas a 22°C por uma hora e as amostras foram dialisadas por 30 minutos em membrana de diálise VSWP25 (Millipore).

3.6 Obtenção dos transformantes em *E.coli* DH5α

Bactérias *E. coli* DH5α eletrocompetentes foram preparadas conforme descrito por AUSUBEL e col. (1998). Em 40 µl de *E. coli* eletrocompetentes foram adicionados 5 µl (~25 ng) do plasmídeo pTZ57r ligado ao gene de interesse. A

eletroporação foi realizada em eletroporador Eppendorf 2550, utilizando cubetas de gap 0,2 mm. Posteriormente as bactérias foram cultivadas a 37°C/1h em meio SOC e em seguida as culturas foram plaqueadas em meio LB/ampicilina/X-gal. As placas foram acondicionadas a 37°C/16h. As colônias brancas foram isoladas e cultivadas em 5 ml de meio LB/ampicilina a 37°C/16hs/250rpm.

3.7 Mini preparação plasmidial

A metodologia utilizada para extração de todos os plasmídeos neste estudo foi à lise alcalina, descrita AUSUBEL e col., (1998).

3.8 Dupla digestão *Bam* HI e *Nde* I

Os plasmídeos pTZ57r ligados aos genes de interesse foram submetidos a reação de clivagem com as enzimas *Bam* HI e *Nde* I. Para a digestão utilizou-se de 1-10µg de DNA plasmidial. Apesar de muitas tentativas não foi possível a recuperação dos insertos após a digestão, então se optou pela digestão do produto de amplificação com *Bam* HI e *Nde* I e ligação direta do inserto no plasmídeo de expressão pET15b. A reação de digestão foi efetuada em volume final de 50µl consistindo de: 10µl de tampão (2×); 37 µl DNA amplificado (~20ng/µl); 2,5 µl *Bam* HI (5 U/µl); 2,5 µl *Nde* I (5U/µl) e 25,5 µl H₂O Mili-Q. Após esse procedimento os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,6% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e extraídos do gel com o auxílio de um bisturi estéril sob luz UV ($\lambda=365\text{nm}$). As amostras foram purificadas utilizando o kit de purificação GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. O produto da purificação foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e utilizando padrões com massas moleculares de concentrações conhecidas. As digestões foram utilizadas então para a ligação com o plasmídeo de expressão pET15b e plasmídeos de duplo híbrido (pGADT7 e pGBKT7).

3.9 Reação de ligação em pET15b

Após a reação de dupla digestão os genes foram ligados a plasmídeos de expressão pET15b gentilmente cedidos pela Dr. Karen Fulan Discola (USP/SP). A reação de ligação foi realizada na razão molar de 8:1, inserto/vetor, respectivamente. Para um correto escalonamento da reação a concentração de inserto/plasmídeo foi utilizada a fórmula apresentada para ligação dos genes com o plasmídeo pTZ57r/t. A reação foi realizada em volume de 20 μl e constituiu de: tampão 2,0 μl (1 \times); 1,0 μl plasmídeo pET15b (50 ng/ μl); inserto variável (~100ng); 0,5 μl DNA ligase (5 U/ μl) e H₂O Mili-Q para completar o volume. As reações de ligação foram então incubadas a 20°C/1h e dialisadas por 30 minutos em membrana de diálise VSWP25 (Millipore) e utilizados para transformar linhagens de *E. coli* DH5 α , conforme a metodologia apresentada previamente para pTZ57r. A seleção dos clones foi realizada em placas LB/ampicilina as colônias foram inoculadas em 5ml de meio LB/ampicilina e após crescimento (37°C/16hs/250rpm) à uma alíquota de 50 μl foi adicionado 50 μl de glicerol estéril ([] final 50 %) para preservação em biofreezer (-80°C). O restante da cultura foi utilizada para mini preparação plasmidial conforme descrito anteriormente.

3.10 Triagem dos transformantes

A triagem dos transformantes foi realizada por PCR. A reação de PCR utilizando como DNA molde o plasmídeo pET15b teve volume final de 10 μl e consistiu de: 1 μl de tampão sem magnésio (10 \times); 1 μl MgCl₂ (25mM); 1 μl DNPs (2,5mM); 1,0 μl DNA molde (100 ng/ μl); 0,5 μl iniciador direto (15 pmol); 0,5 μl iniciador reverso (15 pmol); 0,1 μl *Taq* DNA-polimerase (5U/ μl) e 4,9 μl H₂O Mili-Q. A reação foi realizada em termociclador Eppendorff Mastercycle, seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 15seg/95°C, 15seg/60°C e 2min/72°C.

3.11 Mutação sítio dirigida de nTPx

Após a confirmação por PCR da ligação entre pET15b/nTPx foi realizada a reação de mutação de nTPx do códon cisteína na posição 112. A mutação foi realizada por reação de PCR com iniciadores específicos que substituem o códon da cisteína (TGT) por serina (TCT), utilizando o Kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). O volume da reação de mutação foi de 50µl, sendo: 2,5 µl tampão (10 ×); 1 µl DNTPs (10 mM); 0,5µl iniciador direto (15 pmol); 0,5 µl iniciador reverso (15 pmol); 0,5 µl *PfuUltra* HF DNA polimerase (5 U/µl) e 3 µl plasmídeo pET15b/nTPx (50 ng).

Após a reação de amplificação a amostra foi submetida à digestão com 10 U da enzima *Dpn* I, para degradação dos plasmídeos originais metilados (sem a mutação) ou híbridos hemimetilados (contendo a mutação em somente uma das fitas) a 37°C/1h. Posteriormente os plasmídeos foram dialisados utilizando membrana de diálise VSWP25 (Millipore) e 5 µl foram utilizados para eletroporação de *E. coli* XL1 Blue, seguindo a metodologia apresentada anteriormente. Posteriormente as bactérias foram plaqueadas em meio LB/ampicilina e cultivadas a 37°C/16h. As colônias foram isoladas e cultivadas em meio LB/ampicilina a 37°C/16h/250rpm. Os plasmídeos foram isolados conforme descrito anteriormente e foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para verificar a integridade dos plasmídeos.

3.12 Sequenciamento dos plasmídeos

Os plasmídeos ligados aos genes *nTPx*, *Dog2*, *Pcl1*, *Mec3*, *Gts1* e *nTPx*^{C112S} foram extraídos por meio do método de hidrólise alcalina, amplificados conforme descritos anteriormente utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene e os produtos das amplificações foram utilizados em reações de sequenciamento. Para as reações de sequenciamento foi utilizado o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

A reação foi realizada em 10 μ l e consistiu de: 2 μ l Big Dye terminator; 1 μ l Tampão Big Dye; 1 μ l iniciador (T7 direto/reverso); 23 ng produto de PCR; água Milli-Q para completar o volume. A reação de sequenciamento foi realizada no termociclador *Mastercycle* (Eppendorf). O programa consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C/1min e 25 ciclos de 96°C/30secs, 50°C/5secs e 60°C/4min. Após a reação de sequenciamento foram adicionamos 15 μ l da reação (10 μ l da reação de sequenciamento + 5 μ l de água Milli-Q) na microplaca com SephadexTM G-50 Fine DNA Grade (GE Healthcare), as amostras foram centrifugadas por 5min/2100rpm e coletadas em microplacas. Em seguida, foram aquecidas a 95°C por 15 minutos para secagem, ressuspendidas e submetidas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP-SP (<http://genoma.ib.usp.br/>) em sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

3.13 Transformação em *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) C43 e Origami (DE3)

Linhagens de *E. coli* BL21(DE3), BL21 (DE3) C43 e Origami (DE3) eletrocompetentes foram preparadas segundo AUSUBEL e col. (1998). A transformação foi realizada por eletroporação conforme descrito anteriormente. Para a expressão das proteínas foram preparados 1 ml de pré-inóculo em meio LB contendo o antibiótico apropriado (levando em conta a linhagem e o plasmídeo utilizado). O pré-inóculo foi cultivado a 37°C/16h/250rpm. Posteriormente este foi inoculado em 50 ml de meio LB/antibiótico e incubado a 37°C/250rpm até atingir a DO₆₀₀ entre 0,6 - 0,8. Neste momento foram adicionados 1 mM de IPTG, para indução da expressão das proteínas, e as culturas então foram acondicionadas a 37°C/3h/250rpm. Logo após a indução as culturas foram transferidas para tubos de 50 ml e centrifugadas a 4°C/20min/3000rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspendidas em 25 ml de H₂O Milli-Q autoclavada e centrifugadas a 4°C/20min/3000rpm. O sobrenadante foi descartado e a cultura ressuspendida em 10 ml de H₂O Milli-Q autoclavada e centrifugada a 4°C/20min/3000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 20 ml de tampão fosfato (20 mM de fosfato de sódio,

0,15 M de NaCl, pH=7,4) contendo 10 mM de PMSF e 0,2 mM de azida sódica. O rompimento das células bacterianas foi realizado através de sonicação em sonicador Fisher Scientific Model 100 (30% de amplitude) e os ácidos nucléicos removidos por meio de tratamento com sulfato de streptomomicina ($[]_{\text{final}} = 1\%$) por 15 minutos em banho de gelo. Após este tratamento o produto de rompimento das células foi centrifugado a 4°C/20min/3000rpm. O sobrenadante e os precipitados foram coletados separadamente e uma alíquota da parte solúvel e uma da parte insolúvel foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, para verificar em qual das fases as proteínas estão sendo expressas. Para este procedimento a fase insolúvel foi ressuspendida em 1 ml de *craking buffer* (60 mM TrisCl pH 6.8, 1% (v/v) 2-mercaptoetanol, 1% (v/v) dodecil sulfato de sódio, 10%(v/v) glicerol e 0,01% (v/v) azul de bromofenol) e mantida a 100°C/5min. Após esse processo 10 µl da fase insolúvel e 10 µl da fase solúvel foram reduzidos com 500 mM DTT a 4°C/30min, fervidas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Para as proteínas nTPx e nTPx^{C112S} foram realizadas expressões em escala maior utilizando 500 ml de meio e 10 ml de pré inóculo.

3.14 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação das proteínas foi realizada através de cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC) em colunas His-trap (GE Healthcare) de volume 1 ml. Primeiramente a coluna foi lavada com 15 ml de H₂O Milli-Q seguida pelo carregamento da coluna com níquel através da passagem de 3 ml de NiSO₄ (0.1 M). Após estes procedimentos a coluna foi lavada com 5 ml de H₂O Milli-Q, seguido de 3 ml de Start Buffer (20 mM de fosfato de sódio, 0,15 M de NaCl e 50 mM de imidazol), em seguida foram aplicados 10 ml do extrato proteico seguido de alíquotas de 3 ml de soluções com concentrações crescentes de imidazol (100, 150, 200 e 500mM) até atingir a concentração final de 500 mM de imidazol. Neste processo foram recolhidas alíquotas de 1,5 ml em tubos eppendorf e 100 µl de cada alíquota foram utilizados para avaliar a presença de proteínas com o reagente de Bradford. Alíquotas de 10 µl foram reduzidas com DTT (500 mM de concentração final) e foram submetidas à

eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Após a padronização da purificação as proteínas foram purificadas em cromatógrafo ÄKTAPrime (GE Healthcare).

3.15 Ensaio de atividade de nTPx através da oxidação do DTT

Para determinar se a proteína nTPx expressa está possuindo atividade peroxidásica foi realizado um ensaio de atividade através da oxidação do DTT. Esse procedimento foi realizado conforme Iyer e Klee, 1973. As condições experimentais utilizadas foram: (Branco) 1mM de azida, 100 mM de DTPA, 10 mM de hepes, 10mM de DTT, 1mM de H₂O₂. (Reação) 1mM de azida, 100 mM de DTPA, 10 mM de hepes, 10mM de DTT, 1mM de H₂O₂ e 12,5 µM de nTPx. A oxidação do DTT foi monitorada espectrometricamente a 310nm.

3.16 Construção dos plasmídeos de duplo híbrido

Os plasmídeos pGADT7 e pGBKT7 (Clontech) foram eletroporados em DH5α para propagação conforme descrito anteriormente para os plasmídeos pET15b. A extração dos plasmídeos foi realizada através de método de preparação alcalina conforme SAMBROOK e RUSSELL, 2001.

3.17 Reação de digestão de pGADT7 e pGBKT7

Os plasmídeos pGADT7 e pGBKT7 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nde* I conforme descrito anteriormente para o plasmídeo pTZ57r. Para estes procedimentos foram utilizadas enzimas da empresa New England Biolabs. A reação foi realizada em volume de 50 µl e consistiu de: 5µl tampão (1x); 5µl plasmídeo (200ng); 2 µl *Bam* HI (20 U/µl); 1,5µl *Nde* I (20 U/µl) e 36,5 µl H₂O Mili-Q. Após a reação de dupla digestão os plasmídeos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,6% contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e extraído do gel com o auxílio de

um bisturi estéril sob luz UV (λ 365nm). As amostras foram purificadas utilizando kit de purificação GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos das purificações foram quantificados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e utilizando padrões com massas moleculares de concentrações conhecidas. A reação de ligação foi realizada na razão molar de 10:1, amplificado/vetor, respectivamente, seguindo a fórmula indicada anteriormente para as construções utilizadas para expressão das proteínas. O volume da reação foi de 20 μl e consistiu de: 2,0 μl tampão (1 \times); 5 μl inserto (20ng/ μl); 1 μl plasmídeo (50ng/ μl); 0,5 μl DNA ligase (5 U/ μL) e 11,5 μl H₂O Mili-Q.

A reação de ligação foi efetuada a 4°C/12hs e as amostras foram dialisadas por 30 minutos em membrana de diálise VSWP25 (Millipore) e utilizados para transformar linhagens de *E. coli* DH5 α , conforme a metodologia apresentada previamente. Após a seleção de clones em placas LB/antibiótico, as colônias foram inoculadas em 5 ml de meio LB/antibiótico e após crescimento (37°C/16h/250rpm) à uma alíquota de 50 μl foi adicionado 50 μl de glicerol estéril ([] final 50 %) e foi utilizada para preservação em biofreezer (-80° C). O restante da cultura foi utilizada para mini preparação plasmidial conforme descrito anteriormente nesta seção. Para a confirmação das ligações plasmídeos/inserto foram realizadas reações de digestão com a enzima *Nde* I. A reação foi realizada em 50 μl e consistiu de: 5 μl tampão (1x); 5 μl plasmídeo (200ng); 1,5 μl *Nde* I (20 U/ μl) e 38,5 μl H₂O Mili-Q. Também foi realizado o sequenciamento dos plasmídeos conforme descrito para os plasmídeos pET15b.

3.18 Preparo de células competentes de *S. cerevisiae*

Para obtenção de células competentes de *S. cerevisiae* as linhagens Y2HGold e Y187 foram inicialmente cultivados em placas de meio YPD ágar. Uma colônia foi então transferida para 10 ml de meio YPD e as culturas foram mantidas a 30°C/16h/250rpm. Após esse período as culturas foram transferidas para 200 ml de meio YPD e para adição da quantidade ideal de células foi adicionado pré inoculo até a cultura apresentar DO_{600nm} de 0,1. O inóculo foi então mantido a 30°C/250rpm até atingir DO_{600nm} de ~0,7. Em seguida as células foram transferidas para tubos de 50 ml e

centrifugadas a 4°C/15min/6000rpm. As células foram lavadas com 100 mM de solução de acetato de lítio (CH₃COOLi) (40 ml para cada 100 ml de cultura) e foram novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e novamente lavado com solução de 100 mM de acetato de lítio (20 ml para cada 100 ml de cultura) e centrifugado a 4°C/15min/6000rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução de CH₃COOLi 100mM com 15% de glicerol (0,03% do volume inicial). Então as células foram transferidas para tubos de 1,5 ml, congeladas a -80° C e mantidas a esta temperatura até o momento da transformação.

3.19 Transformação das linhagens de *S. cerevisiae*

A transformação das células de *S. cerevisiae* foi realizada conforme descrito no manual Yeastmaker Yeast Transformation (Clontech). Às células competentes de *S. cerevisiae* foram adicionados 200 ng de plasmídeo e gentilmente agitadas. Em seguida, foram adicionados 500 µl de solução PEG/CH₃COOLi (PEG 3350 40%, tampão TE 1× e CH₃COOLi a 100 mM). A cultura foi então incubada a 30° C/30min e em seguida foram adicionados 20 µl de DMSO e as células foram incubadas novamente a 42°C/15min. As células foram então centrifugadas por 15seg/2000rpm. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio YPD Plus (Clontech) e incubadas a 30°C/90min. Transcorrido esse período a cultura foi centrifugada por 15seg/12000rpm, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1ml de solução de NaCl 0,9%. Foram feitas então diluições seriadas de 1/10, 1/100 e 100 µl das culturas foram plaqueadas em meio SD/Leu⁻ (linhagens Y187) e SD/Trp⁻ (linhagens Y2HGold). As placas foram incubadas a 30° C por cerca de três dias, até o aparecimento de colônias.

3.20 Cruzamento das Linhagens Y2HGold e Y187

Para a obtenção de células de *S. cerevisiae* contendo os plasmídeos isca e presa na mesma célula foram seguidas as instruções do Matchmaker Gold Two-Hybrid

System (Clontech). Colônias de ambas as linhagens de *S. cerevisiae*, Y2HGold e Y187, contendo os plasmídeos isca e presa foram inoculadas em 2 ml de meio YPDA 2 × (Clontech) e incubadas a 30°C/250rpm/24h. Após o período de 20h foram coletadas amostras das culturas e observadas em microscópio óptico no aumento de 40 × para verificar se havia a formação de células diplóides. Após a formação de diplóides as culturas foram diluídas para 1:10 e 1:100 e plaqueadas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻ para seleção de células contendo os dois plasmídeos.

