

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

ELISANDRA MÁRCIA RODRIGUES

**“Estudos moleculares das enzimas envolvidas na biossíntese de
selenocisteína em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*”**

São Carlos
2008

ELISANDRA MÁRCIA RODRIGUES

**“Estudos moleculares das enzimas envolvidas na biossíntese de
selenocisteína em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*”**

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

Área de concentração: Física Aplicada – opção Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann

São Carlos
2008

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

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

Rodrigues, Elisandra Marcia

Estudos moleculares das enzimas envolvidas na biossíntese de selenocisteina em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. / Elisandra Márcia Rodrigues; orientador Otávio Henrique Thiemann... São Carlos, 2008.

153 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada – opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Elisandra Márcia Rodrigues

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

Aprovada em: 14/08/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Instituição: UFSCar

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa

Instituição: UNESP

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo De Marco

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Instituição: ICB/USP

Assinatura

Dedicatória

Aos meus pais, Emílio S. Rodrigues e Elizete S. B. Rodrigues, por todo amor incondicional dedicado a mim. À minha irmã Elisangela Renata Rodrigues e ao meu irmão Emilio Rafael Rodrigues pelo amor, união, apoio e compreensão.

Agradecimentos

A Deus pelas experiências e aprendizado vivenciados a cada dia;

Ao meu orientador Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann por todo aprendizado científico e moral. Descrevo aqui, ainda que em poucas palavras, minha gratidão, meu respeito e admiração ao grande mestre e cientista, mas também ao grande amigo Otávio. Muito obrigada pelos primeiros ensinamentos experimentais na bancada do laboratório, às conversas sem limites de horas para discussão de resultados e de novas idéias que colaborassem no melhoramento do meu projeto científico. Agradeço a oportunidade de trabalho vivenciada há sete anos e por me transmitir segurança e tranqüilidade quando eu errava em algum experimento, o que me permitia repetir o trabalho perseverando em meu aperfeiçoamento profissional, mas que também colaborou em meu crescimento moral. Ainda sou muito grata , quando em momentos mais difíceis pude contar não mais com a figura do orientador, mas com o amigo, sempre disposto a ouvir e a colaborar da melhor maneira para ajudar na resolução de problemas;

Aos Profs. Dr.Glaucius Oliva e Dr. Richard Charles Garrat por me proporcionarem a oportunidade de ingresso ao grupo de Cristalografia;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva, docente da Universidade Federal de São Carlos, por me oferecer a primeira oportunidade de trabalho científico e por me receber sempre gentilmente, quando precisei executar experimentos em seu laboratório de pesquisa;

A Prof^a. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, docente da Universidade Federal de São Carlos, pela disponibilidade, gentileza e simpatia em me receber em seu laboratório seja para colaborar na assistência e resolução de problemas experimentais como para aplicação de experimentos;

A Prof^a. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza, docente da Universidade Federal de São Carlos, pela convivência, amizade, ensinamentos, conselhos e ajuda contínua para o meu aprimoramento profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior, docente da Universidade de São Paulo, por toda ajuda e auxílio designada aos seus amigos aqui do grupo de Cristalografia na resolução de problemas experimentais. Pela amizade, solidariedade, convivência, conselhos, simpatia, bondade, características singulares que o descreve como um grande amigo;

A Prof^a. Dra. Leila Maria Beltramini, pela oportunidade de trabalho desempenhada através de monitoria no curso de Ciências Exatas da Universidade de São Paulo, onde tive a oportunidade de conviver e presenciar a preocupação da professora em auxiliar seus alunos através de estágios e oportunidades para aprimoramento profissional e pessoal. Agradeço a amizade, conselhos e ajuda sempre que a fui procurar em busca de auxílio;

A Prof^a. Dra. Ana Paula Ullian Araújo, pelo auxílio, colaboração e convivência agradável;

Ao Prof. Dr. Sérgio Schenckman, docente da Universidade Federal de São Paulo, pela gentileza com que fui recebida em seu laboratório, colaboração e discussões para a interpretação de resultados visando o entendimento de meus dados experimentais realizados em seu laboratório;

Ao Prof. Dr. Larry Simpson, da Universidade da Califórnia em Los Angeles, por ter me recebido em seu laboratório muito gentilmente, por todo seu apoio e convivência agradável;

A querida amiga Teresa Cristina Leandro de Jesus, aluna de doutorado da Universidade Federal de São Paulo sob a supervisão do Prof. Dr. Sérgio Schenckman, responsável pelo auxílio na obtenção de clones positivos em células de *T. brucei* e

experimentos de Imunolocalização. Agradeço à amizade, o carinho, a dedicação, a solidariedade, o apoio, a ajuda e agradável convivência;

Ao amigo Rafael Martins, aluno de pós-doutorado da Universidade Federal de São Paulo, pela ajuda e dedicação no experimento de imunoprecipitação, além de conquistar um novo amigo;

Aos amigos Alexandre Cassago e Susana Sculaccio pela colaboração em trabalhos científicos, amizade e agradável convivência;

A querida amiga Fernanda Cristina Costa pelo aprendizado em cultura de células, auxílio e colaboração em trabalhos científicos, além da amizade, carinho e dedicação;

As três mosqueteiras Jaque, Mamé e Fer Costa, as quais guardo imenso carinho e admiração, por sempre me auxiliarem e pela dedicação, sorriso, solidariedade e laços de amizade;

A amiga Carol Guzzi “Caroline” pela agradável convivência na sala de cultura, além da amizade, carinho e dedicação consolidados nesses anos;

A minha querida amiga Sur, por todos esses anos de convivência, pela ajuda, preocupação, solidariedade, carinho, respeito, por todos os E-mails enquanto eu estive afastada, por todos os acontecimentos importantes compartilhados e minha profunda gratidão;

Ao meu amigo Alexandre por toda amizade, pelas longas conversas, pelo primeiro bom dia de todas as manhãs;

A minha amiga Maria, pelo sorriso, bom humor, alto astral, solidariedade, amizade e por esse enorme coração que está sempre pronto a ajudar;

Aos meus amigos Fernando Alessandro, Alécio e Lívia Manzine sempre dispostos a colaborar e pela amizade;

Aos meus amigos Sheila e Leandro por toda ajuda, atenção, discussões sempre valiosas na busca de resultados positivos dos nossos trabalhos e amizade;

A minha amiga Daniela Ambrósio, pela ajuda e dicas no trabalho com sistema “PTP-tagging”;

Aos meus amigos Jeremy, Daren, Feng, Guo, Greg e Kestrel pela ajuda, dedicação, compreensão, carinho durante minha estadia na UCLA;

Ao querido amigo Tri, técnico do laboratório da UCLA, meu carinho, respeito e admiração;

A minha querida amiga Silvia por me receber com tanto carinho em sua casa em Los Angeles, por toda ajuda, compreensão, carinho e dedicação;

Aos amigos Rodrigo, Mercy e Farid por todo auxílio, amizade e dedicação;

A querida amiga Andreinha, por me ajudar em tantos momentos, pela amizade de tantos anos, pelo carinho, respeito e dedicação;

Aos técnicos do grupo de Cristalografia e Biofísica: Susana, Bianca, Augusto, Kelven, Geraldo, Andressa, João e Bel por todo apoio técnico e amizade;

Aos secretários do grupo de cristalografia, Fernando e Luciana pelo apoio na área administrativa e amizade;

A todos os amigos do grupo de Cristalografia e Biofísica;

Ao IFSC-USP, pela utilização das estruturas e serviços prestados;

Ao CNPq pelo apoio financeiro para realização deste projeto científico.