3.21 Confirmação da interação entre as proteínas

Para determinar a existência de interação entre as proteínas as colônias que cresceram em meio SD/Leu⁻/Trp⁻ foram transferidas para meio SD/Leu⁻/Trp⁻ contendo 40µg/ml de X-α-Gal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2 Extração do DNA genômico de *S. cerevisiae*

A extração do DNA genômico da levedura *S. cerevisiae* foi realizado conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Utilizou-se neste procedimento a linhagem de levedura *S. cerevisiae* BY4741 pertencente ao banco de cepas de levedura de nosso laboratório (Figura 5). A determinação da concentração do DNA genômico foi realizada por análise de intensidade do brilho em gel de agarose através de comparação com fragmentos de DNA de concentração conhecida. O rendimento médio foi de 80 ng/ μ l e os DNAs genômicos obtidos por esta metodologia foram utilizados para a amplificação dos genes que codificam as proteínas nTPx, Mec3, Pcl1, Dog2 e Gts1.

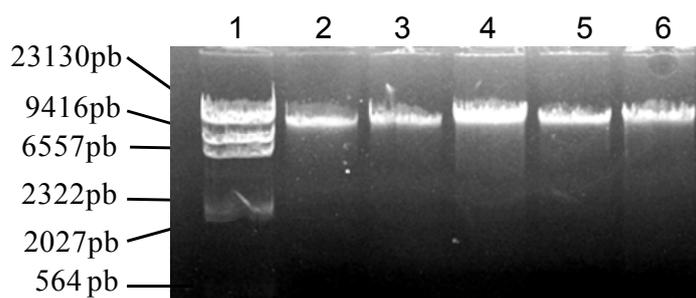


Figura 5. Resultado da extração de DNA genômico de *S. cerevisiae*. Resultado de eletroforese em gel de agarose 0,8 % em TAE 1 \times contendo os resultados da extração de DNA de *S. cerevisiae*. As lanes 2 a 6 representam diferentes amostras. Na lane 1 foi aplicado o marcador de peso molecular λ /*Hind* III (1 μ g) (Fermentas).

4.3 Amplificação dos Genes

A reação de amplificação nas etapas de padronização foi efetuada utilizando *Taq* DNA polimerase conforme descrito na seção Materiais e Métodos. Analisando as temperaturas de hibridização dos oligonucleotídeos para os genes de *nTPx*, *Mec3*, *Pcl1*, *Dog2* e *Gts1* foi concluído que teoricamente a hibridização ideal aconteceria entre as temperaturas de 50°C e 60°C. Foram testadas diferentes temperaturas de hibridização dos iniciadores. Temperaturas entre 50 - 55°C não

apresentaram resultados satisfatórios. Uma possível razão para isto é o fato de que os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação pudessem estar formando estruturas secundárias em virtude de seu tamanho acentuado (34 - 40 bases) em decorrência da necessidade de adaptadores contendo sítio de restrição para a clonagem direcional.

Adicionalmente, temperaturas de hibridização acima de 60°C também não resultaram em uma amplificação adequada para nenhum dos genes envolvidos neste trabalho (dados não apresentados). Curiosamente, apesar dos oligonucleotídeos específicos para cada gene apresentarem diferentes temperaturas de hibridização, o melhor resultado para todos eles foi obtido utilizando temperatura de 60°C (Figura 6). Como mencionado anteriormente, para os ensaios iniciais de padronização foi utilizada a enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas) e para amplificações utilizadas para a inserção nos plasmídeos foi utilizada a enzima *High Fidelity* DNA polimerase (Fermentas). A escolha desta enzima se deve a baixa ocorrência de mutações durante o processo de amplificação quando comparada a polimerase de *Thermus aquaticus*.

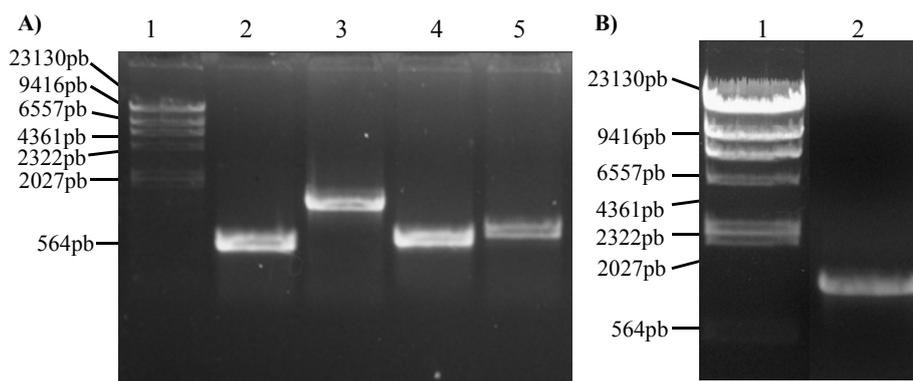


Figura 6. Resultado da amplificação dos genes *nTPx*, *Mec3*, *Dog2*, *Pcl1* e *Gts1*. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1 % em TAE 1× contendo os resultados de reações em cadeia da polimerase com temperatura de hibridização a 60°C. **A)** *nTPx* (lane 2), *Mec3* (lane 3), *Dog2* (lane 4) e *Pcl1* (lane5). **B)** *Gts1* (lane2). Na lane 1 de **A** e **B** foi aplicado o marcador de peso molecular λ /*Hind* III (1 μ g) (Fermentas).

4.4 Ligação dos genes em pTZ57r/t

Após a amplificação as amostras foram purificadas e foram efetuados testes de clonagem no plasmídeo pTZ57r/t (Fermentas). Os amplificados foram ligados ao plasmídeo como apresentado na seção Materiais e Métodos e utilizados para

transformar linhagens em *E. coli* DH5 α eletrocompetentes. Os transformantes que continham o plasmídeo foram selecionados através de resistência a ampicilina e os plasmídeos que continham os genes de interesse foram selecionados através da capacidade de degradação de X-gal. Após a seleção das supostas bactérias transformantes para os genes de interesse, as mesmas foram cultivadas em meio líquido e os plasmídeos foram extraídos através da técnica de lise alcalina.

A confirmação dos transformantes foi realizada através da técnica de PCR, utilizando como DNA molde da reação os plasmídeos dos supostos transformantes para os genes. Após a triagem dos mutantes por PCR, foram realizadas novas preparações plasmidiais para realização da reação de dupla restrição com as enzimas *Bam* HI e *Nde* I e posterior ligação ao plasmídeo de expressão pET15b. Nesta etapa do trabalho não se obteve sucesso uma vez que não foi possível realizar a reação de dupla restrição. Por motivos desconhecidos sempre ocorreu efeito *star* nas amostras ou não ocorria digestão. Efeito *star* se refere a digestões inespecíficas das enzimas de restrição, as quais ocorrem quando a enzima reconhece e cliva locais inespecíficos do DNA. Foram feitas diversas tentativas de dupla digestão do plasmídeo pTZ57r em diferentes condições, com tempos de reação variando entre 15min e 2hs e diferentes lotes e fornecedores de enzimas de restrição. Entretanto, nenhuma condição se revelou satisfatória, não sendo possível a recuperação dos genes clonados para posterior ligação no plasmídeo de expressão pET15b.

4.5 Ligação dos genes *nTPx* e *Dog2* em pET15b

Uma vez que a dupla digestão do plasmídeo pTZ57r-*nTPx* e pTZ57r-*Dog2* não foi possível, optou-se pela ligação direta a partir do produto de PCR dos genes de *nTPx* e *Dog2* no plasmídeo de expressão pET15b. Desta forma, foi realizada a digestão do amplificado de *nTPx* com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nde* I. Inicialmente foi estabelecido o tempo ideal da reação de restrição de 200ng de amplificado. A figura 7 representa os tempos testados, demonstrando que em nenhum dos tempos foi constatada a degradação do inserto, indicando que o tempo de 2 horas de digestão poderia ser aplicado.

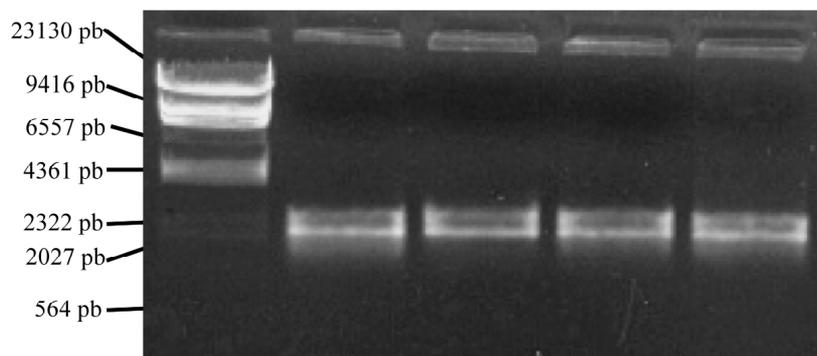


Figura 7. Resultado de dupla digestão de produto de PCR *nTPx* com *Bam* HI e *Nde* I por diferentes períodos de tempo. Resultado de eletroforese em gel de agarose para determinação do tempo de digestão de produtos de PCR de *nTPx*. As *lanes* 2, 3, 4 e 5 representam diferentes tempos de reação (15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente). Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular λ /*Hind* III (1 μ g) (Fermentas).

Após a padronização do tempo de reação, os amplificadores dos genes *nTPx* e *Dog2* foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nde* I por duas horas e o produto da digestão foi ligado ao plasmídeo pET15b, previamente digerido com *Bam* HI e *Nde* I. Os plasmídeos ligados aos insertos foram utilizados para transformar linhagens de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes, e as células foram plaqueadas em meio LB/ampicilina para seleção dos transformantes. Colônias selecionadas foram inoculadas em meio LB/ampicilina líquido e os plasmídeos extraídos. Para a confirmação da presença dos genes de *nTx* e *Dog2* no plasmídeo pET15b foi realizada triagem dos mutantes por PCR. As reações foram realizadas conforme apresentado na seção Materiais e Métodos. Após a constatação da digestão e ligação direta de *nTPx* e *Dog2* no plasmídeo de expressão pET15b, o mesmo processo foi utilizado para os genes *Mec3*, *Pcl1* e *Gts1*. Para a confirmação da integridade dos genes, os plasmídeos pET15b-*nTPx*, pET15b-*Dog2*, pET15b-*Mec3*, pET15b-*Pcl1* e pET15b-*Gts1*, foram seqüenciados e os produtos submetidos a análise. A figura 8 representa a análise de trechos dos sequenciamentos através de alinhamento utilizando o programa BlastX.

A) [gb|EQA74752.1](#) Dog2p [*Saccharomyces cerevisiae* AWRI796]
 Length=193

Score = 273 bits (698), Expect = 8e-92
 Identities = 146/147 (99%), Positives = 147/147 (100%), Gaps = 0/147 (0%)
 Frame = +1

```

Query 109 VDTETQKKLPERKWAIVTSGSPYLAFSWFETILKNVGGKPKVFITGFDVKNGKPDPEGYSR 288
          VDTETQKKLPERKWAIVTSGSPYLAFSWFETILKNVGGKPKVFITGFDVKNGKPDPEGYSR
Sbjct 47  VDTETQKKLPERKWAIVTSGSPYLAFSWFETILKNVGGKPKVFITGFDVKNGKPDPEGYSR 106

Query 289 ArdlLrqdlqLTGKQDLKYVVFEDAPMGIKAGKAMGAIITVGITSSYDKSVLFDAGADYVV 468
          ARDLRQDLQLTGKQDLKYVVFEDAP+GIKAGKAMGAIITVGITSSYDKSVLFDAGADYVV
Sbjct 107 ARDLRQDLQLTGKQDLKYVVFEDAPVGIKAGKAMGAIITVGITSSYDKSVLFDAGADYVV 166

Query 469 CDLTQVSVVKNMENGIVIQVNNPLTRD 549
          CDLTQVSVVKNMENGIVIQVNNPLTRD
Sbjct 167 CDLTQVSVVKNMENGIVIQVNNPLTRD 193
  
```

B) [gb|EEU05085.1](#) Mec3p [*Saccharomyces cerevisiae* JAY291]
 Length=474

Score = 291 bits (746), Expect = 6e-95
 Identities = 178/178 (100%), Positives = 178/178 (100%), Gaps = 0/178 (0%)
 Frame = +2

```

Query 110 MKLKLIVNGCEAPDDYKLLRITINTVASLRKTAILRFNSERLIIISTPKSSLNSSNNGTII 289
          MKLKLIVNGCEAPDDYKLLRITINTVASLRKTAILRFNSERLIIISTPKSSLNSSNNGTII
Sbjct 1  MKLKLIVNGCEAPDDYKLLRITINTVASLRKTAILRFNSERLIIISTPKSSLNSSNNGTII 60

Query 290 LRGDGQLWCTIPHDVFRLYTVISARELNTITMECNCDLSLVSFKRYDRVMNQSSSNMT 469
          LRGDGQLWCTIPHDVFRLYTVISARELNTITMECNCDLSLVSFKRYDRVMNQSSSNMT
Sbjct 61 LRGDGQLWCTIPHDVFRLYTVISARELNTITMECNCDLSLVSFKRYDRVMNQSSSNMT 120

Query 470 IKLQSMPEWNTNNGTILSGGTAGGVDITSKPNPICALGITFEEIVHTSGPNDAIVMNGG 643
          IKLQSMPEWNTNNGTILSGGTAGGVDITSKPNPICALGITFEEIVHTSGPNDAIVMNGG
Sbjct 121 IKLQSMPEWNTNNGTILSGGTAGGVDITSKPNPICALGITFEEIVHTSGPNDAIVMNGG 178
  
```

C) [GENE ID: 854805 DOT5](#) | Dot5p [*Saccharomyces cerevisiae* S288c]
 (Over 10 PubMed links)

Score = 366 bits (940), Expect = 1e-127
 Identities = 200/200 (100%), Positives = 200/200 (100%), Gaps = 0/200 (0%)
 Frame = +3

```

Query 117 GEALRRSTRIAI SKRMLEEEESKLAPISTPEVPKKKIKITGPKHMANQAVVQEANRSSDVM 296
          GEALRRSTRIAI SKRMLEEEESKLAPISTPEVPKKKIKITGPKHMANQAVVQEANRSSDVM
Sbjct 2  GEALRRSTRIAI SKRMLEEEESKLAPISTPEVPKKKIKITGPKHMANQAVVQEANRSSDVM 61

Query 297 ELEIGDPIPDL SLLNEDNDSISLKKITENMRVVVFFVYPRASTPGCTRQACGFRDNYQEL 476
          ELEIGDPIPDL SLLNEDNDSISLKKITENMRVVVFFVYPRASTPGCTRQACGFRDNYQEL
Sbjct 62 ELEIGDPIPDL SLLNEDNDSISLKKITENMRVVVFFVYPRASTPGCTRQACGFRDNYQEL 121

Query 477 KKYAAVFGLSADSVTSQKKFQSKQNLPHYLLSDPKREFIGLLGAKKTPLSGSIRSHFIFV 656
          KKYAAVFGLSADSVTSQKKFQSKQNLPHYLLSDPKREFIGLLGAKKTPLSGSIRSHFIFV
Sbjct 122 KKYAAVFGLSADSVTSQKKFQSKQNLPHYLLSDPKREFIGLLGAKKTPLSGSIRSHFIFV 181

Query 657 DGKLFKRVKISPEVSVNDA 716
          DGKLFKRVKISPEVSVNDA
Sbjct 182 DGKLFKRVKISPEVSVNDA 201
  
```

D) > [emb|CAY82322.1|](#) Pcl1p [*Saccharomyces cerevisiae* EC1118]
Length=279

Score = 288 bits (736), Expect = 2e-97
Identities = 140/140 (100%), Positives = 140/140 (100%), Gaps = 0/140 (0%)
Frame = +1

```

Query 1  MCEYSKALHILLKSPVTDI IKFLTDTTLRVVPSSNYPTPPGSPGEKHLTRLPSLMTFIT 180
          MCEYSKALHILLKSPVTDI IKFLTDTTLRVVPSSNYPTPPGSPGEKHLTRLPSLMTFIT
Sbjct 1  MCEYSKALHILLKSPVTDI IKFLTDTTLRVVPSSNYPTPPGSPGEKHLTRLPSLMTFIT 60

Query 181 RLVRTYNVYPTLLTAACYLNKLRILPRDATGLPSTIHRIFLACLILSAKFHNDSSPLN 360
          RLVRTYNVYPTLLTAACYLNKLRILPRDATGLPSTIHRIFLACLILSAKFHNDSSPLN
Sbjct 61  RLVRTYNVYPTLLTAACYLNKLRILPRDATGLPSTIHRIFLACLILSAKFHNDSSPLN 120

Query 361 KHWAREYTDGLFTLEDINLME 420
          KHWAREYTDGLFTLEDINLME
Sbjct 121 KHWAREYTDGLFTLEDINLME 140

```

E) > [gb|E08881.1|](#) Gts1p [*Saccharomyces cerevisiae* VL3]
Length=239

Score = 352 bits (902), Expect = 8e-123
Identities = 165/166 (99%), Positives = 166/166 (100%), Gaps = 0/166 (0%)
Frame = +1

```

Query 1  MRFRSSSHSLKHVDRELKELINSSSENANKCGECGNFYPTWCSVNLGVFLCGRCASVHRKV 180
          MRFRSSSHSLKHVDRELK+LINSSSENANKCGECGNFYPTWCSVNLGVFLCGRCASVHRKV
Sbjct 1  MRFRSSSHSLKHVDRELKDLINSSSENANKCGECGNFYPTWCSVNLGVFLCGRCASVHRKV 60

Query 181 FGSRDDDAFSNVKSLSMRWTREDIDELVSLGGNKGNA RFWNPKNVFPFDGDDDKAIVE 360
          FGSRDDDAFSNVKSLSMRWTREDIDELVSLGGNKGNA RFWNPKNVFPFDGDDDKAIVE
Sbjct 61  FGSRDDDAFSNVKSLSMRWTREDIDELVSLGGNKGNA RFWNPKNVFPFDGDDDKAIVE 120

Query 361 HYIRDKYILGKFRYDEIKPEDFGSRMDDFDGESDRFDERNRSRSRS 498
          HYIRDKYILGKFRYDEIKPEDFGSRMDDFDGESDRFDERNRSRSRS
Sbjct 121 HYIRDKYILGKFRYDEIKPEDFGSRMDDFDGESDRFDERNRSRSRS 166

```

Figura 8. Alinhamento dos sequenciamentos dos genes *Dog2*, *nTPx*, *Mec3*, *Pcl1* e *Gts1* ligados ao plasmídeo pET15b. A) Representa o alinhamento do gene *Dog2*, B) *Mec3*, C) *nTPx*, D) *Pcl1* e E) *Gts1*. Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa BlastX. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastX>). No banco de dados de genes utilizado pelo programa BlastX a proteína nTPx está anotada como Dot5.