RESUMO

Umas das principais formas biológicas de incorporação do selênio é na forma de um aminoácido denominado selenocisteína (Sec, U), que é incorporado co-traducionalmente ao polipeptídio nascente em posições específicas do códon UGA, que normalmente é reconhecido como códon de parada. A incorporação de selenocisteína em *E. coli* já está completamente esclarecida, com a participação dos genes que codifica para selenocisteína sintase (SELA), seril-tRNA sintetase (SerRS), um tRNA^{Sec} específico (SELC), selenofosfato sintetase (SELD) e um fator de elongação próprio (SELB). Entretanto em eucariotos não há homólogos para SELA e existem evidências de haver a necessidade de dois passos enzimáticos que substituem a atividade desempenhada por SELA, com uma fosforilação da serina seguida de uma selenilação através das enzimas Fosfo-Seril-tRNA^{Sec} Kinase (PSTK) e Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase (SepSecS), respectivamente. A via de biossíntese e incorporação de selenocisteína é muito estudada em alguns organismos, mas ainda pouco explorada em Kinetoplastida. Nesse sentido, realizaram-se estudos moleculares das enzimas envolvidas nessa via, mais especificamente em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*. Foram identificados o elemento SECIS na região 3' do mRNA que atua no reconhecimento do códon UGA interno e, em fase de leitura na inserção de selenocisteína em *Leishmania major* e *Leishmania infantum*; a incorporação de Se⁷⁵ em proteínas de *Leishmania*; a ocorrência do tRNA^{Sec} em *Trypanosoma* e *Leishmania* e, adicionalmente todos os genes necessários para a síntese de selenocisteína: SELB, SELD, PSTK e SECp43. Foram obtidos clones dos genes *selB* e *selD* em vetor de expressão pET28a(+) e as proteínas foram expressas em bactérias *Escherichia coli* cepa BL21 (DE3). A proteína recombinante SELD foi purificada em cromatografia de afinidade e seu pI e massa molecular foram determinados usando as técnicas de sistema Phast de eletroforese e gel nativo. As proteínas SELB, SELD, SECp43 e Seril tRNA sintetase foram imunolocalizadas no citoplasma de células nativas de *T. brucei*. Uma nova metodologia “PTP tagging” foi utilizada para estudos de interação protéica com uso de proteínas alvos SECp43, SELB e PSTK na busca de novas proteínas ligantes na via de selenocisteína em *T. brucei*. Futuras investigações moleculares e estruturais das enzimas envolvidas na via de selenocisteína em Kinetoplastida poderão trazer informações relevantes no entendimento da biossíntese desse aminoácido, assim como possibilitar o desenvolvimento de inibidores específicos visando o tratamento de doenças causadas pelos parasitas *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*.

Palavras-chaves: Proteínas. Selenocisteína. Kinetoplastida.

ABSTRACT

One of the main biological forms of the selenium incorporation is the amino acid form named selenocysteine (Sec, U), which is incorporated co-translationally at the emerging new polypeptide in the specific positions at the UGA codon, that is usually recognized as stop codon. The incorporation of the selenocysteine in *E.coli* is already solved with the involvement of the genes that codify to selenocysteine synthase (SELA), seryl tRNA synthetase (SerRS), a specific tRNA^{Sec} (SELC), selenophosphate synthetase (SELD) and a selenocysteine-specific translation elongation factor (SELB). However, in eukarya there is no SELA homologue, but there are evidences about the requirement of the two enzymatic steps that replace the activity performed by SELA, the fosforilation of the serine followed by selenocystylation through the phosphoseryl-tRNA^{Sec} kinase (PSTK) and Sep-tRNA:Sec-tRNA synthase (SepSecS) enzymes, respectively. Currently, the selenocysteine synthesis and its incorporation is more studied in many organisms, but less explored in Kinetoplastid. Subsequently, the molecular studies were done with the enzymes involved in this pathway, especially in *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. The SECIS element was identified in the region 3' of the mRNA, that acts in the recognition of the UGA codon positioned within a gene's open reading frame on the insertion of the selenocysteine in *Leishmania major* and *Leishmania infantum*; the incorporation of ⁷⁵Se into *Leishmania* proteins, the occurrence of selenocysteine-tRNA^{Sec} in both *Leishmania* and *Trypanosoma*; in addition, the finding of all genes necessary for selenocysteine synthesis, such as: SELB, SELD, PSTK, and SECp43. Clones were obtained from the *selB* and *selD* genes in the pET28a(+) expression vector and the enzymes were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant SELD protein was purified by affinity chromatography and its pI and molecular mass were determined using: isoeletrophocusing electrophoresis and native gel. The proteins SELB, SELD, SECp43, and sery-tRNA synthetase were immune located in the cytoplasm in *T. brucei* native cells. A new methodology "PTP tagging" was utilized for protein interaction studies by using target proteins SECp43, SELB and PSTK to search new tagged proteins in selenocysteine *T. brucei* synthesis. Future molecular and structural investigation of the enzymes involved in Kinetoplastida selenocysteine biosynthesis will provide relevant information for understanding of the synthesis of this amino acid as well as the development of the specific inhibitors, focusing the treatment of the disease caused by *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* parasites.

Keywords: Proteins. Selenocysteine. Kinetoplastid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Posições que o cinetoplasto ocupa durante o ciclo de vida do <i>Trypanosoma</i>	26
Figura 2. Ciclo de vida do <i>T. brucei</i>	27
Figura 3. Agente etiológico e transmissor da doença do sono.....	28
Figura 4. Distribuição geográfica da Doença do sono no continente africano em 1989...	29
Figura 5. Formas promastigotas e amastigotas encontradas no gênero <i>Leishmania</i>	31
Figura 6. Ciclo de vida da Leishmania.....	34
Figura 7. Agente transmissor de Leishmaniose: inseto flebótomo <i>Lutzomyia</i>	35
Figura 8. Regiões endêmicas de Leishmaniose cutânea.....	35
Figura 9. Regiões endêmicas de Leishmaniose visceral.....	36
Figura 10. Manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV).....	37
Figura 11. Manifestação clínica da leishmaniose cutânea (LC).....	38
Figura 12. Manifestação clínica da leishmaniose mucocutânea (LMC).....	39
Figura 13. Manifestação clínica da leishmaniose cutânea difusa (LCD).....	39
Figura 14. Biossíntese e incorporação de selenocisteína em <i>E.coli</i>	46
Figura 15. Mecanismo funcional de SELA em bactéria e de PSTK/SepSecS em arqueobactéria e eucariotos.....	50
Figura 16. Modelo para biossíntese e incorporação de selenocisteína em eucariotos.....	52
Figura 17. Estrutura secundária global em forma de folhas de trevo de todos os tRNAs... 54	
Figura 18. Modelo proposto para o elemento SECIS na incorporação de selenoproteína de rato tipo I iodothyronine deiodinase (5'DI).....	55
Figura 19. Incorporação de selenocisteína em bactéria (A), eucarioto (B) e arqueobactéria (C).....	57
Figura 20. Identificação da seqüência do tRNA ^{Sec} do genoma de Kinetoplastida.....	65
Figura 21. Alinhamento das seqüências Sel1 de <i>L. major</i> e <i>L. infantum</i>	67
Figura 22. Identificação das selenoproteínas, LmSel1 e LinfSel1, e incorporação de Se ⁷⁵ em <i>L. major</i>	68

Figura 23. Alinhamento parcial das seqüências de selenoproteínas conhecidas para homólogos em Kinetoplastida.....	69
Figura 24. Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i>	91
Figura 25. Digestão das construções recombinantes SELB/pTZ e SELD/pGEMT e do plasmídeo pET 28a (+) com as enzimas de restrição <i>Nde</i> I e <i>Xho</i> I.....	92
Figura 26. Experimento de amplificação dos DNAs plasmídias SELB/pET28 e SELD/pET28 com oligonucleotídeos específicos.....	93
Figura 27. Estratégia de alinhamento das extremidades 5' e 3' dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> produzido pelo programa SeqMan.....	94
Figura 28. Teste de expressão e solubilidade da proteína recombinante SELB.....	95
Figura 29. Experimento de indução e expressão da SELD.....	96
Figura 30. Resultado da purificação da SELD, após eluição na resina de cobalto (TALON).....	96
Figura 31. Determinação do ponto isoelétrico da proteína SELD.....	97
Figura 32. Experimento de gel nativo da SED de <i>T. brucei</i>	98
Figura 33. Titulação dos anticorpos anti-SELB e anti-SELD em células <i>T. brucei</i> 427 Nativa.....	100
Figura 34. Imunolocalização das proteínas SELB, SELD, SECp43 e Seril-tRNA em células de <i>T. brucei</i>	102
Figura 35. Esquema ilustrativo da purificação no sistema “Tandem Affinity Purification” (TAP).....	109
Figura 36. Novo epítopo “PTP” para purificação em tandem em Tripanosomatídeos...	110
Figura 37. Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) dos genes <i>pstkTB</i> , <i>selTB</i> e <i>secp43TB</i>	124
Figura 38. Análise de clones recombinantes por PCR.....	125
Figura 39. Reação de digestão com as enzimas <i>Apa</i> I e <i>Not</i> I para subclonagem em vetor pC-PTP-NEO.....	125
Figura 40. Recombinantes positivos para as construções em vetor pC-PTP-NEO.....	126
Figura 41. Resultado de alinhamento das seqüências 5' e 3' dos genes <i>secp43</i> , <i>selB</i> e <i>pstk</i> produzido pelo programa Seqman.....	127

Figura 42. Digestão das seqüências alvos em vetor pC-PTP-NEO para integração genômica.....	128
Figura 43. Análise da integração das construções SELBTB/PC-NEO e PSTKTB/PC-NEO no genoma de <i>T. brucei</i>	129
Figura 44. Análise das expressões de SELB/PCNEO e PSTK/PCNEO em <i>T. brucei</i> através de Imunoblotting.....	130
Figura 45. Purificação de SELB e PSTK no sistema “PTP tagging”	132
Figura 46. Imunoblotting de células de <i>T. brucei</i> 427 transfectada com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO.....	133
Figura 47. Imunolocalização da SELB em vetor pC-PTP-NEO transfectada em células de <i>T. brucei</i> 427.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e PCR.....	62
Tabela 2 - Reagentes usados nas reações de RT-PCR (ONE STEP RT-PCR – Qiagen) para obtenção dos transcritos LmSel1, LinfSel1 (<i>L. major</i> e <i>L. infantum</i>) e SelC (<i>T. brucei</i>).....	62
Tabela 3 - Programa de RT-PCR utilizado pelo termociclador PTC-100 TM Programmable Thermal Controller.....	62
Tabela 4 - Reagentes usados nas reações de PCR realizadas com “Taq DNA Polymerase” (Biotoools).....	63
Tabela 5 - Programa de PCR para amplificações com “Taq DNA Polymerase” (Biotoools).....	63
Tabela 6 - Seqüências que codificam para síntese de selenocisteínas em Kinetoplastida.....	64
Tabela 7 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> de <i>T. brucei</i>	75
Tabela 8 - Reagentes (Invitrogen) utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes <i>selB</i> e <i>SelD</i>	76
Tabela 9 – Programa de PCR para amplificação dos genes <i>selB</i> e <i>SelD</i>	76
Tabela 10 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos para sequenciamento dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> de <i>T. brucei</i>	80
Tabela 11 - Padrões de pl constituintes do Kit geral de calibração “Phast Gel IEF 3-9”.....	84
Tabela 12 - Padrões de massa molecular constituintes do Kit geral de calibração “PhastGel 8-25”	86
Tabela 13 - Ensaios de cristalização da proteína SELD de <i>T. brucei</i> com Fatorial I (condições 5, 34 e 48) e Fatorial II (condições 10 e 12) da Hampton Research.....	99
Tabela 14 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação dos genes <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> <i>T.brucei</i>	112
Tabela 15 - Reagentes usados nas reações de PCR realizadas com “Taq DNA Polymerase, Recombinant” nas amplificações de <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> <i>T.brucei</i>	113

Tabela 16 - Programa de PCR para amplificações nas amplificações de <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> de <i>T.brucei</i>	113
Tabela 17 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos internos utilizados no sequenciamento do gene <i>pstk</i> de <i>T. brucei</i>	117
Tabela 18 - Reagentes usados no tampão de eletroporação.....	119
Tabela 19 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para checar integração dos plasmídeos.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac – anticorpo

Ag - antígeno

ADP – Adenosina difosfato

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

cDNA – DNA complementar

Cys - cisteína

DALYs - Deficiência Regulada de Anos de Vida

DAPI – Diamidino-2-fenil-indol , dihidroclorito

dATP – adenina desoxirribosídeo trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleosídeos trifosfatados

ddNTP – Desoxirribonucleosídeos trifosfatados que não apresentam a hidroxila no carbono 3'

D.O. – Densidade ótica

DTT – Ditiotreitol

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etileno Diamino Tetra Acético

EGTA – Etileno Glicol Tetra Acético

G1 – Intervalo G1 ou pós mitótico

G2 – Intervalo G2 ou pré-mitótico

G418 – neomicina

His - Histidina

IEF – “Isoelectric Focusing” - eletroforese de focalização isoelétrica

IPTG – Isopropil β - D-tiogalactopiranosídeo

kDa – QuiloDalton

LB – Meio de cultura Luria Bertani

Mg⁺² – íon magnésio

NTB - Nitroblue de tetrazólio

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORF- fase aberta de leitura

³²P – fosfato radioativo

PARPs - Prociclinas - Proteínas Ácidas Repetitivas”

pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PEG – Polietileno glicol

pI – Ponto isoelétrico

Pi – Fosfato inorgânico

PPi – Pirofosfato

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – reação com transcriptase reversa

rpm – Rotações por minuto

SDS – Detergente dodecil sulfato de sódio

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

Sec – aminoácido selenocisteína

TAE – Tampão de eletroforese composto por Tris acetato e EDTA

TBS – Tampão Tris salino

TE – Tampão Tris-EDTA

Tris – Hidroximetil-aminometano

Tween 20 – polioxetilenesorbitan monolaurate

UTR – Região Não - Traduzida

VSGs - Glicoproteínas Variáveis de Superfície

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

SUMÁRIO

Capítulo 1 Introdução

INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Parasitas da espécie <i>Trypanosoma brucei</i>	25
1.1.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i>	26
1.1.2 Agente Etiológico e Distribuição global da Tripanosomiase africana humana.....	27
1.1.3 Tratamento da Tripanosomiase africana humana.....	30
1.2 Parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	31
1.2.1 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	33
1.2.2 Leishmaniose e Distribuição global da doença.....	34
1.2.3 Leishmaniose e suas manifestações clínicas.....	37
1.2.4 Tratamento de Leishmanioses.....	40
1.3 Selênio e suas implicações.....	41
1.4 Selenoproteínas.....	43
1.4.1 Biossíntese de selenocisteína em procariotos e eucariotos.....	46
1.4.2 Incorporação de selenocisteína.....	52
1.6 OBJETIVOS.....	58

Capítulo 2 Identificação de selenoproteínas em *Leishmania* e da estrutura SECIS

2.1 Introdução.....	59
2.2 Materiais e Métodos.....	60
2.2.1 Busca de selenoproteína e tRNA ^{Sec} no genoma de <i>Leishmania major</i>	60

2.2.2 Cultura de células e extração de RNA total.....	61
2.2.3 Síntese do tRNASEc e das selenoproteínas (LmSel1 e LinfSel1)	61
2.3 Resultados.....	63
2.3.1 Componentes da síntese de selenoproteínas em Kinetoplastida.....	63
2.3.2 Identificação do tRNA ^{Sec} de Kinetoplastida.....	64
2.3.3 Identificação das selenoproteínas (LmSel1 e LinfSel1) de <i>Leishmania</i> e do elemento SECIS	65
2.3.4 Identificação de candidatos a selenoproteínas de Kinetoplastida.....	68
2.4 Discussão.....	69

Capítulo 3 Estudos moleculares das enzimas, SELB e SELD, na biossíntese de selenocisteínas em *T. brucei*

3.1 Introdução.....	73
3.2 Materiais e Métodos.....	74
3.2.1 Amplificação dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> de <i>T. brucei</i> e clonagem nos vetores de propagação pTZ57R/T e pGEM-T.....	74
3.2.2 Transformação dos produtos de ligação em cepas de <i>E. coli</i> DH5α.....	77
3.2.3 Extração e Clivagem dos DNAs plasmidiais e do vetor de expressão pET28a (+)	78
3.2.4 Subclonagem dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> em vetor de expressão pET28 a(+).	79
3.2.5 Expressão das proteínas SELB e SELD em vetor de expressão pET 28 a(+).	80
3.2.6 Purificação da proteína SELD de <i>T. brucei</i> em resina de afinidade.....	82
3.3 Caracterização das proteínas recombinantes SELB e SELD de <i>T. brucei</i>	83
3.3.1 Focalização isoelétrica.....	83

3.3.2 Gel Nativo.....	84
3.3.3 Ensaios de cristalização.....	86
3.3.4 Imunoblotting.....	87
3.3.5 Imunolocalização.....	89
3.4 Resultados.....	91
3.4.1 Amplificação e clonagem dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> em vetores de clonagem pTZ57R/T e pGEM-T.....	91
3.4.2 Subclonagem dos genes <i>selB</i> e <i>selD</i> em vetor de expressão pET 28 a(+) e sequenciamento das construções plasmidiais.....	92
3.4.3 Testes de expressão e indução da construção SELB/pET 28 a (+).....	94
3.4.4 Expressão e purificação da enzima selenofosfato sintetase, SELD, em plasmídeo pET 28 a (+).....	95
3.4.5 Determinação do Ponto isoelétrico (pI).....	97
3.4.6 Experimento de gel nativo.....	97
3.4.7 Ensaios de cristalização da proteína SELD.....	98
3.4.8 Experimentos de Imunoblotting.....	99
3.4.9 Experimentos de Imunolocalização.....	100
3.5 Discussão.....	103