4.6 Expressão das Proteínas nTPx e Dog2

Após a confirmação da integridade das construções, os plasmídeos pET15b-*nTPx* e pET15b-*Dog2* foram utilizados para transformar a linhagem de expressão *E. coli* BL21 (DE3) conforme descrito na seção Materiais e Métodos e foram realizadas a primeiras tentativas de expressão. Inicialmente a indução foi realizada adicionando-se ao meio IPTG na concentração final de 1 mM e as bactérias foram mantidas a 37°C/3h/250rpm. A figura 9 mostra o resultado típico de experimentos de expressão utilizando as condições descritas acima. É possível constatar que não houve a superexpressão das proteínas, que possuem ~29 kDa (*nTPx*) e ~32 kDa (*Dog2*). As amostras aplicadas correspondem à fração solúvel do extrato proteico total.

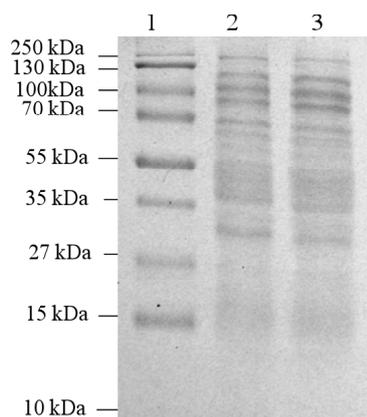


Figura 9. Teste de expressão das proteínas nTPx e Dog2. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue*, contendo o produto de procedimentos para expressão de nTPx (*lane 2*) e Dog2 (*lane 3*) utilizando os parâmetros: 37°C/3hs/1mM IPTG em linhagens de *E. coli* BL21 (DE3). Na *lane 1* foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final).

Com o intuito de promover a expressão das proteínas, novas tentativas de expressão foram realizadas, onde se optou pela diminuição da concentração do IPTG (0,3 mM), a temperatura foi reduzida para 20°C e aumentou-se para 16 horas o tempo de indução. Esta estratégia tem por objetivo diminuir a velocidade de expressão, o que pode resultar no enovelamento adequado da proteína, aumentando assim a sua solubilidade. A figura 10 mostra o resultado da SDS-PAGE da tentativa de expressão de nTPx e Dog2 (figura 10, *lanes 2 e 3* respectivamente). Foram também submetidas à eletroforese amostras da fase insolúvel do extrato protéico, pois havia a possibilidade das proteínas apresentarem-se insolúveis (figura 10, *lanes 4 e 5* respectivamente). Mas o resultado da eletroforese demonstra que as proteínas também não foram expressas nessas condições nem na fração insolúvel do extrato proteico total.

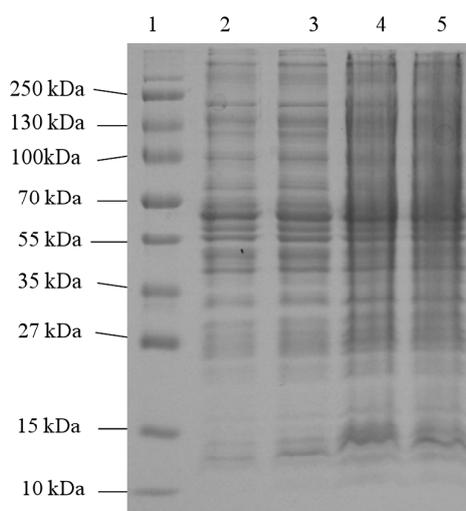


Figura 10. Teste de expressão das proteínas nTPx e Dog2 a 20°C. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue* contendo alíquotas das frações solúveis dos resultados dos procedimentos para expressão de nTPx (*lane 2*) e Dog2 (*lane 3*) utilizando os parâmetros:

20°C/16hs/0,3mM IPTG em linhagens de *E. coli* BL21 (DE3). Nas *lanes* 4 e 5 foram aplicadas as frações insolúveis para nTPx e Dog2, respectivamente. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final/30min/RT).

Após a constatação que as proteínas não estavam sendo expressas ou estavam sendo expressas em quantidades muito reduzidas optou-se pela tentativa de utilização da linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) C43. Essa linhagem foi isolada de BL21 (DE3) e apresenta resistência a proteínas tóxicas (MIROUX e WALKER, 1996). Os plasmídeos pET15b-nTPx e pET15b-Dog2 foram utilizados para transformar a linhagem de BL21 (DE3) C43 conforme descrito na seção Materiais e Métodos e a expressão foi realizada a 37°C/250rpm/3h com 1 mM de IPTG. Podemos constatar através da figura 11 que a proteína nTPx foi expressa em uma quantidade considerável, por outro lado a proteína Dog2 não apresentou expressão.

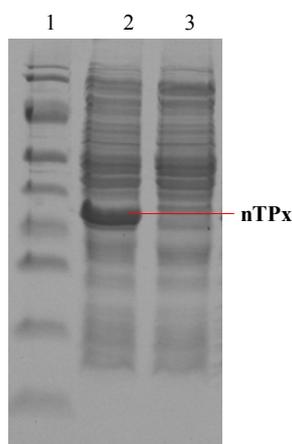


Figura 11. Expressão de nTPx e Dog2 em BL21 (DE3) C43. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue*. Resultado de procedimento de expressão utilizando os parâmetros 37°C/3hs/1mM de IPTG das proteínas nTPx (*lane* 2) e Dog 2 (*lane* 3) em linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) C43. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final//30min/RT).

Após a expressão de nTPx foi realizada a purificação da amostra conforme descrito na seção Materiais e Métodos (figura 12). Analisando a eletroforese pode-se constatar que foi possível purificar a proteína nTPx, mas a maior quantidade de proteína pura eluiu com uma concentração de imidazol de 150 mM. Testes de purificação de nTPx foram realizados em cromatógrafo ÄKTA Prime (GE Healthcare) e foram obtidos ótimos resultados alcançando rendimento de ~10mg por litro de cultura com alto grau de pureza.

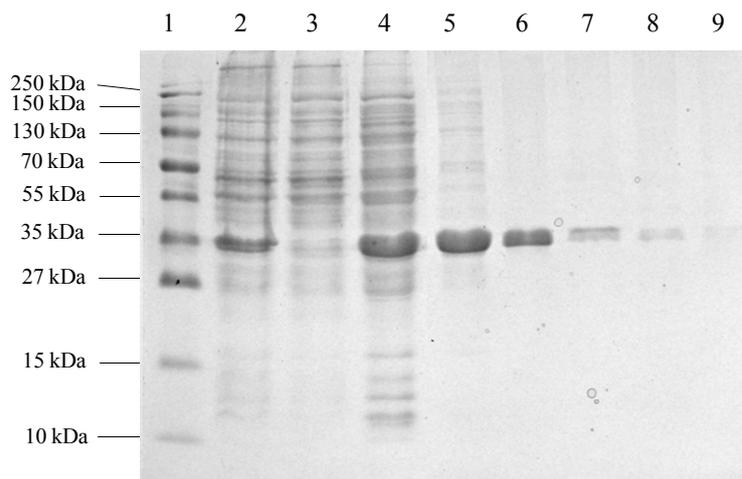


Figura 12. Purificação de nTPx por meio de cromatografia de afinidade. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo o resultado da purificação de nTPx através de IMAC em gradiente de imidazol. Na *lane* 2 foi aplicado o extrato protéico total. As *lanes* 3-9 representam as amostras coletadas com diferentes concentrações de imidazol: 100mM (*lanes* 3 e 4), 150mM (*lanes* 5 e 6), 200mM (*lanes* 7) e 500mM (*lanes* 8 e 9). Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final//30min/RT).

4.7 Ensaio de atividade de nTPx através da oxidação do DTT

Para a determinação da atividade de nTPx foi realizado um ensaio de oxidação do DTT, este experimento, avalia de forma indireta se a proteína expressa estava sendo enovelada corretamente, uma vez que a atividade enzimática depende do correto enovelamento. A figura 13 representa o resultado deste ensaio.

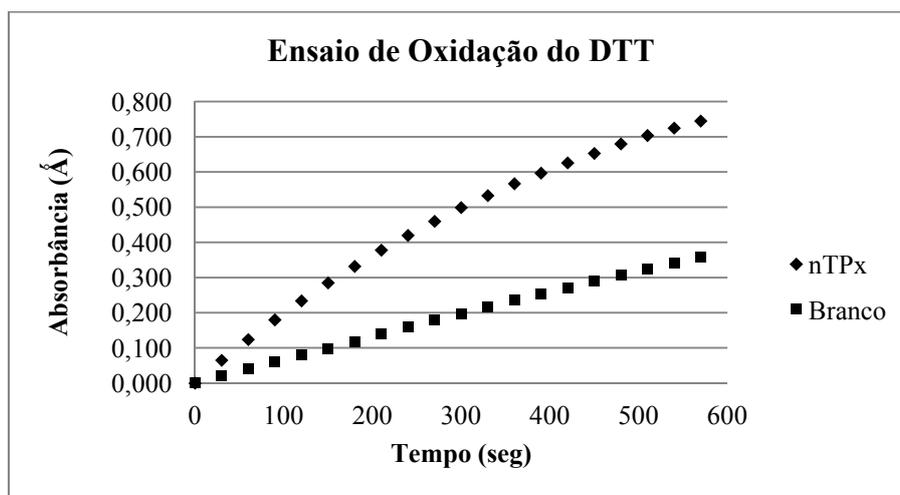


Figura 13. Avaliação da decomposição de peróxido de hidrogênio por meio da oxidação do DTT. Os gráficos representam o ensaio utilizando peróxido de hidrogênio. Os ♦ apresentam a reação contendo a

proteína nTPx e os ▪ representam o branco da reação, sem a presença de proteína. O eixo X representa o tempo (seg) e o eixo Y representa a absorbância (Å).

Através do ensaio de oxidação do DTT foi possível constatar que a proteína nTPx expressa neste estudo possui atividade peroxidásica. No experimento realizado o DTT substitui o sistema redutor de nTPx sendo capaz de regenerar sua forma reduzida. Como pode ser observado na figura o DTT também possui a capacidade de degradação de H₂O₂, mas sua atividade é menor que a apresentada por proteínas antioxidantes. O DTT reage com cisteínas oxidadas de proteínas regenerando sua forma reduzida, ao reagir esta molécula forma um dissulfeto e fica cíclica, o qual absorve a 310nm.

4.8 Mutação Sítio Dirigida de nTPx

Com o intuito da realização dos experimentos de análise de interações por dissulfeto foi realizada uma mutação sítio específica para a substituição da cisteína da posição 112 da proteína nTPx por uma serina. Este experimento foi realizado conforme descrito na seção Materiais e Métodos, os plasmídeos foram propagados em *E. coli* XL1 Blue, extraídos por lise alcalina e submetidos a sequenciamento, o resultado deste procedimento é apresentado na figura 14.

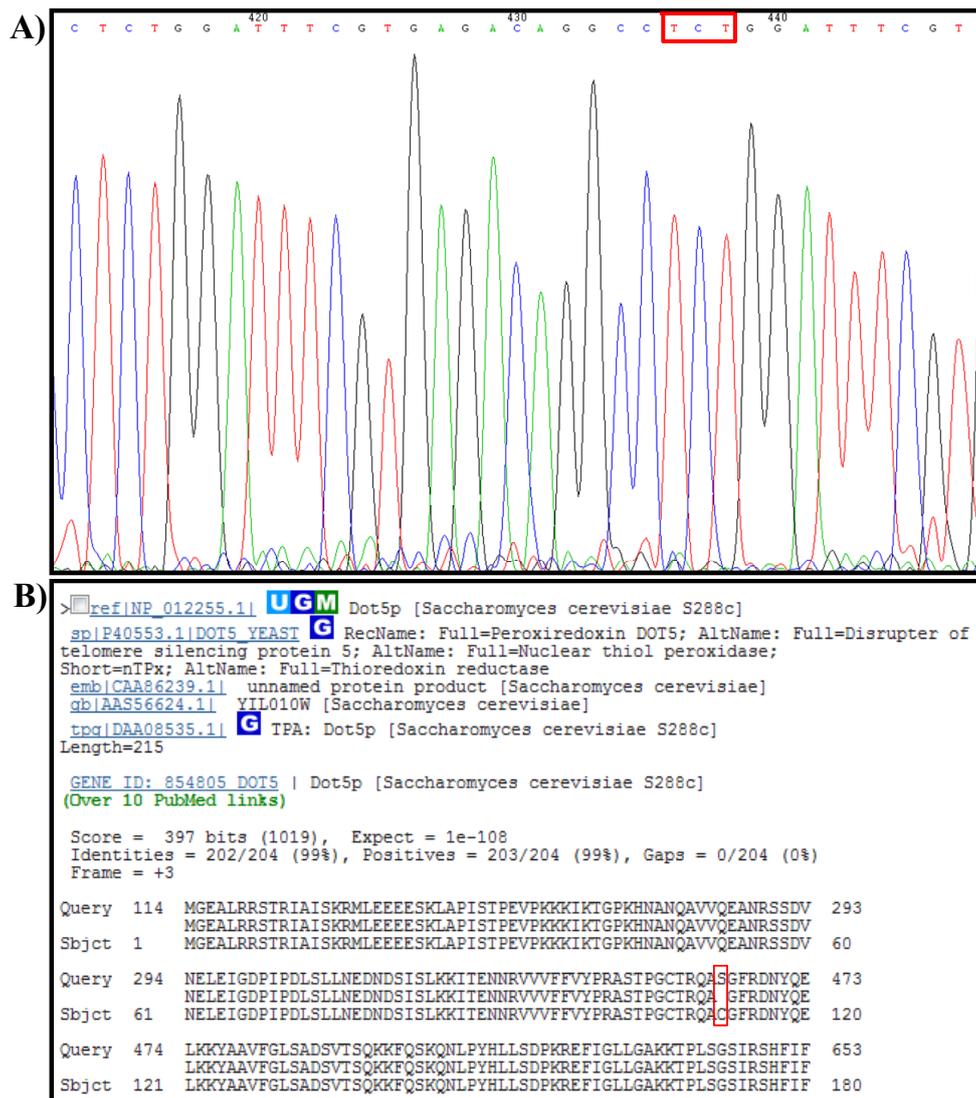


Figura 14. Resultado de seqüenciamento e análise do plasmídeo pET15b-nTPx^{C112S}. Resultado do seqüenciamento do plasmídeo pET15b-nTPx^{C112S} utilizando primer T7 promoter (forward). **A)** Eletroferograma gerado com a utilização do programa Chromas (www.technelysium.com.au/chromas.html). O quadro em vermelho no eletroferograma indica a substituição do códon TGT que codifica o aminoácido cisteína pelo códon TCT que codifica o aminoácido serina. **B)** Alinhamento de seqüenciamento de plasmídeo pET15b-nTPx^{C112S} utilizando o programa BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastX>). No banco de dados utilizado pelo programa BlastX a proteína nTPx está anotada como Dot5.

Após a confirmação da mutação foram realizados os primeiros experimentos de expressão da proteína nTPx^{C112S}. Como para a proteína nTPx foi obtido resultado positivo de expressão na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) C43, esta mesma linhagem foi testada para a expressão da proteína nTPx^{C112S}. A expressão foi realizada a 37°C/3hs, e a indução foi realizada com 1 mM de IPTG. A figura 15 representa a expressão e purificação da proteína nTPx^{C112S}, pode-se constatar pelo resultado que a proteína foi expressa em uma quantidade muito significativa e eluindo majoritariamente nas frações de 500mM de imidazol. Experimentos de purificação

foram realizados em ÄKTA Prime (GE Healthcare) e foram conseguidos bons resultados, com rendimento de aproximadamente 8 mg/L.

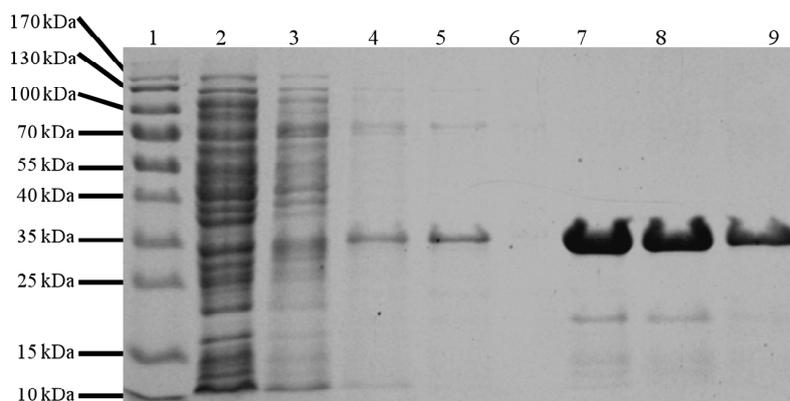


Figura 15. Resultado dos procedimentos de purificação de nTPx^{C112S}. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo o resultado da purificação de nTPx^{C112S} através de IMAC por gradiente de imidazol. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). *Lane* 2 contém o eluído proteico em concentração 100 mM, *lanes* 3 e 4 concentração de 150mM, *lanes* 5 e 6 concentração de 200mM e a *Lanes* 7, 8 e 9 concentração de 500mM de imidazol. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final/30min/RT).