Capítulo 4 Isolamento de novas proteínas envolvidas na biossíntese de Selenoproteínas em *T.brucei* através do método “Tandem Affinity Purification” (TAP-PTP)

4.1 Introdução.....	107
4.2 Método de isolamento de proteínas “Tandem Affinity Purification” (TAP), (PTP).....	108
4.3 Materiais e Métodos.....	112
4.3.1 Amplificação dos genes <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> de <i>Trypanosoma brucei</i> e clonagem nos vetores pGEM-T e pCR4-TOPO.....	112
4.3.2 Subclonagem dos genes <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> de <i>T. brucei</i> em vetor	

apropriado para PTP-tagging: (PC-PTP-NEO).....	115
4.3.3 Transfecção de células de <i>Trypanosoma brucei</i> da linhagem 427.....	115
4.3.4 Experimentos de PCR e Imunoblotting para checar a obtenção de clones positivos em <i>T. brucei</i> 427.....	119
4.35 Preparação da amostra de células transfectadas para posterior purificação em sistema “PTP-tagging”.....	120
4.3.6 Método de purificação através do sistema “PTP-tagging”	120
4.3.7 Experimento de Imunoblotting e Imunolocalização das células de <i>T. brucei</i> 427 transfectada com o plasmídeo SELBTB/PC-NEO.....	122
4.4 Resultados.....	123
4.4.1 Resultado de amplificação dos genes <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> de <i>T. brucei</i> e clonagem nos vetores pGEM-T e pCR4-TOPO.....	123
4.4.2 Subclonagem dos genes <i>selB</i> , <i>pstk</i> e <i>secp43</i> de <i>T. brucei</i> em vetor pC-PTP-NEO.....	125
4.4.3 Transfecção das construções em vetor pC-PTP-NEO em células de <i>T. brucei</i> 427.....	127
4.4.4 Análises de integração e expressão das construções SELB/pC-PTP-NEO e PSTK/pC-PTP-NEO.....	128
4.4.5 Purificação das proteínas SELB e PSTK em sistema “PTP tagging”.....	130
4.4.6 Imunoblotting e Imunolocalização em células de <i>T. brucei</i> 427 transfectadas com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO.....	132
4.5 Discussão.....	135
 PERSPECTIVAS.....	138
REFERÊNCIAS.....	139

CAPÍTULO 1

Introdução

Os protozoários parasitas são responsáveis por doenças severas em países pobres e com populações marginalizadas. Dois gêneros pertencentes à família Trypanomatidae são alvos de estudos relevantes na parasitologia médica: *Leishmania* e *Trypanosoma*.

A tripanosomíase africana humana, conhecida como “Doença do sono”, é uma doença fatal quando não tratada. É causada pelo parasita *Trypanosoma brucei*, responsável por mais de 50.000 mortes anuais. Já as leishmanioses apresentam quatro formas clínicas da doença, de acordo com a resposta imune do hospedeiro humano e também causam 59.000 mortes a cada ano, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004), (<http://www.who.int/en>).

Uma das mais prevalentes doenças infecciosas nas Américas Central e do Sul, altamente endêmica no Brasil, é a doença de Chagas ou tripanosomíase americana. Essa doença de evolução crônica tem como agente etiológico, o parasita *Trypanosoma cruzi*. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde ocorrem 13.000 mortes anuais e estima-se que 18 milhões de pessoas estejam infectadas (BARRET et al., 2003), (<http://www.who.int/en>).

Atualmente, o tratamento de tais doenças ainda não é satisfatório, com poucos medicamentos e efeitos colaterais indesejáveis aos pacientes.

Devido à significativa importância de tais doenças, muitas pesquisas estão sendo realizadas no âmbito de encontrar novos alvos quimioterápicos a partir de informações estruturais de proteínas envolvidas em vias metabólicas (MÜLLER et al., 2003)

Este trabalho propôs-se a estudar uma das principais vias do processo de tradução: a via de síntese do aminoácido selenocisteína, ainda pouco explorada em Kinetoplastida (*Trypanosoma* e *Leishmania*).

1.1 Parasitas da espécie *Trypanosoma brucei*

Entre os protozoários flagelados, desprovidos de clorofila, destaca-se um grupo que apresenta uma estrutura bastante singular, o cinetoplasto (SIMPSON, 1972). O grupo constitui a ordem Kinetoplastida, onde a família Trypanosomatidae reúne grande número de espécies com caracteres muito homogêneos, todos parasitos, e dotados de um único flagelo. O cinetoplasto é parte da única mitocôndria existente na célula. No seio da matriz mitocondrial há uma estrutura filamentosa formada por ácido desoxirribonucléico, o nucleóide. Esse DNA é conhecido por kDNA e é capaz de auto-replicação (SIMPSON, 1987; REY, 2001).

Dois gêneros dessa família de flagelados são bastante estudados devido a sua grande importância médica, veterinária e econômica: *Trypanosoma* e *Leishmania*. Uma das espécies estudadas dentro desse gênero é o *Trypanosoma brucei*, causador da Tripanosomíase africana humana, conhecida como “Doença do sono”. O *T. brucei* apresenta as formas evolutivas: promastigota, epimastigota, metacíclia e tripomastigota (MATTHEWS, 2005), (Figura 1).

Essas formas evolutivas se diferenciam quanto à localização do cinetoplasto em relação à extremidade posterior da célula. Nas formas sanguíneas, tripomastigotas, o cinetoplasto situa-se próximo à extremidade posterior da célula, e permanece nessa região durante o ciclo celular até a citocinese. Por outro lado, o cinetoplasto se localiza entre o núcleo e a parte posterior da célula em promastigotas. Em células epimastigotas, o cinetoplasto é anterior ao núcleo central. As formas metacíclicas, altamente infectante, apresentam o cinetoplasto próximo ao extremo posterior, sem flagelo livre (Figura 1). As razões para que estas mudanças morfológicas ocorram durante o ciclo celular são desconhecidas, mas é provável que um aumento no comprimento do flagelo ao longo da célula ajude à mobilidade das formas sanguíneas, enquanto que em epimastigotas, o flagelo anterior ajudaria a incorporação de substrato ((MATTHEWS, 2005)).

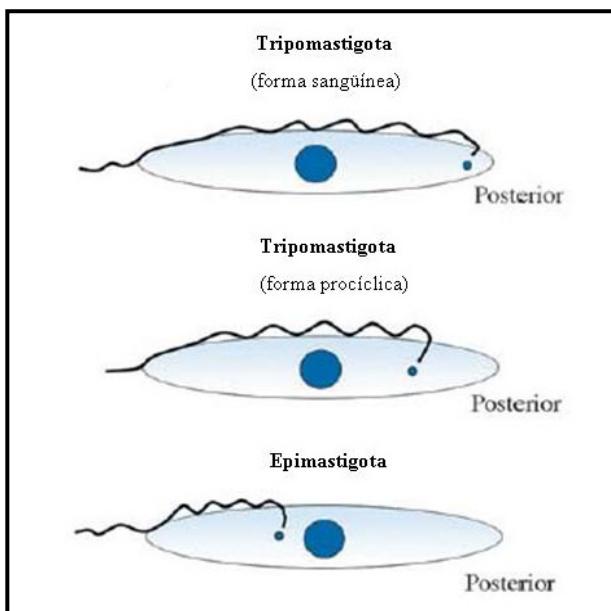


Figura 1. Posições que o cinetoplasto ocupa durante o ciclo de vida do *Trypanosoma*. Forma procíclica, o cinetoplasto está deslocado na região entre o núcleo e a extremidade posterior; a forma tripomastigota (forma sanguínea) apresenta o cinetoplasto na região posterior e a forma epimastigota, o cinetoplasto localiza-se próximo ao extremo anterior em relação ao núcleo. Figura extraída de MATTHEWS, 2005.

1.1.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*

O parasita *T.brucei* entra em contato com seu hospedeiro mamífero através da picada da mosca Tse-tsé (*Glossina* spp). No intestino do inseto, são geradas formas procíclicas que substituem a cobertura das glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs, “Variable Surface Glycoproteins”) por procíclinas (PARPs, “Procyclic Acidic Repetitive proteins”), também ancoradas à superfície da membrana pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (EL-SAYED et al., 2000; RODITI: LENIGER, 2002).

Após proliferar-se no intestino, o parasita migra para as glândulas salivares, onde são geradas formas epimastigotas, que se prendem à parede da glândula através da elaboração da membrana flagelar. Após várias multiplicações, o parasita retarda sua divisão, readquirindo sua cobertura de VSG e, desprendendo-se da glândula salivar e pode gerar formas metacíclicas infectantes não proliferativas, preparando-se para um novo ciclo em hospedeiro mamífero (EL-SAYED et al., 2000; MATTHEWS, 2005).

No novo hospedeiro, o parasita sobrevive livre na corrente sanguínea e é capaz de fugir à resposta humoral através de sua variação antigênica, devido à expressão seqüencial das VSGs (McCULLOCH, 2004; PAYS et al., 2004), (Figura 2).

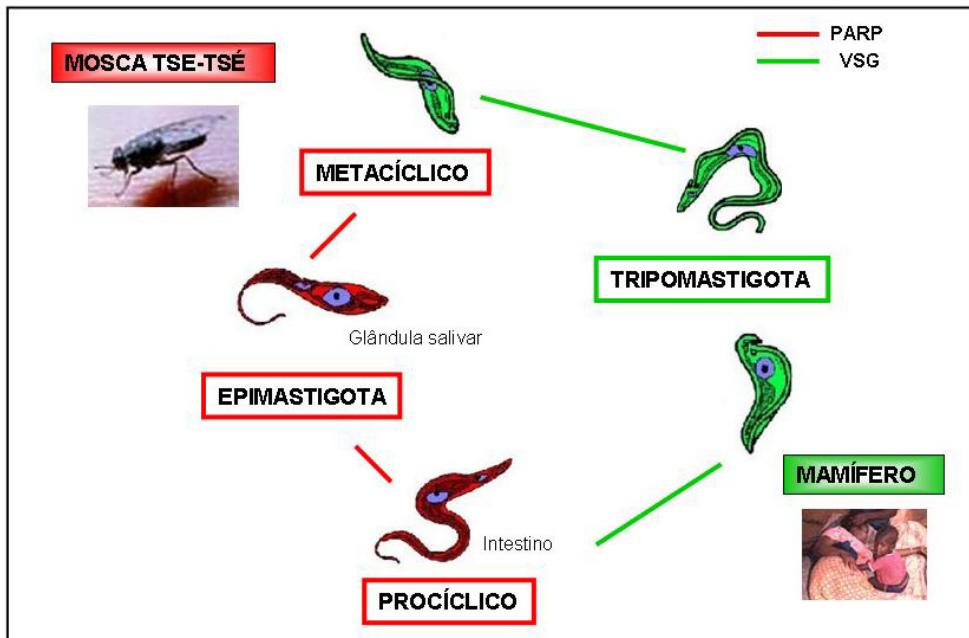


Figura 2. Ciclo de vida do *T. brucei*. No ciclo evidenciam-se três formas do parasita que sofre multiplicação: procíclica e epimastigota não infectantes (mosca) e a tripomastigota mais alongada no hospedeiro mamífero. E duas formas que não se multiplicam: a metacíclica infectante, desenvolvida no último estágio na mosca e a forma mais compacta e sanguínea no hospedeiro mamífero. Abreviações: VSG: glicoproteínas variáveis de superfície e PARP: procíclinas. Diagrama modificado de EL-SAYED, et al., 2000 e fotos extraídas do site (<http://www.who.int/en>).

1.1.2 Agente Etiológico e Distribuição global da Tripanosomiase africana humana

A Tripanosomiase africana humana, também conhecida como “Doença do Sono”, é causada por parasitas da espécie *Trypanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*), a qual é transmitida por moscas Tsé-tsé do gênero *Glossina* (Figura 3).



Figura 3. Agente etiológico e transmissor da doença do sono **A:** Agente etiológico da Tripanosomiase africana humana: *Trypanosoma brucei* e **B:** Agente transmissor da doença: mosca Tse-tsé do gênero *Glossina*. Figura extraída da fonte: (<http://www.who.int/en>).

A doença do sono ocorre em 36 países da África, com regiões endêmicas que se estendem do Senegal na África Ocidental, segue pela África Central até Uganda na África Oriental. O parasita *Trypanosoma brucei rhodesiense* infecta pessoas principalmente no leste e sul africano (Tanzânia, Moçambique, Quênia e Uganda) e a espécie *Trypanosoma brucei gambiense* ocorre na parte central e oeste da África (Congo, Camarões e Angola), (Figura 4). O *T. b. rhodesiense* também causa doença em gado e animais domésticos, conhecida como “Nagana”, fato que afeta acentuadamente a situação econômica no continente africano. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença afeta 300.000 a 500.000 pessoas, com 50.000 mortes anuais e com aproximadamente 1,6 milhões DALYs (Disability Adjusted Life Years), que é um índice que avalia potenciais anos de vida saudáveis perdidos devido à morte prematura, por condições precárias de saúde (<http://www.who.int/en>).

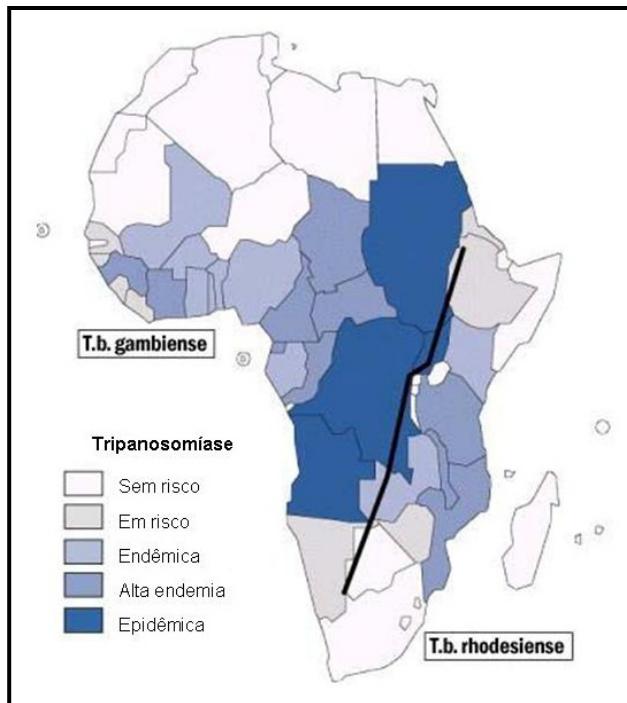


Figura 4. Distribuição geográfica da Doença do sono no continente africano em 1989. A região endêmica se estende do Senegal (África Ocidental) até Uganda (África Oriental). (<http://www.who.int/en>).

A transmissão da doença é feita através da picada da mosca Tse-tsé, onde formas tripo e epimastigota se multiplicam por divisão binária no proventrículo da mosca. No homem, formas tripomastigotas se multiplicam por divisão binária e são encontradas no sangue periférico e sistema linfático no início da infecção (NEVES, 2000). Esta primeira fase da doença os sintomas não são específicos, apenas com inchaço dos linfonodos, febre, dor de cabeça e nas articulações, o que dificulta o seu diagnóstico. A segunda fase, fase neurológica, se inicia quando os parasitas rompem a barreira hemato-encefálica e atingem o sistema nervoso central (SNC), causando alteração do estado mental, distúrbios sensoriais e problemas de coordenação. Também ocorrem algumas alterações nos sistemas endocrinológico, cardiovascular e renal. Se a doença não for tratada, sua progressão leva a distúrbios neurológicos e comportamentais severos, entre os quais: sonolência, coma e morte (BARRET et al., 2003), (<http://www.who.int/en>).

1.1.3 Tratamento da Tripanosomíase africana humana

O tratamento para doença do sono é difícil, especialmente quando a doença atinge a fase avançada no sistema nervoso central. Poucas drogas são efetivas no tratamento e causam toxicidade e resistência do parasita (DOCAMPO: MORENO, 2002).