4.9 Experimentos de Expressão das Proteínas Mec3, Dog2, Pcl1 e Gts1

Os primeiros experimentos de expressão das proteínas Mec3 (~57,5 kDa) e Pcl1 (~36,8kDa) foram realizados em *E. coli* BL21 (DE3), também foram realizados novos experimentos de expressão de Dog2 (~31,8 kDa) (as massas estimadas levam em conta a presença da cauda de histidinas a qual é inserida quando as proteínas são expressas utilizando o vetor pET15b). As condições de expressão testadas inicialmente foram de 37°C por 3 horas e a indução foi promovida pela adição de 1 mM de IPTG. A figura 16 demonstra o resultado da tentativa de expressão das proteínas. A análise da eletroforese indica que não houve expressão das proteínas, nem na fase solúvel e nem na fase insolúvel do extrato proteico.

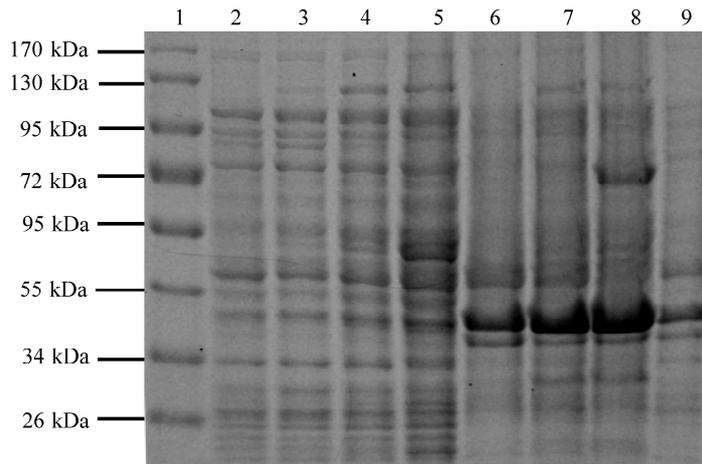


Figura 16. Resultado de indução da expressão das proteínas Dog2, Mec3 e Pcl1 em BL21(DE3). Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue*. Na lane 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas), seguida das frações solúveis da expressão a 37°C das proteínas Dog2 (*Lane 3*), Mec3 (*Lane 4*), Pcl1 (*Lane 5*) e frações insolúveis de Dog2 (*Lane 6*), Mec3 (*Lane 7*), Pcl1 (*lane 8*). As lanes 2 (fração solúvel) e 9 (fração insolúvel) representam o controle de expressão realizado com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) sem plasmídeos. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final/30min/RT).

Foram também realizados experimentos de purificação das proteínas através de cromatografia de afinidade por metais imobilizados (IMAC), uma vez que as proteínas poderiam estar sendo expressas em quantidades diminutas, o que poderia dificultar sua detecção no extrato proteico total. Para tanto, após a purificação por IMAC as alíquotas coletadas no gradiente de imidazol foram concentradas 40 ×, com o objetivo de detectar baixas quantidades de proteínas recombinantes expressas. A figura 17 representa os resultados das purificações, confirmando assim que não foi possível com a utilização da linhagem de *E. coli* BL21 (DE3), a expressão das proteínas Pcl1, Dog2 e Mec3.

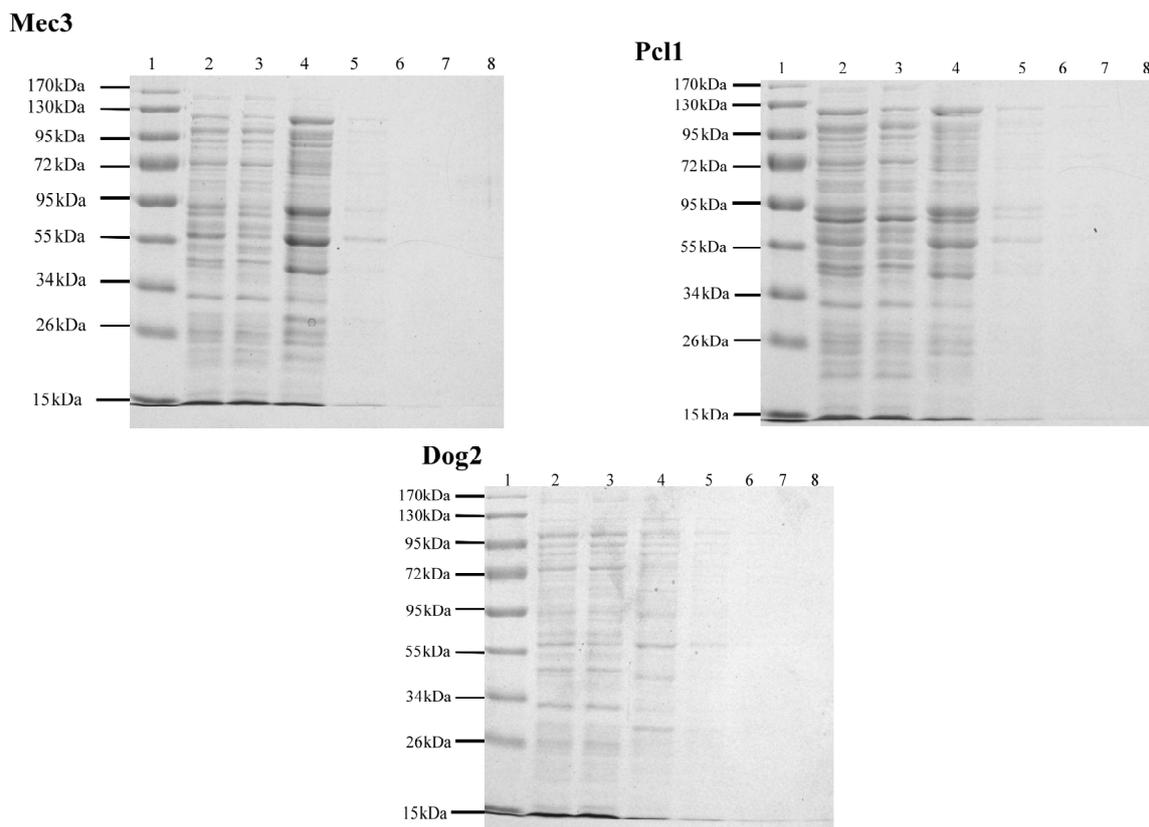


Figura 17. Resultado de purificação por IMAC do extrato proteico de linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) carregando plasmídeos (pET15b) para a expressão das proteínas Mec3, Pcl1 e Dog2. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo os resultados de testes de purificação das proteínas recombinantes Mec3, Pcl1 e Dog2 induzidas em *E. coli* BL21 (DE3) e purificadas através de IMAC em gradiente de imidazol. As *lanes* representam as amostras das proteínas eluídas coletadas em diferentes concentrações de imidazol. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). *Lanes* 2 e 3 concentração de 100mM de imidazol, *lanes* 4 e 5 concentração de 150mM, *lanes* 6 e 7 concentração de 200mM e a *lane* 8 concentração de 500mM. Previamente a aplicação das amostras a alíquota eluída na concentração de imidazol de 500mM foi concentrada $\sim 40\times$ em coluna Vivaspin 10 kDa (GE) para possibilitar a visualização de uma quantidade reduzida de proteína. As amostras foram previamente reduzidas com DTT 50mM de concentração final por 30min/RT.

Também foram realizados experimentos onde foi diminuída a temperatura de expressão (20°C), aeração (150rpm), concentração de IPTG (0,3mM) e aumento do tempo de indução (16h). Estes experimentos também não apresentaram resultados satisfatórios. Somente em uma ocasião foi observada a expressão de um produto protéico com massa similar a proteína Mec3 na fração insolúvel do extrato protéico, entretanto, foram feitas diversas tentativas de reprodução destes resultados, mas o resultado não se repetiu (figura 18).

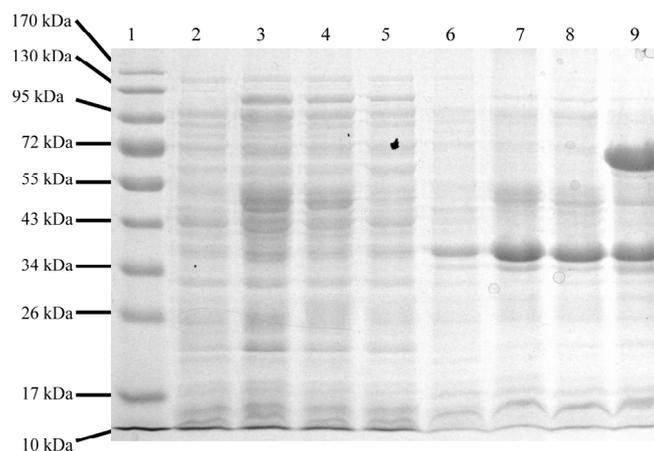


Figura 18. Resultado de indução da expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2 em linhagens de *E. coli* BL21(DE3) a 20° C. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue*, da indução de expressão das proteínas recombinantes a 20°C/150rpm/16hs utilizando 0,3mM de IPTG. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). Frações solúveis da indução de linhagens contendo plasmídeos de expressão para Dog2 (*lane* 3), Pcl1 (*lane* 4) e Mec3 (*lane* 5). Frações insolúveis da indução de linhagens contendo plasmídeos de expressão para Dog2 (*lane* 7), Pcl1 (*lane* 8) e Mec3 (*lane* 9). As *lanes* 2 (fração solúvel) e 6 (fração insolúvel) representam o controle de expressão realizado com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) sem a presença de plasmídeo. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (concentração final de 50mM/30min/RT).

4.10 Indução da expressão em linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C43

Foram também conduzidos experimentos de expressão para as proteínas Dog2, Pcl1 e Mec3 utilizando a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) C43, a qual expressou em quantidades satisfatórias as proteínas nTPx e nTPx^{C112S}. Apesar de diversas abordagens variando concentração de IPTG, tempo, temperatura e aeração também não foram obtidos resultados positivos para a expressão das proteínas (Figura 19).

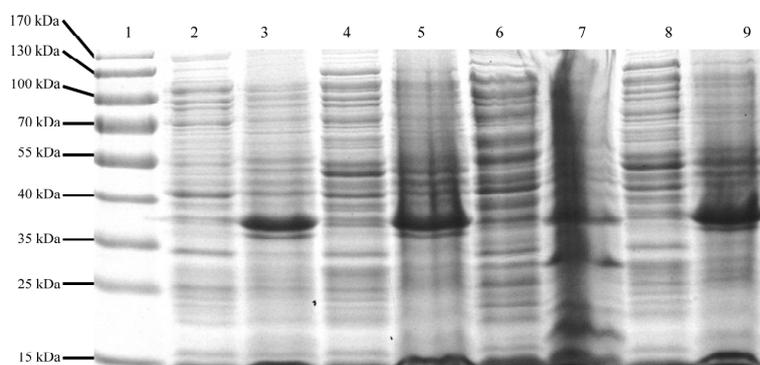


Figura 19. Resultado de indução da expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2 em linhagens de *E. coli* BL21(DE3) C43. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue* de linhagens contendo os plasmídeos pET15b-Dog2, pET15b-Mec3 e pET15b-Pcl1 após indução a

20°C/16h/0,3mM IPTG. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). As amostras foram aplicadas na seguinte ordem: Dog2 fração solúvel (*lane* 4), Dog2 fração insolúvel (*lane* 5), Mec3 fração solúvel (*lane* 6), Mec3 fração insolúvel (*Lane* 7), Pcl1 fração solúvel (*Lane* 8) e Pcl1 fração insolúvel (*Lane* 9). As *lanes* 2 (fração solúvel) e 3 (fração insolúvel) representam o controle de expressão realizado com a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) C43 sem a presença de plasmídeos. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (concentração final de 50mM/30min/RT).

Para confirmar que as proteínas não foram expressas, mesmo em pequena quantidade na linhagem BL21 (DE3) C43, foram realizados experimentos de purificação por IMAC em gradiente de imidazol seguida por concentração das amostras, conforme descrito anteriormente. A figura 20 apresenta o resultado deste procedimento revelando que não houve expressão das proteínas.

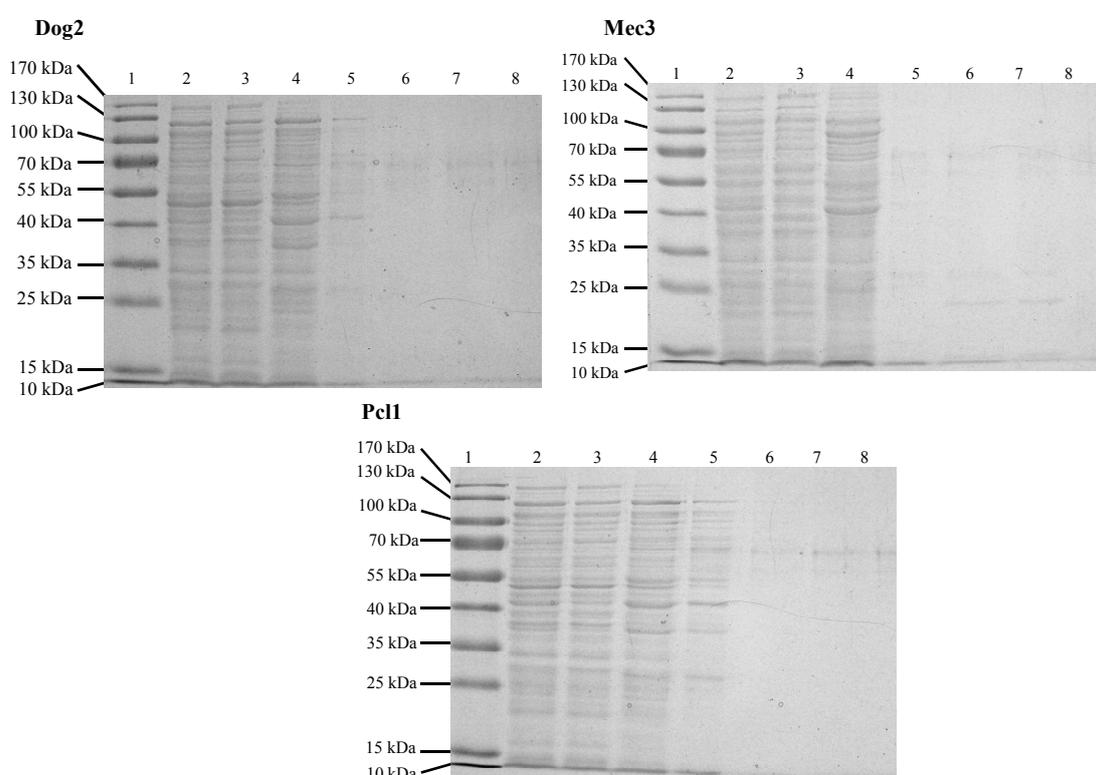


Figura 20. Resultado de purificação por IMAC do extrato proteico de linhagens de *E. coli* BL21(DE3) C43 carregando plasmídeos (pET15b) para a expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo o teste de purificação das proteínas Mec3, Pcl1 e Dog2 induzidas em *E.coli* BL21 (DE3) C43 através de IMAC usando diferentes concentrações de imidazol. As *lanes* representam as amostras das proteínas coletadas em diferentes concentrações de imidazol. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). Nas *lanes* 2 e 3, concentração de 100mM, *lanes* 4 e 5, concentração de 150mM, *lanes* 6 e 7, concentração de 200mM e a *Lane* 8 concentração de 500mM. Previamente a aplicação das amostras a alíquota eluída na concentração de imidazol de 500mM foi concentrada ~40× em coluna Vivaspin 10 kDa (GE) para possibilitar a visualização de uma quantidade reduzida de proteína. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final/30min/RT).

4.11 Expressão em *E. coli* Origami (DE3)

Após a tentativa de expressão em BL21 (DE3) C43 foram realizados experimentos de expressão utilizando a linhagem de *E. coli* Origami (DE3). Esta linhagem apresenta mutações nos genes que codificam a tiorredoxina e glutatona redutase, o que permite que proteínas recombinantes formem dissulfetos estruturais estáveis, muitas vezes necessários para o correto enovelamento das proteínas. No caso deste estudo, as proteínas de interesse (Mec3, Dog2 e Pcl1) possuem várias cisteínas na cadeia polipeptídica, sendo que pode haver a necessidade da formação de dissulfetos para a manutenção de uma estrutura tridimensional estável. Foram novamente testadas diferentes condições de indução da expressão. A figura 21 revela típico resultado do experimento de expressão das proteínas Mec3, Dog2 e Pcl1 utilizando como condições temperatura de 20°C, agitação de 150 rpm e concentração de IPTG de 0,3 mM. Como é possível averiguar nesta figura, as proteínas não foram expressas.

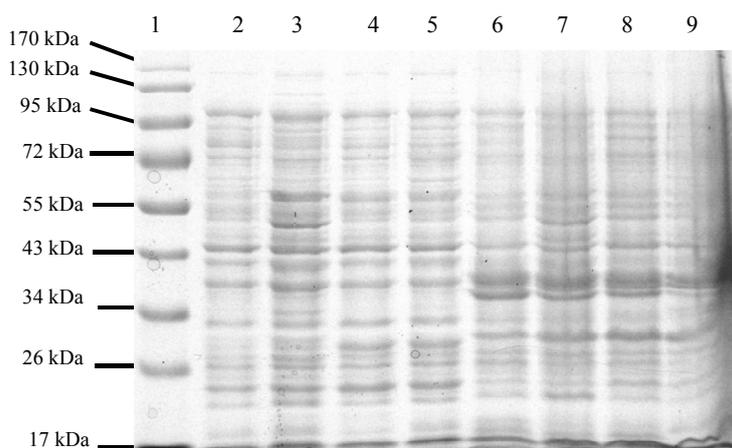


Figura 21. Teste de expressão das proteínas Mec3, Pcl1 e Dog2 em Origami (DE3). Eletroforese em gel de poli-acrilamida 12%, corado com *coomassie blue*, contendo o resultado da indução de expressão a 20°C/16h/0,3mM de IPTG das proteínas Mec3 fração solúvel (*lane* 3), Pcl1 fração solúvel (*lane* 4), Dog2 fração solúvel (*lane* 5), Mec3 fração insolúvel (*lane* 6), Pcl1 fração insolúvel (*lane* 7) e Dog2 fração insolúvel (*lane* 8). As *lanes* 2 (fração solúvel) e 9 (fração insolúvel) representam o controle de expressão realizado com a linhagem *E. coli* Origami (DE3) sem plasmídeo. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final/30min/RT).