- Pentamidina: é eficaz nos estágios iniciais da infecção por *T.b. gambiense* (fase aguda), porém por não cruzar facilmente a barreira hemato-encefálica, é destituída de efeito no sistema nervoso central. Não deve ser utilizada contra o *T.b. rhodesiense*, pois foi observado que em certas regiões foi desenvolvida uma resistência primária à droga. É administrada ao paciente 4 mg de base por quilo de peso do paciente, diariamente ou em dias alternados, até completar 7 a 10 injeções intramusculares, apresenta poucos efeitos colaterais (DOCAMPO: MORENO, 2002);

- Suramina: é muito mais ativa que a pentamidina, tanto para *T.b. gambiense* quanto para *T.b. rhodesiense*. Nos primeiros estágios pode destruir até 100% dos parasitas, porém é inativa mais tarde, quando atingem a barreira hemato-encefálica. É administrada através de injeções intravenosas: no primeiro dia, uma dose de ensaio 5 mg por quilo de peso corporal e, depois cinco injeções, com intervalos de sete dias, em dose de 20 mg/kg. Apresenta muitos efeitos colaterais, como febre, erupção papular irritativa, dores nas articulações e na planta dos pés. A insuficiência renal é contra-indicação formal ao uso dessa droga (DOCAMPO: MORENO, 2002);

- Melarsoprol: é um fármaco derivado do arsênico e único disponível para o tratamento da fase neurológica da doença. É usado tanto na infecção causada do *T.b. rhodesiense* quanto do *T.b. gambiense*. Seu uso é habitualmente precedido de uma ou mais injeções de medicamento da primeira fase (pentamidina ou suramina). A dose máxima, por injeção intravenosa, é de 3,6 mg por quilo do peso corporal, com três séries de três injeções diárias, separadas por intervalos de uma semana entre as séries.O uso deste medicamento

implica em graves efeitos colaterais, como reação local da aplicação da injeção, diarréia, encefalopatia, febre, dor de cabeça, tremores, dificuldades da fala, manifestações convulsivas, que pode ocasionar o coma e a morte de pacientes (BISSER et al., 2007);

- Eflornitina: originalmente desenvolvida para tratamento de câncer, apresenta eficácia somente contra o *T.b. gambiense*. Este medicamento causa menos efeitos colaterais que o Melarsoprol. A posologia, para adultos, é de 400 mg/kg por dia, dividida em quatro doses, durante 14 dias (CHAPPUIS et al., 2005).

1.2 Parasitas do gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania*, membro da família Trypanosomatidae, agrupa espécies de protozoários unicelulares com as formas evolutivas: promastigotas, formas flagelares, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e amastigota, sem flagelo livre, parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (CHAPPUIS et al., 2007), (Figura 5).

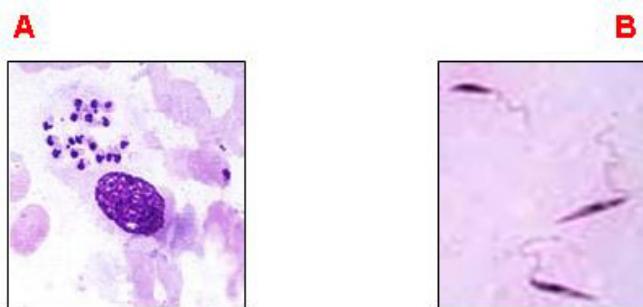


Figura 5. Formas promastigotas e amastigotas encontradas no gênero *Leishmania*. A: Formas amastigotas encontradas no sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado (www.who.int/tdr/diseases/leish/) e B: Os promastigotas encontrados no hospedeiro invertebrado (www.med-chem.com/Para/).

As amastigotas são formas ovais ou esféricas e em seu citoplasma são encontrados núcleo grande e arredondado ocupando um terço do corpo do parasita; cinetoplasto em forma de um pequeno bastonete. (NEVES, 2000; RITTIG: BOGDAN, 2000).

As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo livre e longo, emergindo do corpo do parasita na sua porção anterior. O núcleo é arredondado ou oval, e está situado na região mediana ou ligeiramente na porção anterior do corpo. O cinetoplasto, em forma de bastão, localiza-se na posição mediana entre a extremidade anterior e o núcleo. No intestino do inseto, as formas promastigotas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, que possuem o flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo, com mobilidade intensa. (NEVES, 2000; RITTIG: BOGDAN, 2000).

De acordo com a classificação taxonômica proposta por Lainson e Shaw em 1987, o gênero *Leishmania* foi agrupado em dois sub-gêneros:

1 – Subgênero *Leishmania*, que agrupa os seguintes complexos:

- Complexo *Leishmania donovani*: *L. (L.) donovani*; *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*.
- Provavelmente pertencente a este complexo: *L. (L.) archibaldi*.
- Espécies fora do Complexo *donovani*: *L. (L.) tropica*; *L. (L.) aethiopica*; *L. (L.) major* e *L. (L.) gerbilli* (parasita exclusivo de animais).
- Complexo *Leishmania mexicana*: *L. (L.) mexicana*; *L. (L.) amazonensis*; *L. (L.) venezuelensis*; *L. (L.) aristidesi* e *L. (L.) enriettii* (parasita exclusivo de animais).
- Possivelmente membros desse complexo: *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) garnhami*.
- Complexo *Leishmania hertigi* (espécies que parasitam exclusivamente animais): *L. (L.) hertigi* e *L. (L.) deanei*.

2 – Subgênero *Viannia*, que agrupa o complexo:

- Complexo *Leishmania braziliensis*: *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) panamensis*; *L. (V.) peruviana*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) shawi* e *L. (V.) colombiensis*.

1.2.1 Ciclo de vida da *Leishmania*

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas infectantes (metacíclicas) são inoculadas pelas fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sangüíneo. A saliva do inseto, inoculada durante o repasto, contém substâncias capazes de promover a vasodilatação que facilita o permeio de células para o local do repasto (LAINSON; RANGEL, 2005).

As formas promastigotas após contato com a pele caem na corrente circulatória do hospedeiro vertebrado. Durante a adesão do parasita e sua endocitose pelo macrófago, devido a causas fisiológicas, a célula hospedeira aumenta intensamente sua atividade respiratória, com liberação de radicais livres: óxidos, hidroxilas, hidróxidos, superóxidos (NEVES, 2000). Esses radicais são altamente lesivos para membranas celulares, porém os parasitas têm moléculas de superfície, como a GP-63 (glicoproteína) e LPG (complexo glicofosforoglicano), que são usadas como mecanismo de escape ao ataque desses radicais (SPÄTH et al., 2003).

O macrófago promove a fusão dos lisossomos com o fagossomo, então o parasita sofre a transformação para a forma amastigota, intracelular obrigatória. Após sucessivas multiplicações, por divisão binária simples, a célula hospedeira se rompe e os amastigotas liberados serão fagocitados por outros macrófagos (RITTIG; BOGDAN, 2000).

A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre no momento do repasto sangüíneo, onde são ingeridas formas amastigotas que acompanham o sangue e/ou linfa intersticial (HEPBURN, 2003), (Figura 6).