Para constatar que as proteínas realmente não foram expressas na linhagem de *E. coli* Origami (DE3) foram realizados experimentos de purificação por IMAC seguida de concentração das amostras, conforme discutido anteriormente, para determinar se as proteínas não estavam sendo expressas em quantidades relativamente baixas, a figura 22 revela os resultados das purificações.

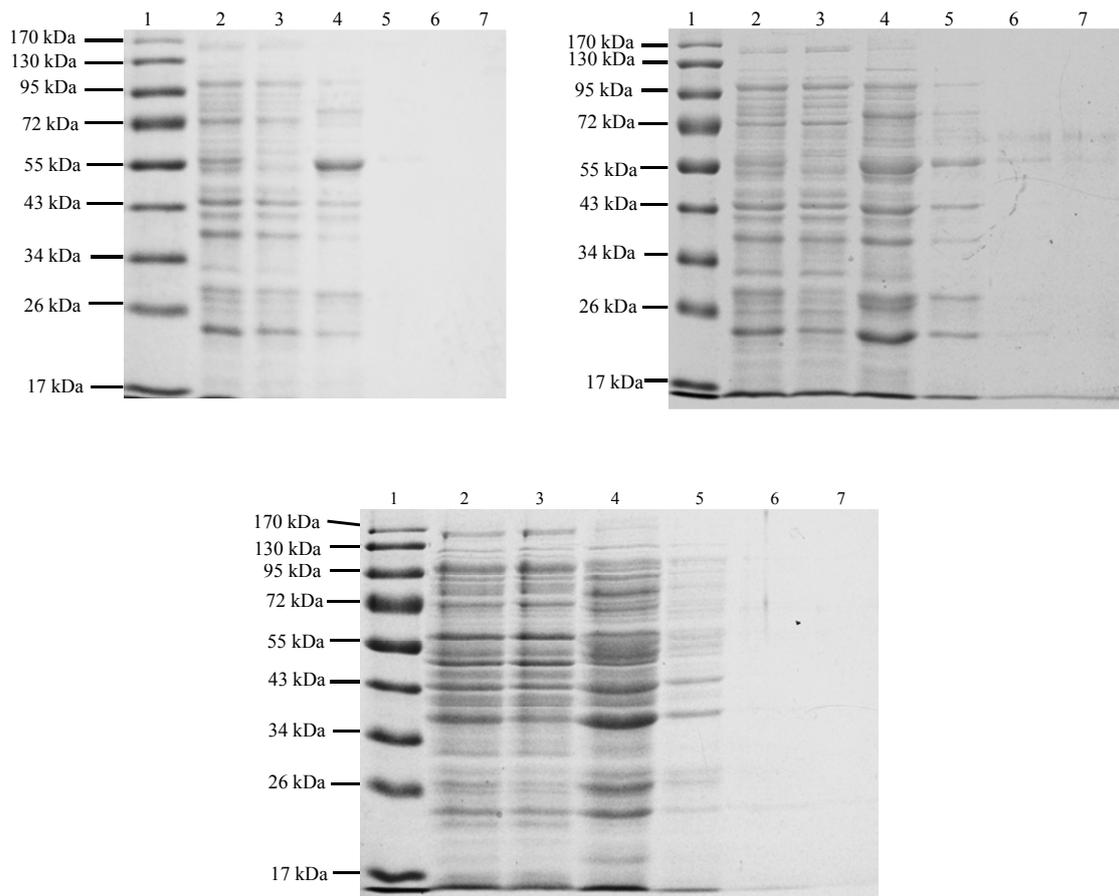


Figura 22. Resultado de purificação por IMAC do extrato proteico de linhagens de *E. coli* Origami (DE3) carreando plasmídeos para a expressão das proteínas Pcl1, Mec3 e Dog2. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo o teste de purificação das proteínas recombinantes Mec3, Pcl1 e Dog2 induzidas em *E. coli* Origami (DE3) através de IMAC usando diferentes concentrações de imidazol. As *lanes* representam as amostras das proteínas coletadas em diferentes concentrações de imidazol. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Plus Prestained Ladder* (Fermentas). Nas *lanes* 2 e 3, concentração de 100mM, *lanes* 4 e 5, concentração de 150mM, *lanes* 6 e 7, concentração de 200mM e a *Lane* 8 concentração de 500mM. Previamente a aplicação das amostras a alíquota eluída na concentração de imidazol de 500mM foi concentrada ~40× em coluna Vivaspin 10 kDa (GE) para possibilitar a visualização de uma quantidade reduzida de proteína. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final).

Experimentos expressão da proteína Gts1 foram realizados posteriormente aos das proteínas Mec3, Pcl1, Dog2 e nTPx pois esta proteína apresenta um sítio de restrição no interior do gene para a enzima *Bam* HI. Com o intuito da expressão desta proteína foram desenhados oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *Xho* I e *Nde* I. A ligação do gene de *Gts1* foi realizada da mesma forma ao das outras proteínas deste estudo, o gene foi digerido com as enzimas de restrição *Xho* I e *Nde* I e ligado ao plasmídeo de expressão previamente digerido com estas mesmas enzimas. Após a confirmação da ligação de *Gts1* com o plasmídeo pET15b foi realizado primeiro experimento de expressão de Gts1, a figura 23 representa esse experimento.

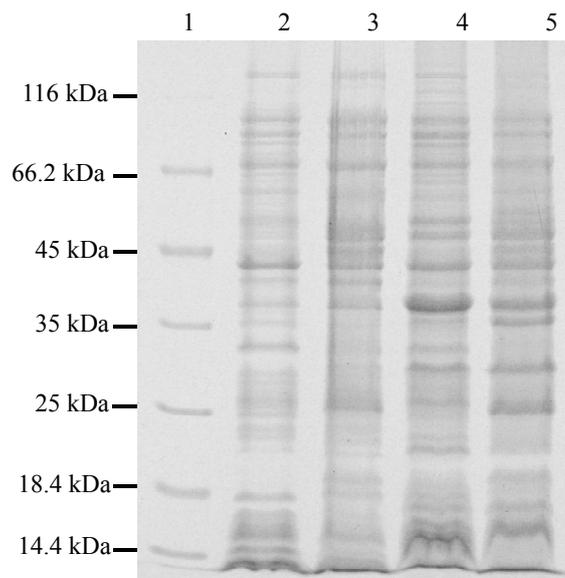


Figura 23. Resultado de indução da expressão da proteína Gts1 em BL21(DE3). Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue*, da indução de expressão da proteína Gts1 a 37°C/250rpm/3hs utilizando 1mM de IPTG. Na lane 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). Fração solúvel da indução da expressão de Gts1 (lane 3). Fração insolúvel da indução da expressão de Gts1 (lane 3). As lanes 2 (fração solúvel) e 4 (fração insolúvel) representam o controle de expressão realizado com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) sem a presença de plasmídeos. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (concentração final de 50mM/30min/RT).

Analisando-se a imagem pode-se constatar que não há aparentemente a presença de nenhuma proteína super expressa na faixa de massa molecular esperada (~46kDa) indicando que esta proteína também não estaria sendo expressa. Entretanto, o processo de purificação do extrato total por IMAC revela que uma proteína de ~25 kDa é eluída da coluna de purificação em concentrações altas de imidazol (500mM). A figura 24 A demonstra o resultado do processo de purificação de Gts1.

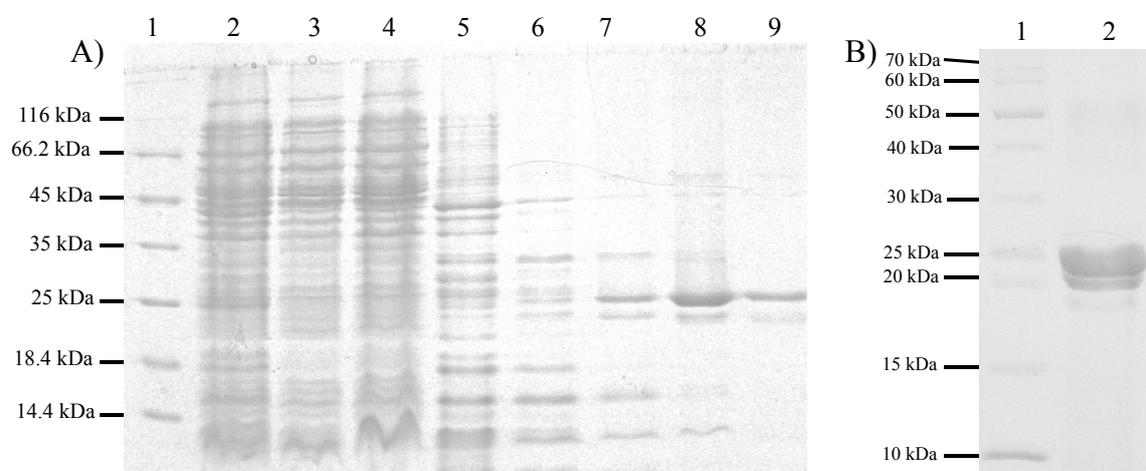


Figura 24. Resultado dos procedimentos de purificação de Gts1. A) SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue*, contendo o resultado da purificação de Gts1 através de IMAC por gradiente de imidazol.

Na *lane 1* foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). *Lane 2* contém o extrato proteico total. *Lane 3* o eluído proteico em concentração 100mM de imidazol, *lanes 4* concentração de 150mM, *lanes 5* concentração de 200mM e as *lanes 7, 8 e 9* concentração de 500mM de imidazol. **B)** SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo o resultado dos procedimentos de concentração da purificação de Gts1 onde adicionalmente ao PMSF foi utilizado também o coquetel de inibidores de proteases durante o processo de sonicação seguido por purificação por IMAC em gradiente de imidazol. através de IMAC por gradiente de imidazol.

Várias tentativas de expressão, purificação e utilização de outra construção plasmidial foram realizadas na tentativa da obtenção da proteína no peso esperado de ~46 kDa. Foram levantadas duas hipóteses para explicar o esse fenômeno: i) no processo de clonagem, durante a amplificação, poderia ter ocorrido uma mutação introduzindo um códon de terminação na parte interna do gene que poderia vir a explicar a expressão de uma proteína de peso molecular inferior ao esperado; ii) possibilidade da proteína estar sofrendo hidrólise e o produto observado em SDS-PAGE representar apenas um fragmento da proteína. A primeira hipótese foi descartada, pois a análise dos seqüenciamentos revelou que não há códons de terminação no interior do gene. Para analisarmos a segunda possibilidade foram realizados experimentos de expressão onde a purificação foi efetuada com a utilização do coquetel de inibidores de próteses *ProteoBlock Protease Inhibitor Cocktail* (Fermentas) adicionalmente ao PMSF (Figura 23B). Esse procedimento também não apresentou resultados positivos sendo que a proteína purificada por IMAC continuou apresentando um peso molecular abaixo do esperado.

Dados da literatura revelam que a proteólise de proteínas recombinantes é algo bastante recorrente. Como exemplo, Choi e col. (2005) não obtiveram nTPx na sua forma completa, somente foi possível a expressão de uma forma truncada de nTPx^{C107S/C112S} sem a presença dos primeiros 56 resíduos N-terminais em razão de proteólise dos resíduos iniciais da proteína. Tendo em vista o sucesso da expressão no trabalho desenvolvido aqui de nTPx e nTPx^{C112S} foi realizado um experimento de expressão de Gts1 na linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C43.

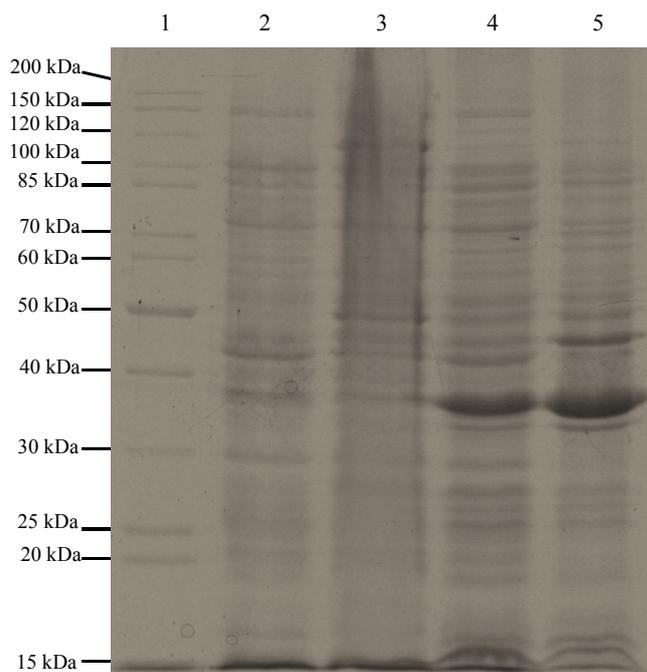


Figura 25. Resultado de indução da expressão da proteína Gts1 em BL21(DE3) C43. Resultado de eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *coomassie blue*, da indução de expressão da proteína Gts1 a 37°C/250rpm/3hs utilizando 1mM de IPTG. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas). Fração solúvel da indução da expressão de *Gts1* (*lane* 3). Fração insolúvel da indução da expressão de *Gts1* (*lane* 5). As *lanes* 2 (fração solúvel) e 4 (fração insolúvel) representam o controle de expressão realizado com a linhagem *E. coli* BL21 (DE3) C43 sem a presença de plasmídeos. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (concentração final de 50mM).

Após os procedimentos de expressão e purificação (também utilizando adicionalmente ao PMSF o coquetel de inibidores) foi possível constatar a expressão eficiente de Gts1 nesta linhagem (Figura 25).

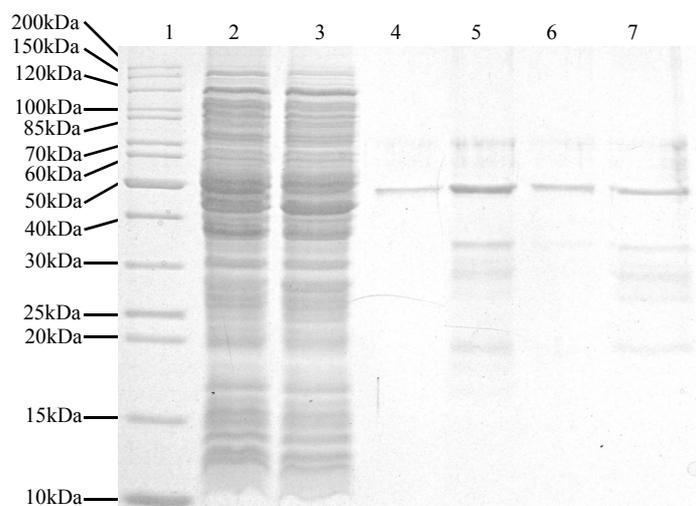


Figura 26. Resultado dos procedimentos de purificação de Gts1. SDS PAGE 12%, corado com *coomassie blue* contendo o resultado da purificação de Gts1 através de IMAC por gradiente de imidazol. Na *lane* 1 foi aplicado o marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Molecular Marker*

(Fermentas). *Lane 2* contém o extrato proteico total. *Lane 3* o eluído proteico em concentração 100 mM, *lanes 4* concentração 200mM e a *Lanes 5, 6 e 7* concentração de 500mM de imidazol. As amostras foram previamente reduzidas com DTT (50mM de concentração final).

Como pode ser observado na imagem foi possível a super expressão da proteína Gts1 com massa molecular de ~46 kDa. Apesar da obtenção da proteína após muitas tentativas de expressão não foi possível a realização de experimentos de formação de complexos entre nTPx^{C112S} e Gts1 uma vez que mesmo utilizando a linhagem de *E. coli* C43, após os procedimentos de gel filtração (para a retirada do DTT) e concentração as amostras apresentaram uma drástica redução das quantidades de proteína obtida.

Como conclusões destes experimentos, foram efetuadas diversas abordagens alterando as condições de expressão ou linhagens de *E. coli*, no entanto não foi possível a expressão de Mec3, Pcl1 e Dog2. Em razão de não foi possível averiguar *in vitro* o estabelecimento de supostos complexos protéicos através de dissulfetos mistos entre nTPx e os fatores descritos acima, os quais estavam previstos inicialmente no projeto. Os resultados obtidos indicam que não ocorreu expressão das proteínas Mec3, Pcl1 e Dog2 nem mesmo na fase insolúvel, o que indica que estas proteínas possam ser tóxicas para as células e expressão destas, mesmo em quantidades pequenas, pode levar a morte da celular. Contribuindo para esta suposição está o fato de que todas as proteínas estão relacionadas com a modulação de processos envolvidos com o crescimento celular. Corroborando com esta hipótese, com exceção de nTPx cujos os resultados serão discutidos a seguir, até o presente momento não existe nenhum trabalho na literatura onde foi efetuada a super-expressão heteróloga em bactérias de Mec3, Pcl1 ou Dog2, o que reforça a hipótese de que estas proteínas possam ser tóxicas as células, mesmo em linhagens mais resistentes a produtos tóxicos de expressão como no caso da *E. coli* BL21 (DE3) C43 (linhagem que proporcionou resultados satisfatórios para a expressão de nTPx e nTPx^{C112S}).

Em relação a outros sistemas de expressão heteróloga, cabe ressaltar que somente para Pcl1 existem trabalhos onde foi possível a expressão desta proteína em *S. cerevisiae*. Apesar desta possibilidade, não foram executados ensaios de expressão em levedura, uma vez que reconhecidamente a expressão de proteínas em células de *S. cerevisiae* promove modificações pós-traducionais, em especial a glicosilação, acentuada das proteínas recombinantes (INNIS e col., 1983). Desta forma, uma vez que o nosso grupo de pesquisa possui como principais interesses a caracterização estrutural

de proteínas e complexos através da metodologia de difração de Raios-X, não nos pareceu pertinente à padronização da expressão das proteínas alvo deste trabalho em levedura. De fato, nosso objetivo foi o de promover a expressão das proteínas que posteriormente poderiam ser utilizados em ensaios de determinação de estrutura de complexos proteicos.

Por outro lado, as proteínas nTPx e nTPx^{C112S} obtidas neste trabalho, podem ser utilizadas em estudos posteriores visando a determinação de sua estrutura através de metodologias como a cristalografia de Raios X ou a ressonância magnética nuclear (RMN). Cabe ressaltar que nTPx havia sido expressa e purificada previamente em quantidades suficientes para a determinação de sua estrutura cristalográfica por outro grupo de pesquisa (CHOI e col., 2005). Entretanto, a forma de nTPx utilizada na determinação da estrutura foi de uma proteína variante que além de carrear substituições de ambas as cisteínas envolvidas no ciclo catalítico (nTPx^{C107S/C112S}) era truncada e destituída dos primeiros 56 resíduos N-terminais (CHOI e col., 2005), o que torna as informações estruturais bastante restritas, sendo bastante importante a obtenção da estrutura da proteína intacta, como foi obtida neste trabalho.

4.12 Avaliações de interações proteicas utilizando o sistema duplo híbrido

A técnica de duplo híbrido de levedura tem sido amplamente utilizada para análise de interações entre proteínas, pois permite a obtenção de resultados de análises *in vivo*. Esta técnica foi desenvolvida por Fields e Song, 1989, e esses autores demonstraram a interação entre as proteínas Snf1 e Snf5 através da ativação do gene repórter *LacZ* pela reconstrução da sua atividade transcricional. Esse método foi desenvolvido baseando-se no ativador transcricional da levedura *S. cerevisiae* denominado de Gal4, o qual é constituído de dois domínios funcionais distintos e separados na sequencia gênica, o domínio que se liga ao DNA, denominado de DNA-BD (*DNA-binding domain*) localizado na região amino-terminal da proteína. O segundo domínio que ativa o processo de transcrição na levedura está localizado na região carboxi-terminal e é denominado de AD (*activation domain*) (Fields e Song, 1989).

O princípio desta técnica consiste em construir e introduzir em uma linhagem de levedura dois plasmídeos híbridos, um plasmídeo contendo o gene de uma proteína X em fusão com o domínio Gal4-BD e outro plasmídeo contendo o gene que codifica uma proteína Y em fusão com o domínio Gal4-AD. Caso ocorra a interação entre essas proteínas é reestabelecida a funcionalidade do ativador de transcrição Gal4 e ocorre assim a tradução de um gene repórter (Figura 27) (Fields e Song, 1989).

Para os experimentos de duplo híbrido realizados neste trabalho foi utilizado o sistema MatchmakerTM Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech), o qual é amplamente utilizado em estudos de interação proteica onde se utiliza a triagem para a identificação de novos parceiros biológicos e também para definir domínios de interação. No caso deste estudo o sistema está sendo utilizado para confirmar as supostas interações entre nTPx e as proteínas Mec3, Pcl1, Dog2 e Gts1.

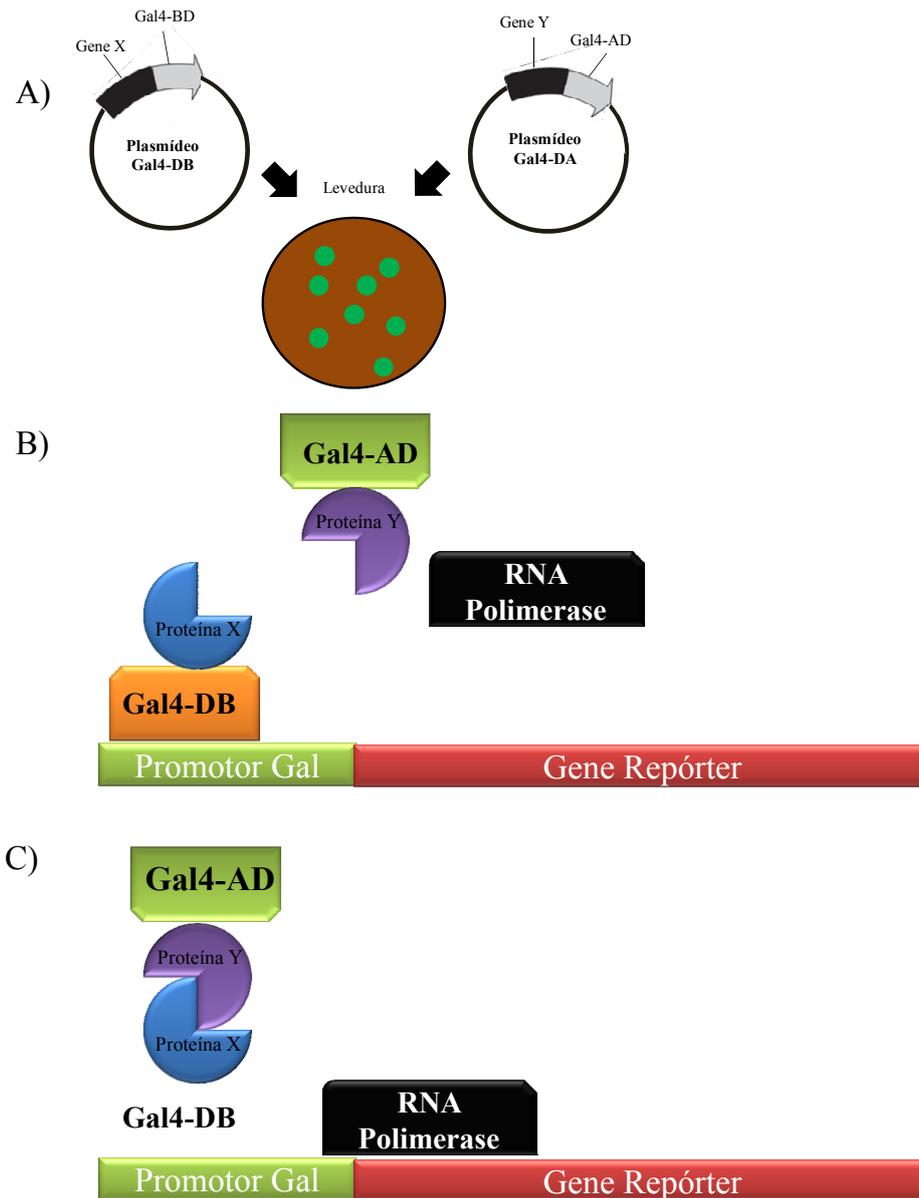


Figura 27. Representação do sistema duplo híbrido de levedura. A) Plasmídeos específicos são construídos contendo a ligação entre o GAL-DB e um gene X e GAL-AD e o gene Y, esses plasmídeos então são utilizados para transformar linhagens de *S. cerevisiae*. B) A levedura *S. cerevisiae* expressa então às proteínas fusionadas com o domínio Gal4-AD e Gal4-DB. C) Se houver algum tipo de interação entre as proteínas haverá a expressão de um gene repórter.

O sistema utilizado é constituído basicamente de um par de plasmídeos e duas linhagens de levedura. O domínio Gal4-BD está presente no plasmídeo pGBKT7-BD e o domínio Gal4-AD está presente no plasmídeo pGADT7-AD, o mapa dos plasmídeos é apresentado na figura 28. Nestes casos comumente designa-se de “presa” o gene ligado ao plasmídeo pGADT7 (quem contém o domínio de ativação) e de “isca” o gene ligado ao plasmídeo pGBKT7 (quem contém o domínio de ligação ao DNA).

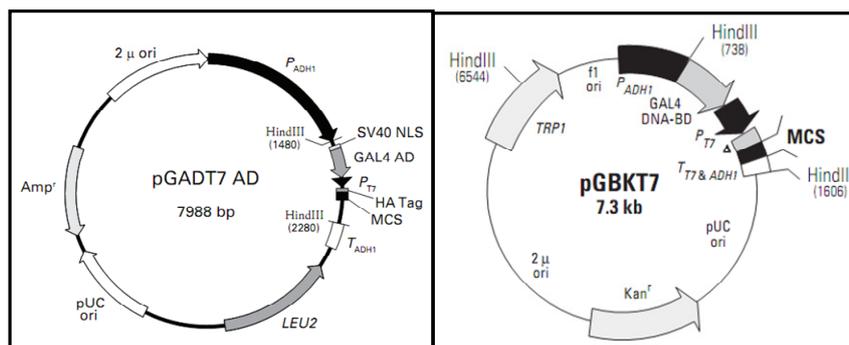


Figura 28. Mapas dos plasmídeos de duplo híbrido pGADT7AD e pGBKT7. Plasmídeos de duplo híbrido do sistema Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech), o plasmídeo pGADT7 AD carrega o domínio Gal4-AD e o gene de resistência a ampicilina, enquanto que o plasmídeo pGBKT7 carrega o domínio Gal4-BD e o gene de resistência a canamicina. Ambos possuem origens de replicação de levedura (2 μ) e bactérias (ori).

Para a realização dos testes de interação proteica este sistema utiliza as linhagens de *S. cerevisiae* Y2HGold e Y187. A linhagem Y187 possui dois diferentes genes repórter para detectar a interação entre as proteínas, o gene *LacZ* e o gene *MEL1*. *LacZ* responde pela expressão de β -galactosidase quando há interação entre as proteínas ocasionando a degradação da X- α -gal presente no meio fazendo com que as colônias apresentem cor azul. O gene *MEL1* codifica a α -galactosidase de levedura e sua expressão é controlada por Gal4p. Portanto só é expresso quando ocorre interação entre as proteínas fusionadas. Caso seja expresso à levedura é capaz de degradar a X- α -Gal, presente no meio, e faz com que as colônias se tornem azuis. Isto ocorre por conta que o X- α -gal precipita em um composto de cor azulada (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo) que promove a coloração azul das colônias. Y2HGold possui 4 genes repórteres que são expressos quando ocorre interação entre proteínas fusionadas em *S. cerevisiae*: *MEL1*: como na linhagem Y187 codifica para a proteína α -galactosidase que ao ocorrer a interação entre as proteínas de interesse promove a degradação da X- α -gal; *AUR11-C*: gene que codifica a enzima fosforil-ceramida sintetase, a expressão desta proteína ocorre em resposta a interação entre as proteínas de interesse permitindo que a linhagem de *S. cerevisiae* sobreviva em meio que contenha o antibiótico aureobasidina A, que é altamente tóxico as células; *ADE2*, a linhagem de Y2HGold não é capaz de crescer em meio mínimo que não contém adenina, porém quando a interação entre as proteínas o gene *ADE2* é expresso permitindo o crescimento das células em meio que não possui adenina; *HIS3*: Y2HGold não é capaz de sintetizar histidina, então não é capaz de crescer em meio mínimo com a carência deste aminoácido. Em resposta a interação entre proteínas ocorre à expressão de His3 permitindo a biossíntese de histidina pela célula (User's Manual, Clontech).

Para os ensaios de duplo híbrido os plasmídeos pGADT7 e pGBKT7 foram propagados através da transformação em *E. coli* DH5 α e foram padronizadas as reações de digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Bam* HI. Inicialmente foram testadas as enzimas de restrição da empresa Fermentas, mas estas enzimas ocasionavam alto efeito *star* não proporcionando uma digestão apropriada dos plasmídeos. Com o intuito de diminuir esse efeito foi adicionado BSA para aumentar a densidade proteica da reação, simulando o ambiente celular, e diminuir o efeito *star*, mas esse procedimento apresentou-se pouco expressivo. Então se optou pela utilização das enzimas de restrição da empresa New England Biolabs, as quais apresentaram um bom desempenho.

Após a reação de dupla digestão com as enzimas *Bam* HI e *Nde* I os plasmídeos foram ligados aos genes *nTPx*, *nTPx*^{C112S}, *Dog2*, *Pcl1*, *Mec3* e *Gts1*. Para esse procedimento os genes de *nTPx*, *Dog2*, *Gts1*, *Pcl1* e *Mec3* foram amplificados por PCR e digeridos por enzimas de restrição conforme procedimento efetuado para a ligação dos respectivos genes com o plasmídeo de expressão pET15b, como descrito anteriormente. A construção dos plasmídeos foi realizada utilizando-se como isca as proteínas *nTPx* e *nTPx*^{C112S} (ligados ao plasmídeo pGBKT7) que expressa em *S. cerevisiae* estas proteínas em fusão com o domínio de GAL4-AD que é o domínio de ligação ao DNA. Já os genes que codificam as proteínas *Pcl1*, *Dog2*, *Mec3* e *Gts1* foram ligados ao plasmídeo pGADT7, produzindo assim, em *S. cerevisiae* as proteínas em fusão com o domínio GAL4-BD, domínio este reconhecido pela RNA polimerase. O esperado quando foi utilizado o mutante *nTPx*^{C112S} no ensaio de duplo híbrido é que caso a interação ocorra e se ela for efetuada através de um dissulfeto misto com Cys_P (uma vez que a Cys_R foi substituída por serina) ocorresse o estabelecimento de interação mais duradoura em razão da interação covalente. O que resultaria em uma cor mais intensa das colônias quando comparado com o mesmo experimento utilizando *nTPx* selvagem.

Após a reação de ligação os plasmídeos foram utilizados para transformar linhagens de *E. coli* DH5 α para propagação. Para a confirmação da ligação do gene de *nTPx* com o plasmídeo pGBKT7 e dos genes *Mec3*, *Dog2*, *Pcl1* e *Gts1* com pGADT7 foram realizadas reações de digestão com a enzima *Nde* I (Fermentas) utilizando como controle da reação plasmídeos sem insertos, e após triagem os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados e os resultados foram analisados utilizando o programa BlastX (figura 29). A figura 30 demonstra a ligação entre

nTPx^{C112S} e o plasmídeo pGBKT7 evidenciando (quadro em vermelho) o local onde ocorre a substituição da cisteínas por uma serina.

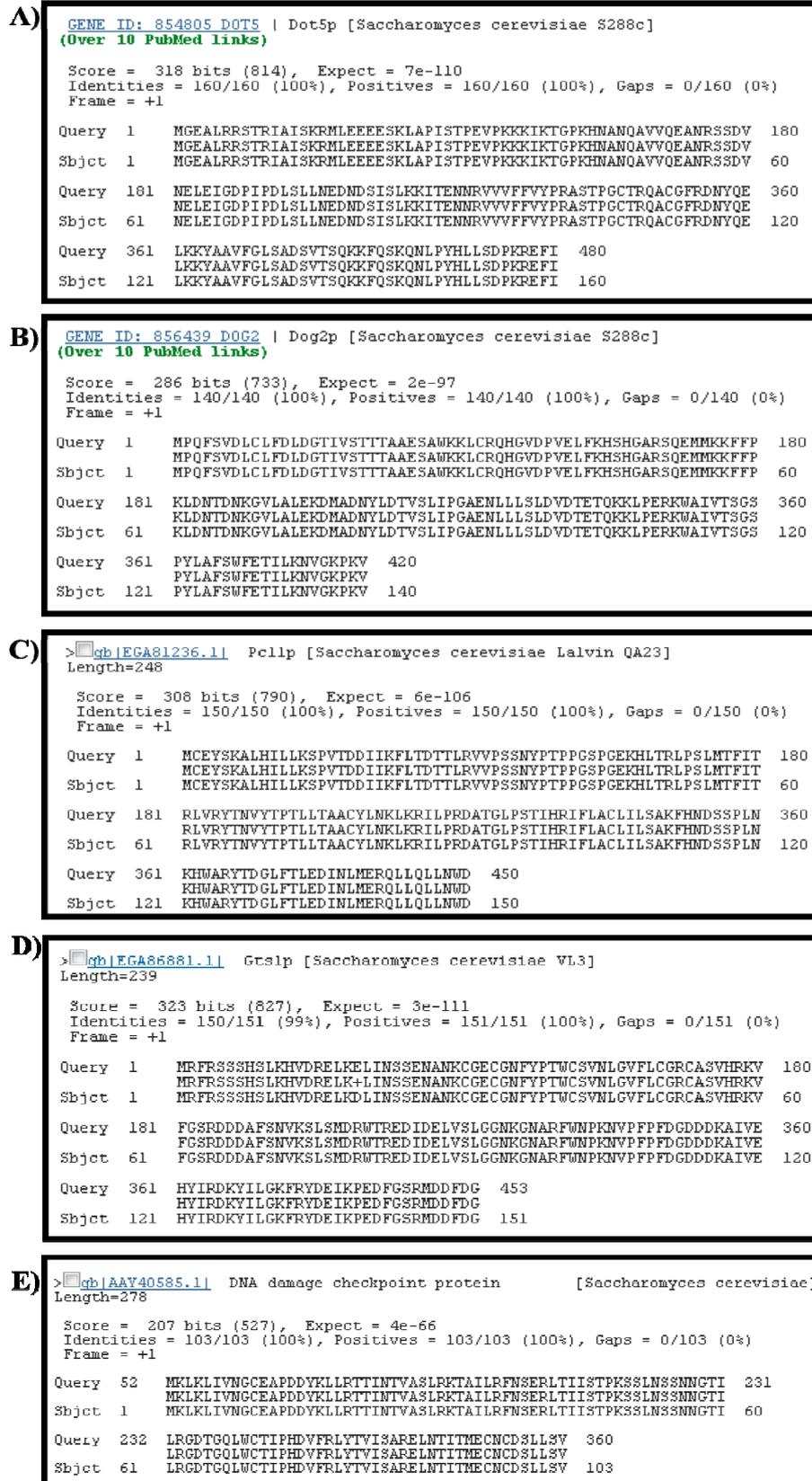


Figura 29. Alinhamento de trechos dos sequenciamentos dos genes, *nTPx*, *Dog2*, *Pcl1*, *Gts1* e *Mec3*, ligados ao plasmídeo de duplo híbrido. A) Representa o alinhamento do gene *nTPx*, B) *Dog2*, C) *Pcl1*,

D) *Gts1* e E) *Mec3*. Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa BlastX. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastX>). No banco de dados utilizado pelo programa BlastX a proteína nTPx está anotada com o nome de Dot5 e a proteína Mec3 como DNA Damage Checkpoint Protein.