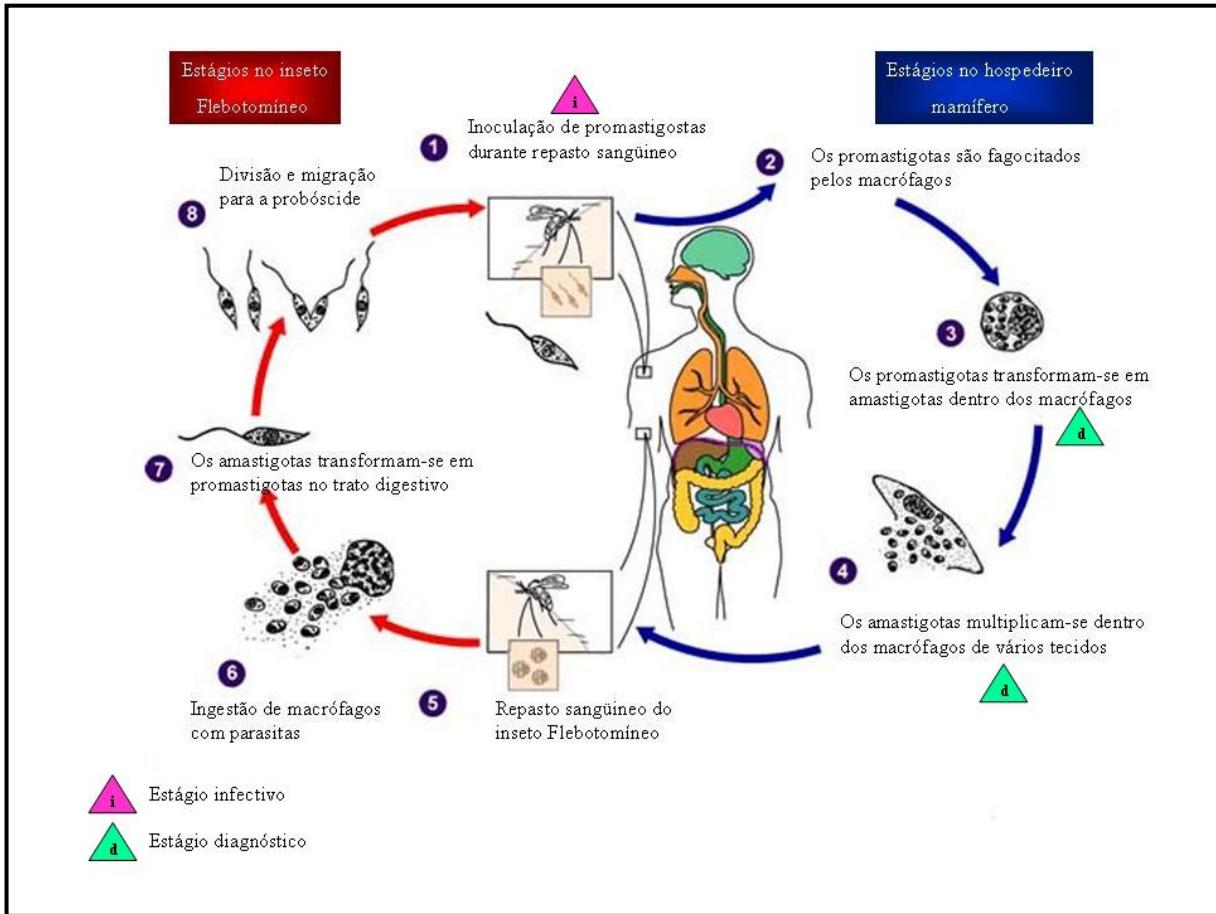


Figura 6. Ciclo de vida da *Leishmania*. O hospedeiro vertebrado é infectado com formas promastigotas durante repasto sanguíneo do inseto transmissor. Nos macrófagos essas formas evoluem para amastigotas, que rompem a célula e são novamente fagocitadas. Durante novo repasto sanguíneo, o hospedeiro invertebrado faz a ingestão de formas amastigotas. Na ilustração as setas vermelhas simbolizam todas as etapas ocorridas no inseto e as azuis as etapas ocorridas no hospedeiro vertebrado. O triângulo rosa representa o estágio infectivo da doença ocorrido no repasto sanguíneo e o triângulo verde estágio diagnóstico da doença. Figura extraída do site: (<http://www.dpd.cdc.gov>).

1.2.2 Leishmaniose e Distribuição global da doença

A Leishmaniose é a doença causada por parasitas do gênero *Leishmania*, a qual é transmitida pela fêmea hematófaga do inseto flebótomo *Lutzomyia*. O sangue ingerido no repasto é fonte de proteínas e aminoácidos, e a distribuição das leishmanioses pode estar relacionada à disponibilidade de fontes naturais de carboidratos. O inseto pode ser encontrado em ambientes silvestres, em abrigos de animais domésticos e também freqüentam o interior de domicílios (LAINSON: RANGEL, 2005), (Figura 7).



Figura 7. Agente transmissor de Leishmaniose: inseto flebotomo *Lutzomyia*. As fêmeas do flebotomo são hematófagas e inoculam os parasitas durante o repasto sanguíneo (www.who.int/).

A Leishmaniose é endêmica em oitenta e oito países nos quatro continentes. Infecções humanas causadas por *Leishmania* também são descritas em dezesseis países da Europa, incluindo França, Itália, Grécia, Malta, Espanha e Portugal. Mais que 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Nepal, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru (DESJEUX, 2004), (Figura 8).

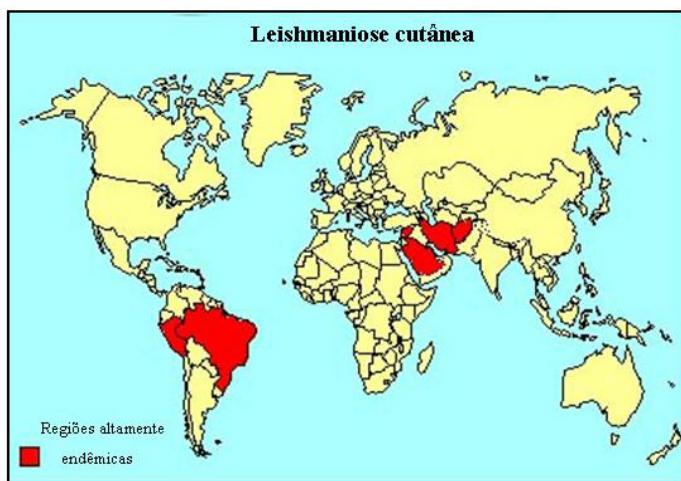


Figura 8. Regiões endêmicas de Leishmaniose cutânea. Alta predominância da forma cutânea na América do Sul, principalmente Brasil. Em vermelho, áreas altamente endêmicas. Extraído do site: (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html).

Os casos com 90% de incidência de leishmaniose visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão (Figura 9). Com 12 milhões de casos registrados, a doença causa 57.000

mortes anuais com DALYs (Disability Adjusted Life Years) de 1,98 milhões, sem a contagem de regiões epidêmicas (DESJEUX, 2004), (Figura 9), (www.who.int/).

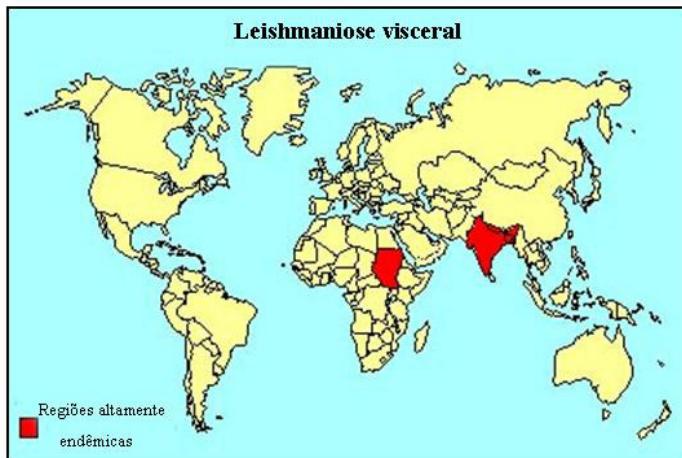


Figura 9. Regiões endêmicas de Leishmaniose visceral. Altamente predominante a forma visceral no continente africano (Sudão) e asiático (Índia). Em vermelho, áreas altamente endêmicas. Extraido do site: (http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html).

Segundo o Ministério da Saúde, o Brasil enfrenta a expansão e urbanização da leishmaniose visceral principalmente nas regiões Nordeste e Norte. Em número de casos, a região Nordeste representou entre os anos de 1990 a 2000, quase 90% dos casos do Brasil. Nos últimos anos, a letalidade da leishmaniose visceral no Brasil vem aumentando gradativamente, passando de 3,6 % no ano de 1994 para 6,7 % em 2003, o que representa um incremento de 85% (CARMO, 2002), (<http://tabnet.datasus.gov.br>). Entre 1980 a 2003, a forma cutânea apresentou coeficiente de detecção que oscilava entre 3,83 a 22,94 por 100.000 habitantes também com incidências nas regiões Norte e Nordeste. As espécies que causam a forma cutânea estão principalmente localizadas na região amazônica (*Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*) e no sul do Pará ao Nordeste, atingindo algumas áreas do centro-sul do país e Amazônia oriental (*Leishmania (V.) braziliensis*), (BRANDAO-FILHO, 1999), (<http://portal.saude.gov.br>).

1.2.3 Leishmaniose e suas manifestações clínicas

A leishmaniose apresenta quatro formas clínicas que se manifestam de acordo com a resposta imune do hospedeiro vertebrado.