Figura 30. Eletroferograma do sequenciamento do plasmídeo pGBKT7-*nTPx*^{C112S}. Resultado do sequenciamento do plasmídeo pGBKT7-*nTPx*^{C112S} utilizando primer T7 promoter (*forward*). A) Eletroferograma gerado com a utilização do programa Chromas (www.technelysium.com.au/chromas.html). O quadro em vermelho no eletroferograma representa o códon alterado para a substituição de Cys_R por um resíduo de serina. Alinhamento de resultado de sequenciamento de plasmídeo pGBKT7-*nTPx*^{C112S} utilizando o programa BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastX>). O quadro em vermelho também representa a substituição do códon TGT (cisteína) pelo códon TCT (serina).

Após a confirmação da ligação os plasmídeos pGBKT7-*nTPx*^{C112S}, pGBKT7-*nTPx* e pGBKT-53 (controle positivo) foram utilizados para transformações independentes na linhagem *S. cerevisiae* 2YHGold e plaqueados em meio SD/Trp⁻. Os plasmídeos pGADT7-*Dog2*, pGADT7-*Mec3*, pGADT7-*Gts1*, pGADT7-*Pcl1*, pGADT-T (controle positivo) e pGADT7 sem a presença de inserto (controle negativo) foram utilizados para transformações independentes na linhagem em Y187 e os transformantes foram plaqueados em meio SD/Leu⁻. As placas contendo as transformações foram incubadas a 30° C até a detecção de colônias.

As linhagens de *S. cerevisiae* Y2HGold e Y187 se apresentam na forma haplóide (n), então um cruzamento entre as duas linhagens produz uma linhagem diplóide (2n) que contém os dois plasmídeos. Para estes experimentos as linhagens Y2HGold contendo os plasmídeos “isca” foram cruzadas com as linhagens Y187 contendo os plasmídeos “presa”.

Inicialmente foram avaliadas as interações entre nTPx ou nTPx^{C112S} e os fatores Mec3 e Dog2. Para tanto, haplóides 2YHGold contendo os plasmídeos pGBKT7-nTPx ou pGBKT7-nTPx^{C112S} (iscas) foram cruzadas com linhagens haplóides Y187 contendo os plasmídeos e pGADT7-Mec3 ou pGADT7-Dog2 (presas), para a produção de linhagens diplóides e avaliação das interações protéicas.

O controle positivo utilizado foi o fornecido pelo kit do sistema duplo híbrido (controle positivo do sistema Matchmaker Gold Two-Hybrid System Clontech). Neste controle é realizado o cruzamento de linhagens haplóides Y2HGold e Y187 contendo os plasmídeos pGBKT7-53 (isca) e pGADT7-T (presa), respectivamente. Os insertos fusionados representam a proteína p53 de ratos, que é utilizada como isca e seu antígeno T, que reconhecidamente efetuam uma interação extremamente forte gerando coloração azul intensa das colônias. Como controle negativo dos experimentos se utilizou como “presa” os plasmídeos pGBKT7-nTPx e como “isca” foi utilizado o plasmídeo pGADT7 sem inserto. Os detalhes dos cruzamentos estão descritos na seção Materiais e Métodos.

A figura 31 contém os resultados dos experimentos de interação para a interação entre nTPx / Mec3 e nTPx / Dog2. A análise dos resultados revela que não foi possível detectar interação entre as proteínas nTPx-Dog2 e nTPx-Mec3. No caso dos testes de interação entre nTPx × Dog2 e nTPx × Mec3 esperava-se que as colônias apresentassem coloração azul, e quando foi utilizada nTPx^{C112S} foi investigada a suposta interação dissulfeto estável entre essas proteínas, pois a troca da cisteína de resolução por uma serina possibilitaria a estabilização do complexo formado e assim a expressão constitutiva de α -galactosidase ocasionado coloração azul mais intensa. Esses resultados demonstram que essas proteínas não apresentam nenhum tipo de interação, pois mesmo interações não covalentes são identificadas por essa técnica.

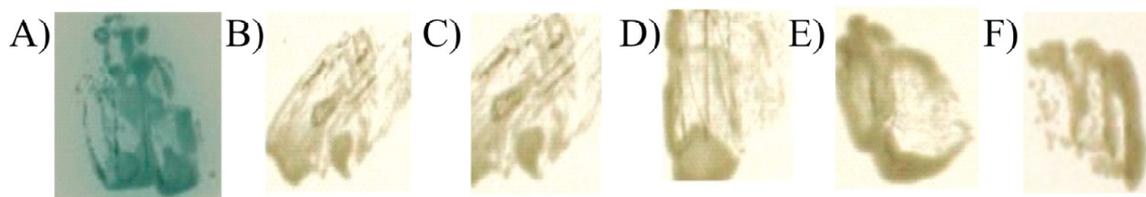


Figura 31. Resultado dos ensaios de duplo híbrido para avaliação de interações nTPx × Mec3 e nTPx × Dog2. Ensaio de duplo híbrido entre as proteínas nTPx × Mec3 e nTPx × Dog2. As leveduras foram cultivadas por ~96 horas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻/X- α -gal 40 μ g/ml. **A)** representa o controle positivo do sistema Matchmaker Gold Two-Hybrid System Clontech com células diplóides de *S. cerevisiae* obtido a partir do cruzamento de linhagens haplóides contendo os plasmídeos pGBKT7-p53 (2YHGold) e pGADT7-T (Y187). **B)** Controle negativo utilizando linhagem diploide de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-nTPx e pGADT7 (plasmídeo sem inserto). Experimentos de interação proteica em linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-nTPx e pGADT7-Mec3 (**C**); pGBKT7-

nTPx^{C112S} e pGADT7-Mec3 (D); pGBKT7-nTPx e pGADT7-Dog2 (E) e pGBKT7-nTPx^{C112S} e pGADT7-Dog2 (F).

Neste momento foram aventadas duas possibilidades: i) os resultados poderiam ser produto de artefato metodológico ou ii) a interação entre nTPx e Mec3, Gts1, Pelle e Dog2 ocorreria em um momento mais tardio do ciclo celular. Corroborando com a segunda hipótese levantada, os trabalhos demonstram que nTPx é requerida principalmente na fase diáuxica de crescimento da levedura (CHA e col., 2003) e diversos estudos apontam que durante a fase respiratória da levedura, são produzidas grandes quantidades de EROs em razão da ativação da cadeia de transporte de elétrons. De forma geral a maior quantidade de EROs ocasiona um aumento significativo da peroxidação lipídica. Desta forma postulamos que a presença de peróxidos de lipídeos poderia promover a interação entre nTPx e os supostos alvos biológicos. Cabe lembrar que a interação entre cTPxIII e o fator de ativação transcricional Cad1, a qual ocorre através de um dissulfeto misto, é altamente dependente da presença de peróxidos orgânicos no interior da célula (IWAI e col., 2010). Tendo em vista o resultado para essas interações foram realizados novos experimentos na presença de peróxido orgânico, no caso *t*-BOOH a uma concentração de 2mM.

Para tanto, previamente aos experimentos, foi testado se o peróxido orgânico poderia influenciar positivamente ou negativamente os ensaios de duplo híbrido. Para tanto foram utilizadas linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*p53* ou pGBKT7-*T*, e os resultados revelem que a adição de *t*-BOOH ao meio seletivo não influenciou na interação do controle positivo. Como controle negativo dos experimentos foi realizado um ensaio onde se utilizou como “presa” os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* ou pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e como “isca” foi utilizado o plasmídeo pGADT7 sem inserto. Como pode se constatar pela figura 32 não houve a expressão do gene MEL1 quando se utiliza uma levedura diploide contendo o plasmídeo pGBKT7-*nTPx* ou pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e o plasmídeo pGADT7 sem a presença de inserto. Uma vez que não foram detectadas diferenças fenotípicas entre células diplóides contendo os plasmídeos os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* ou pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e pGADT7, nos experimentos subsequentes foi utilizada somente as linhagens contendo plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7.

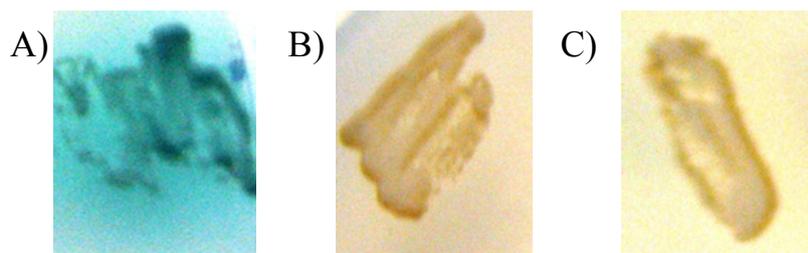


Figura 32. Resultado dos controles negativos e positivos utilizados nos ensaios de duplo híbrido de em meio seletivo contendo *t*-BOOH. **A)** representa o controle positivo do sistema Matchmaker Gold Two-Hybrid System Clontech com células diplóides de *S. cerevisiae* obtido a partir do cruzamento de linhagens monoplóides contendo os plasmídeos pGBKT7-*p53* (2YHGold) e pGADT7-*T* (Y187). Em **B)** e **C)** são apresentados os controles negativos da ativação de MEL1 utilizando linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7 (plasmídeo sem inserto). **(B)** e pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e pGADT7. **(C)**. As leveduras foram cultivadas por ~96 horas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻/40µg/ml X-α-gal /2mM de *t*-BOOH.

A figura 33 revela o resultado do experimento de duplo híbrido para averiguação de interação entre nTPx ou nTPx^{C112S} com Mec3. Os resultados revelam que ocorreu a degradação X-α-gal presente no meio de cultura, indicando a interação entre nTPx e Mec3, confirmando os dados da literatura de experimentos de larga escala (Ito e col., 2001). Entretanto, é possível notar que a coloração azulada está presente somente em células superficiais, onde a fonte de carbono é restrita e, portanto acreditamos que a interação esteja ligada a entrada de *S. cerevisiae* na fase estacionária. Além disso, constata-se que a interação entre essas proteínas provavelmente não ocorre através de interação dissulfeto (covalente), pois não se verificou diferença nítida de intensidade de coloração entre nTPx e nTPx^{C112S}.

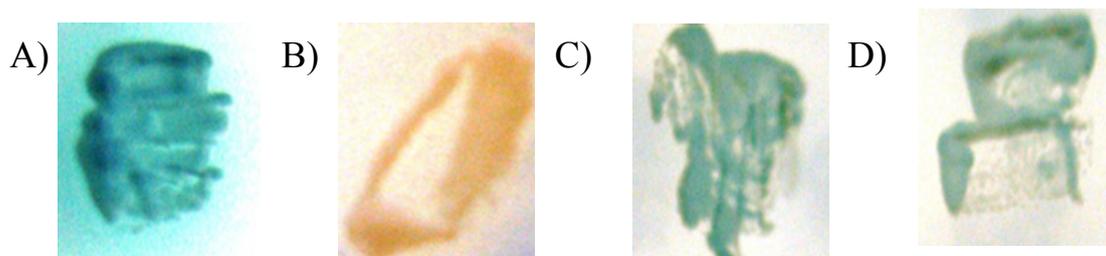


Figura 33. Resultado de ensaio de duplo híbrido para nTPx × Mec3. **A)** Controle positivo de interação representada pela linhagem diploide de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*p53* e pGADT7-*T*. **B)** Controle negativo (linhagem diploide contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7). **C)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7-*Mec3*. **D)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e pGADT7-*Mec3*. Após o cruzamento e seleção as leveduras foram cultivadas por ~96 horas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻/40µg/ml X-α-gal /2mM de *t*-BOOH.

Experimentos semelhantes utilizando nTPx com o “isca” e Dog2 como “presa”, revelam uma leve diferença nos resultados. Neste caso foi possível detectar leve interação entre nTPx e Dog2, pois a quantidade de precipitado azul é bastante baixa

(pela degradação de X- α -gal. Entretanto, ocorreu uma pequenadiferença de intensidade da coloração azul das colônias, indicando que neste caso pode estar ocorrendo uma interação dissulfeto entre a Cys_p de nTPx e uma das cisteínas de Dog2, pois quando se utilizou o mutante nTPx^{C112S} ocorreu uma pequena intensificação da coloração o que indica que pode estar ocorrendo estabilização do dissulfeto e formação de complexo entre nTPx e Dog2, o que tornaria a expressão do gene MEL1 constitutiva (Figura 34). Levando em conta esta pequena diferença novos experimentos serão necessários para determinar se a interação de nTPx e Dog2 ocorre através da estabilização de um dissulfeto.

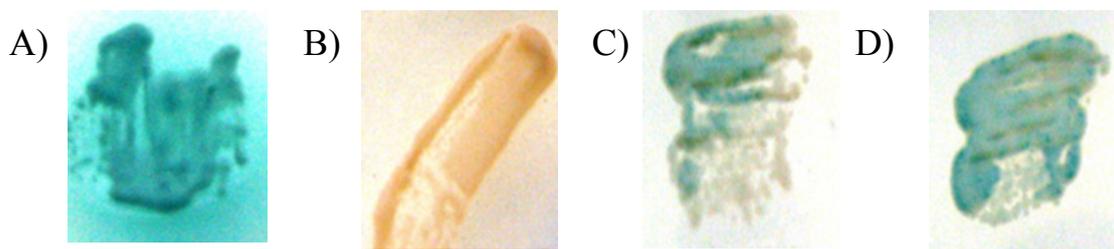


Figura 34. Resultado dos ensaios de duplo híbrido para nTPx × Dog2. **A)** Controle positivo de interação (linhagem diploide contendo plasmídeos pGBKT7-*p53* e pGADT7-*T*. **B)** Controle negativo (linhagem diploide contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7). **C)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7-*Dog2*. **D)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e pGADT7-*Dog2*. Após o cruzamento e seleção as leveduras foram cultivadas por ~96 horas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻/40 μ g/ml X- α -gal /2mM de *t*-BOOH.

Os experimentos de duplo híbrido para a avaliação de interações protéicas entre nTPx e Gts1 também apresentou resultado positivo. Os resultados obtidos para esta interação foram semelhantes aos obtidos para nTPx e Mec3, pois não houve diferença de intensidade na coloração azul, quando se compara nTPx e nTPx^{C112S} (figura 35C e 35D, respectivamente) o que indica, novamente, que as interações entre essas proteínas não ocorrem através de interações dissulfeto.

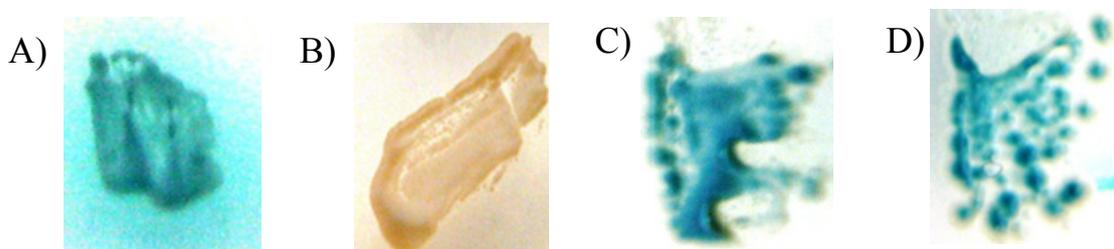


Figura 35. Resultado dos ensaios de duplo híbrido para nTPx × Gts1. **A)** Controle positivo de interação (linhagem diploide contendo plasmídeos pGBKT7-*p53* e pGADT7-*T*. **B)** Controle negativo (linhagem diploide contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7). **C)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7-*Gts1*. **D)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e pGADT7-*Gts1*. Após o cruzamento e seleção as leveduras foram cultivadas por ~96 horas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻/40 μ g/ml X- α -gal /2mM de *t*-BOOH

Finalmente, os resultados obtidos para as interações entre nTPx e Pcl1 revelam resultados bastante contrastantes aos obtidos para as demais interações analisadas. Como pode ser visto na figura 35, os resultados de duplo híbrido não indicam nenhuma interação entre nTPx e Pcl1, uma vez que não foi detectada decomposição de X- α -gal independente da utilização de nTPx (figura 36C) ou nTPx^{C112S} (figura 36D) como “presa”. De fato, a comparação fenotípica indica que as linhagens contendo os plasmídeos apresentaram um fenótipo indistinguível ao apresentado pelo controle negativo de interação. Desta forma os resultados são totalmente contrários aos obtidos previamente em experimentos envolvendo microarranjos de proteínas (PTACEK e col., 2005). Entretanto, a análise efetuada por Ptacek e col. (2005), utilizando microarranjos de proteína consistiu na fosforilação prévia de Pcl1, e de proteínas expressas em leveduras antes de sua fixação nos microarranjos proteicos. Portanto, é muito provável que a não detecção de interações tenha ocorrido por conta que Pcl1 fundida a Gal4, não se apresentou fosforilada.

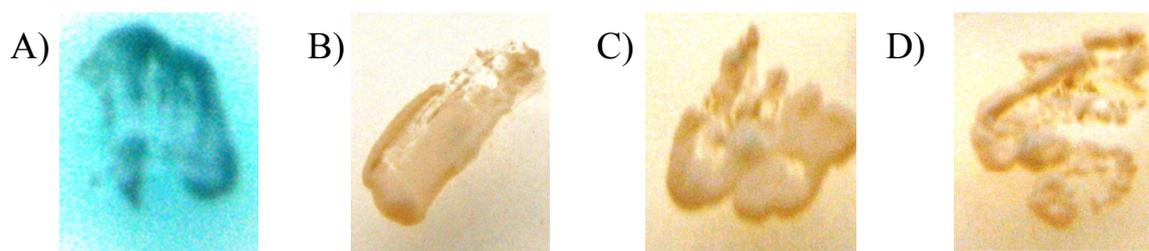


Figura 36. Resultado dos ensaios de duplo híbrido para nTPx × Pcl1. A) Controle positivo de interação (linhagem diploide contendo plasmídeos pGBKT7-*p53* e pGADT7-*T*. **B)** Controle negativo (linhagem diploide contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7). **C)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx* e pGADT7-*Pcl1*. **D)** Linhagens diplóides de levedura contendo os plasmídeos pGBKT7-*nTPx*^{C112S} e pGADT7-*Pcl1*. Após o cruzamento e seleção as leveduras foram cultivadas por ~96 horas em meio SD/Leu⁻/Trp⁻/40 μ g/ml X- α -gal /2mM de *t*-BOOH.

Outra possibilidade que deve ser levada em consideração em experimentos que utilizam a técnica de duplo híbrido e a possibilidade de mudanças conformacionais na estrutura proteica. Essas mudanças podem ser ocasionadas pela fusão da proteína com o domínio de Gal4 e assim há a possibilidade de não detecção de interações, pois quando ocorre a fusão pode haver mudanças conformacionais que culminam na perda de interação.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este projeto de pesquisa teve como objetivos a avaliação de interações protéicas, descritas previamente na literatura em estudos em escala proteômica, entre a isoforma nuclear de tiorredoxina peroxidase (nTPx) e os fatores nucleares Mec3, Dog2, Gts1 e Pcl1, os quais estão envolvidos nos processos de crescimento celular e silenciamento telomérico. Também foi objetivo deste estudo avaliar se as interações poderiam ser efetuadas através de dissulfetos mistos com Cys_P de nTPx, como descrito previamente para outras isoformas de TPx de *S. cerevisiae* e *S. pombe*. Desta forma este trabalho teve como objetivo um maior entendimento das relações entre nTPx e as proteínas supracitadas e a formação e detecção de dissulfetos mistos intramoleculares poderia permitir estudos posteriores de determinação da estrutura de complexos protéicos entre nTPx e os fatores nucleares Mec3, Dog2, Gts1 e Pcl1 por meio de cristalografia de raios X. Para atingir estes objetivos foram seguidas duas frentes: 1) A obtenção do mutante nTPx^{C112S} e a clonagem, expressão e purificação de nTPx (e nTPx^{C112S}) e Mec3, Dog2, Gts1 e Pcl1, para avaliação *in vitro* das interações; 2) Ensaios de duplo híbrido utilizando como “presa” nTPx ou nTPx^{C112S}, para avaliar *in vivo* as interações e se estas poderiam ser estabilizadas através de um dissulfeto misto quando utilizada construções de nTPx^{C112S}.

No que concerne aos ensaios envolvendo experimentos de duplo híbrido os resultados para interações entre nTPx e Mec3, Dog2 e Gts1, os resultados obtidos neste trabalho estão acordo com o descrito previamente na literatura em experimentos de larga escala. No entanto não foi verificada diferença de intensidade da coloração das colônias quando se utilizou nTPx ou nTPx^{C112S}, o que indica fortemente que as interações entre nTPx e os alvos biológicos não ocorrem por meio de um dissulfeto misto com a cisteína peroxidásica de nTPx. Somente a interação entre nTPx e Pcl1 não foi detectada pelo método de duplo híbrido, entretanto os dados da literatura revelam que a interação é somente detectada quando Pcl1 se encontra fosforilada.

Com relação à expressão das proteínas Dog2, Pcl1 e Mec3 não foi possível estabelecer condições de expressão das proteínas. Os resultados obtidos indicam que não ocorreu expressão das proteínas de Mec3, Pcl1 e Dog2 nem mesmo na fase insolúvel, o que indica que estas proteínas possam ser tóxicas para as células. Em

relação a Gts1, após diversas abordagens, foi possível à expressão da proteína utilizando a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) C43, entretanto esta proteína se mostrou bastante instável, sofrendo séria degradação durante os procedimentos de purificação por IMAC, não permitindo também a realização de ensaios de formação de complexos unidos por dissulfetos mistos. No entanto, cabe salientar que a expressão obtida neste trabalho representa a primeira vez que Gts1 recombinante é expressa e abre perspectivas para uma expressão e purificação eficiente desta proteína.

Ainda neste sentido, acreditamos que uma das principais contribuições deste estudo residiram na expressão e purificação eficiente das proteínas nTPx e nTPx^{C112S} em *E. coli* BL21 DE3 C43 o qual permite sua futura utilização na determinação de sua estrutura 3D. Cabe ressaltar que nTPx havia sido expressa e purificada previamente em quantidades suficientes para a determinação de sua estrutura cristalográfica por outro grupo de pesquisa. Entretanto, a forma de nTPx utilizada na determinação da estrutura foi de uma variante protéica que além de carrear substituições de ambas as cisteínas envolvidas no ciclo catalítico (nTPx^{C107S/C112S}) era truncada e destituída dos primeiros 56 resíduos N-terminais (CHOI e col., 2005), o que torna as informações estruturais bastante restritas.

6 REFERÊNCIAS

- AN, B. C. e col. A new antioxidant with dual functions as a peroxidase and chaperone in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules and Cells**. v. 28, p. 145 - 151, 2010.
- ARANE, M. M. e col. Typical 2-Cys peroxiredoxins --modulation by covalent transformations and noncovalent interactions. **FEBS Journal**. v. 276, p. 2478 - 2493, 2009.
- AUSUBEL, F. M. e col. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley e Sons, New York, 1998.
- BITEAU, B.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B. ATP- dependent reduction of cysteine-sulfinic acid by *Saccharomyces cerevisiae* sulphiredoxin. **Nature**. v. 425, p. 980 - 984, 2003.
- BOZONET, S. M. e col. Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 23319 - 23327, 2005.
- CHA, M. K. e col. Nuclear thiol peroxidase as a functional alkyl-hydroperoxide reductase necessary for stationary phase growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p. 24636 - 24643, 2003.
- CHANG, T. S. e col. Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 50994 - 51001, 2004.
- CHOI, J. e col. Crystal structure of the C107S/C112S mutant of yeast nuclear 2-Cys peroxiredoxin. **Proteins**. v. 61, p. 1146 - 1149, 2005.
- CHUANG, M. H. e col. The antioxidant protein alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* switches from a peroxide reductase to a molecular chaperone function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p.2552 - 2557, 2006.
- CLONTECH. **Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual.3^a** Edição. Estados Unidos. 2010.
- CORDA, Y. e col. Interaction between Set1p and checkpoint protein Mec3p in DNA repair and telomerase functions. **Nature Genetics**. v. 21, p. 204 - 208, 1999.
- DALLE-DONNE, I. e col. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radicals Biology and Medicine**. v. 43, p. 883 - 898, 2007.
- DELAUNAY, A. e col. A thiol peroxidase is a H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. **Cell**. v. 111, p. 471 - 481, 2002.
- ESPINOZA, F. H. e col. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PH085. **Science**. v. 266, p. 1388 - 1391, 1994.
- FERRER-SUETA, G. e col. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. **Chemical Research in Toxicology**. v. 24, p. 434 - 50, 2011.

- FLOHÉ, L.; HARRIS, J. R. Introduction. History of the peroxiredoxins and topical perspectives. **Subcellular Biochemistry**. v.44, p. 1 - 25, 2007.
- FORMAM, H. J.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry**. v. 49, p. 835 - 842, 2010.
- FOURQUET, S.; HUANG, M. E.; D'AUTREAUX, B.; TOLEDANO, M. B. The dual functions of thiol - based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling Antioxid. **Redox Signaling**. v. 9, p. 1565 - 1576, 2008.
- FUTCHER, B. Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. **Yeast**. v. 12, p. 1635 - 1646, 1996.
- GHAEMMAGHAMI, S. e col. Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**. v. 425, p. 737 - 741, 2003.
- GRANDIN, N.; CHARBONNEAU, M. Control of the yeast telomeric senescence survival pathways of recombination by the MEC1 and MEC3 DNA damage sensors and RPA. **Nucleic Acids Research**. v.35, p. 822 - 838, 2007
- HALL, A e col. Typical 2-Cys peroxiredoxins: structures, mechanisms and functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 276, p. 2469 - 2477, 2009.
- HALLIWELL, J.; GUTTERIDGE, M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4^a edição. Oxford University Press. Oxford, UK. 2007. 900p.
- HO, Y. e col. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**. v. 415, p. 180 - 183, 2002.
- HORTA, B. B. e col. Structural and biochemical characterization of peroxiredoxin Qbeta from *Xylella fastidiosa*: catalytic mechanism and high reactivity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, p.16051 - 16065, 2010.
- HUANG, D.; FRIESEN, H.; ANDREWS, B. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. **Molecular Microbiology**. v. 66, p.303 - 314, 2007.
- INNIS, M. A. Glycosylation of heterologous proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology**. v. 13, p. 233 - 246, 1989.
- ITO, T. e col. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 98, p.4569 - 4574, 2001.
- IWAI, K.; NAGANUMA, A.; KUGE, S. Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkylhydroperoxides to induce disulfide bond formation in the Cad1 transcription factor. **The Journal of Biology Chemistry**. v. 285, p. 10597 - 19604, 2010.
- IWAKI, S. e col. Phosphorylation by Pho85 cyclin dependent kinase acts as a signal for the down-regulation of the yeast sphingoid long-chain base kinase Lcb4 during the stationary phase. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 6520 - 6527, 2005.
- IZAWA, S.; KUROKI, N.; INOUE, Y. Nuclear thioredoxin peroxidase Dot5 in *Saccharomyces cerevisiae*: roles in oxidative stress response and disruption of telomeric silencing. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 64, p. 120 - 124, 2003.
- IYER, K.S.; KLEE, W.A. Direct spectrophotometric measurement of the rate of reduction of disulfide bonds. The reactivity of the disulfide bonds of bovine - lactalbumin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 248, p. 707-710, 1973.

- JANG, H. e col. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**. v. 117, p. 625 - 635, 2004.
- KANG, S.W. e col. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. **Trends in Molecular Medicine**. v. 11, p. 571 - 579, 2005.
- KIM, K.; RHEE, S. G.; STADTMAN, E. R. Non enzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 260, p. 15394 - 15397, 1985.
- KROGAN, N. J. e col. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**. v. 440, p. 637 - 643, 2006.
- KUMSTA, C.; JAKOB, U. Redox-regulated chaperones. **Biochemistry**. v. 48, p. 4666 - 4676, 2009.
- LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**. v.4, p.181 - 189. 2004
- LEE, J. e col. Yap 1 and SKn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 16040 - 16046, 1999.
- LEE, S. U.; RHEE, M.; MIN, Y. K.; KIM, S. H. Involvement of peroxiredoxin IV in the 16 alpha-hydroxyestrone-induced proliferation of human MCF-7 breast cancer cells **Cell Biology International**. v. 32, p. 401 - 405, 2008.
- LIM, J. C. e col. Irreversible oxidation of the active site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p. 28873 - 28880, 2008.
- LIU, H. e col. Activation of apoptosis signal-regulation kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of ASK1 inhibitor thioredoxin. **Molecular and Cellular Biology**. v. 20, p. 2198 - 2208, 2000.
- LONGHESE, M. P. e col. DNA double-strand breaks in meiosis: checking their formation, processing and repair. **DNA Repair**. v. 8, p. 1127 - 1138, 2009.
- LONGHESE, P. M. e col. Checkpoint proteins influence telomeric silencing and length maintenance in budding yeast. **Genetics**. v. 155, p. 1577 - 1591, 2000.
- LUKOSZ, M. e col. Nuclear redox signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 12, p. 713 - 742, 2010.
- MAJKA, J.; BURGERS, P. M. J. Yeast Rad17 Mec3 Ddc1: A sliding clamp for the DNA damage checkpoint. **Biochemistry**. v. 100, p. 2249 - 2254, 2003.
- MEASDAY, V. e col. Interactions between Pho85 cyclin-dependent kinase complexes and the Swi5 transcription factor in budding yeast. **Molecular Microbiology**. v. 35, p. 825 - 834, 2000.
- MIROUX, B.; WALKER, J.E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **The Journal of Molecular Biology**. v. 260, p. 289 - 298, 1996.
- MITSUI, K.; YAGUCHI, S.; TSURUGI, K. The GTS1 gene, which contains a Gly Thr repeat, affects the timing of budding and cell size of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell Biology**. v. 14, p. 5569 - 5578, 1994.

- MONTEIRO, G. e col. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 104, p. 4886 - 4891, 2007.
- MOON, J. C. e col. Oxidative stress- dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances He La cell resistance to H₂O₂- induced cell death. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 280, p. 28775 - 28784, 2005.
- MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult: catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 35219 - 35227, 2004.
- NAGYE, P. e col. Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide; a kinetic and computational study. **The Journal of Biology Chemistry**. v. 280, p. 18048 - 18055, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ª edição. São Paulo. Editora Sarvier, 2002.
- NELSON, K. J. e col. Analysis of the peroxiredoxin family: using active site structure and sequence information for global classification and residue analysis. **Proteins**. v.79, p. 947 - 964, 2011.
- NETTO, L. E. S e col. Reactive cysteine in protein: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 146, p. 180 - 193, 2006.
- NORBECK, J. L. col. Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glycerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 13875 - 13881, 1996.
- NOVAGEN. **pET System Manual**. 10ª Edição, Alemanha, 2006, p. 50.
- OGUSUCU, R. e col. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 42, p. 326 - 334, 2006.
- OLIVEIRA, M. A. e col. Crystallization and structure solution of a decameric form of cytosolic thioredoxin peroxidase 1 (Tsa1), C47S mutant, from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallographica**. v. 63, p. 665 - 668, 2007.
- PARK, S. G. e col. Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, p. 5723 - 5732, 2000.
- PARSONAGE, D. e col. Analysis of the Link between Enzymatic Activity and Oligomeric State in AhpC, a Bacterial Peroxiredoxin. **Biochemistry**. v. 44, p. 10583 - 10592, 2005.
- POOLE, L. B.; ELLIS, H. R. Identification of cysteine sulfenic acid in AhpC of alkyl hydroperoxide reductase. **Methods in Enzymology**. v. 348, p. 122 - 136, 2002.
- PTACEK, J. e col. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. **Nature**. v. 438, p. 679 - 684, 2005.

- RANDEZ-GIL F, e col. DOGR1 and DOGR2: two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. **Yeast**. v. 11, p. 1233 - 1240, 1995.
- REINARTZ, e col. Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased s-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 283, p.17440 - 17449, 2008.
- RHEE, S. G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. **Science**. v. 312, p. 1882 - 1883. 2006.
- RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of nove mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radicals Biology and Medicine**. v. 38, p. 1543 - 1552, 2005.
- RIGOLET, M.; YOBOUE, E. D.; DEVIN, A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H₂O₂ signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 14, p. 459 - 468, 2011.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. 3^a edição. v. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- SIDERI, T. C. e col. Ribosome-associated peroxiredoxins suppress oxidative stress-induced de novo formation of the [PSI⁺] prion in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 107, p. 6394 - 6399, 2010.
- SINGER, M.S. e col. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v. 150, p. 613 - 632, 1998.
- STADTMAN. E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of protein: biochemical and biological consequences. **Free Radicals Biology and Medicine**. v. 9, p. 315 - 325, 1990.
- STONE, J. R.; YANG, S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. **Antioxidant e Redox Signaling**. v. 8. p. 243 - 270, 2006.
- THORPE, C; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 287, p. 13929 - 13933. 2007.
- TORRE-RUIZ, M. A.; LOWNDES, N. F. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA damage checkpoint is required for efficient repair of double strand breaks by non-homologous end joining. **FEBS Letters**. v. 467, p. 311 - 315, 2000.
- TRIVELLI, X e col. Characterization of the yeast peroxiredoxin Ahp1 in its reduced active and overoxidized inactive forms using NMR. **Biochemistry**. v. 42, p. 14139 - 14149, 2003.
- TROTTER, e col. The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. **The Biochemical Journal**. v. 15, p.73 - 80, 2008.
- TSUJIMOTO, Y.; IZAWA, S.; INOUE, Y. Cooperative regulation of *DOG2*, encoding 2-deoxyglucose-6- phosphate phosphatase, by Snf1 kinase and the high-osmolarity glycerol-mitogen-activated protein kinase cascade in stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**. v. 182, p. 5121 - 5126, 2000.
- VEAL, E. A. e col. A 2-cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. **Molecular Cell**. v. 15, p. 129 - 139, 2004.

- WEINERT, T. A.; KISER, G. L.; HARTWELL, L. H. Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. **Genes Desenvolviment**. v. 6, p. 652 - 665, 1994.
- WESTFALL, P. J.; BALLON, D. R.; THORNER, J. When the Stress of Your Environment Makes You Go HOG Wild. **Science**. v. 306, p. 1511 - 1512, 2004.
- WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**. v. 5, p. 278 - 586, 2008.
- WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 45, p. 549 - 561, 2008.
- WOOD Z.A e col. A Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochemical Sciences**. v. 28, p. 32 - 40, 2003.
- WU, A.; MOYE-ROWLEY, W. S. GSH1, which encodes γ - glutamylcysteine synthetase, is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. **Molecular and Cellular Biology**. v. 14, p. 5832 - 5839, 1994.
- XU, Z.; TSURUGI, K. Role of Gts1p in regulation of energy-metabolism oscillation in continuous cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 26, p. 161 - 170, 2007.
- YAGUCHI, S. e col. The pleiotropic effect of the GTS1 gene product on heat tolerance, sporulation and the life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 218, p. 234 - 237, 1996.
- YOSHIOKA, J.; SCHREITER, E. R.; LEE, R. T. Role of thioredoxin in cell growth through interactions with signaling molecules. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 8, p. 2143 - 2151, 2006.