1. Leishmaniose visceral (LV) - A leishmaniose visceral ou calazar é uma enfermidade infecciosa generalizada, crônica, caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia, edema e estado de debilidade progressivo, levando o paciente ao óbito se não for submetido ao tratamento específico (Figura 10). Os parasitas responsáveis pela leishmaniose visceral estão agrupados no complexo *donovani*, onde são reconhecidas três espécies que atuam como agente etiológico da doença: *Leishmania (L.) donovani*; *Leishmania (L.) infantum* e *Leishmania (L.) chagasi*, (CHAPUIS, 2007).

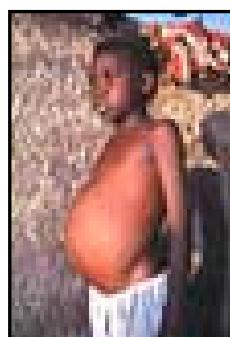


Figura 10. Manifestação clínica da leishmaniose visceral (LV). É possível evidenciar um dos sinais da doença bastante característico que é a hepatosplenomegalia. Foto extraída do site (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>).

Casos de co-infecção entre síndrome da imunodeficiência humana (HIV) e leishmaniose visceral têm sido descritos em 35 países. A imunossupressão de linfócitos T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV, causa diminuição da resposta celular e humoral importantes para o controle da infecção pela *Leishmania*, aumentando o risco da doença evoluir para a forma visceral. Ocorre diminuição da sensibilidade de testes sorológicos e aumento de falhas durante o tratamento (CHAPUIS, et al., 2007).

2. Leishmaniose cutânea (LC) – A leishmaniose cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme, com a epiderme ulcerada. A densidade de parasitas nas bordas da úlcera formada é grande nas fases iniciais da infecção, com tendência à escassez nas úlceras crônicas (Figura 11). As formas infectantes pertencem aos complexos “mexicana” (*L. (L.) amazonensis*) e “braziliensis” (*L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni*), (HEPBURN, 2003).



Figura 11. Manifestação clínica da leishmaniose cutânea (LC). Nesta figura pode ser observada a úlcera que se forma na epiderme quando o hospedeiro vertebrado adquire leishmaniose cutânea. Foto extraída do site: (www.nlm.nih.gov).

3. Leishmaniose mucocutânea (LMC) – Nas fases iniciais ocorre na forma cutânea e um dos aspectos típicos da leishmaniose mucocutânea é a freqüência com que o parasita produz, meses ou anos após a lesão primária, lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens. As regiões mais comumente afetadas são o nariz, faringe, boca, laringe. Em muitos casos ocorre completa destruição de toda estrutura cartilaginosa do nariz. O processo ulcerativo pode atingir lábios e se propagar pela face. Essas graves mutilações criam ao paciente dificuldade de respirar, falar e se alimentar. São freqüentes nesta fase, complicações respiratórias por infecções secundárias, podendo levar o paciente ao óbito. O agente etiológico da leishmaniose mucocutânea é a *L. (V.) braziliensis* (CHAPPUIS, 2007), (Figura 12).



Figura 12. Manifestação clínica da leishmaniose mucocutânea (LMC). Nesta figura pode ser observada uma grave mutilação com comprometimento de toda cartilagem e mucosa nasal. Foto extraída de NEVES, 1995.

4. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) – Caracteriza-se pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele, contendo grande número de amastigotas. Esta forma clínica é provocada por parasitas do complexo *mexicana*, cujo agente etiológico é *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) amazonensis*. A LCD está estreitamente associada a uma deficiência imunológica do paciente, onde a resposta imune celular está deprimida em relação a antígenos de *Leishmania*, levando-o a um estado de anergia imunológica frente à infecção estabelecida. A doença caracteriza-se por curso crônico e progressivo por toda a vida do paciente, não respondendo aos tratamentos convencionais (PINHEIRO et al., 2004; CHAPPUIS, 2007), (Figura 13).



Figura 13. Manifestação clínica da leishmaniose cutânea difusa (LCD). Nesta foto pode ser observada lesões difusas não ulceradas por toda a pele do braço do paciente, estas lesões contêm grande número de formas amastigotas. Foto extraída de NEVES, 1995.

1.2.4 Tratamento de Leishmanioses

Os tratamentos existentes para leishmaniose visceral ainda não são eficazes. Muitas vezes, são tratamentos que acontecem em longo prazo através de administração parenteral e apresentam custo alto. O agente antimonal pentavalente, considerado droga de primeira linha, apresenta alta toxicidade, incluindo arritmia cardíaca e pancreatite. Também há relatos de resistência do parasita ao tratamento no uso do agente antimonal pentavalente (GUERIN et al., 2002).

A segunda linha de medicamentos, pentamidina e anfotericina B, são potentes contra as formas promastigotas e amastigotas do parasita, porém são relatados muitos efeitos colaterais como hipotassemia, nefrotoxicidade e alterações cardiovasculares (GUERIN et al., 2002; CHAPPUIS et al., 2007). A anfotericina B lipossomal é considerada por muitos pesquisadores a melhor droga atual no tratamento de leishmaniose visceral e é a primeira escolha no tratamento realizado nos Estados Unidos e Europa, porém seu custo é muito alto e a Organização Mundial de Saúde tenta a redução drástica no preço desse medicamento para países onde esta enfermidade é altamente endêmica. A miltefosine, a qual foi inicialmente desenvolvida para uso em tratamento de câncer, é a primeira droga efetiva com administração oral. Porém, esse medicamento tem uma meia-vida longa (150 horas) e a resistência do parasita é facilmente induzida *in vitro* (CROFT et al., 2006). A paromomicina, conhecida como aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo com boa atividade anti-*Leishmania*, demonstrados pelos primeiros resultados na Índia e África, além disso, apresenta um amplo espectro contra outros patógenos, incluindo bactéria, com baixo custo. Entretanto, o original fabricante da paromomicina abandonou a produção (CROFT et al., 2006; CHAPPUIS et al., 2007). Sitamaquina, 8-aminoquinolina, demonstrou evidência de eficácia há vinte anos em estudos realizados no Brasil, Quênia e Índia, porém apresentou sérios problemas renais. Novos estudos envolvendo esta droga serão retomados na Índia (CROFT et al., 2006). A

anfotericina B lipossomal foi recomendada como primeira linha de terapia para co-infecção HIV/*Leishmania* durante encontro da Organização Mundial de Saúde em 2007 (CHAPPUIS et al., 2007).

No Brasil, a droga de escolha é o antimoníato de N-metil glucamina. Vários são os esquemas terapêuticos preconizados, porém é recomendado o uso da droga na dose de 1 mL/5 kg diários, não ultrapassando 10 mL. As injeções são administradas em séries diariamente por 10 dias consecutivos, com intervalos de descanso de 10 dias e nova série de injeções até completar o restabelecimento do paciente. A segunda droga de escolha é o isoticianato de pentamidine ou anfotericina B. A dose de 1mg/kg/dia de anfotericina B durante 14 dias consecutivos foi utilizada em oitenta pacientes, com idades variando de 6 meses a 19 anos, com índices de cura de 97% (OSTROSKY-ZEICHMER et al., 2003), (<http://portal.saude.gov.br>).

Também é utilizado o antimônio pentavalente no tratamento de leishmanioses cutânea e mucocutânea com dose recomendada pela Organização Mundial de Saúde de 20 mg/Sb⁺⁵/kg/dia, durante 30 dias seguidos com administração em ambiente hospitalar (SANTOS et al., 2002). A anfotericina B é a droga de segunda escolha, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com antimônio ou na impossibilidade de seu uso. A anfotericina B é também a droga de escolha para o tratamento de pacientes grávidas. A dose recomendada é de 1mg/kg/dia em dias alternados, sem, contudo ultrapassar a dose de 50 mg em cada aplicação e a administração deve ser via intravenosa (OSTROSKY-ZEICHMER et al., 2003), (<http://portal.saude.gov.br>).

1.3 Selênio e suas implicações

O selênio é um elemento químico não metálico essencial para diversas formas de vida, incluindo bactérias e mamíferos. O selênio é incorporado à dieta pela ingestão de vegetais,

carne, peixes, ovos e de cereais como a castanha-do-pará que é uma fonte rica de selênio. O selênio encontrado nas células e tecidos é variável com 30% no fígado, 15% no rim, 30% nos músculos e 10% no plasma sanguíneo (ZACHARA et al., 2001), (<http://www.who.int/en>).

Este micronutriente desempenha função importante na saúde humana. A doença de Keshan, descrita na literatura chinesa há cem anos, está relacionada à deficiência de selênio no solo destinado a agricultura das regiões leste (norte) e do oeste (sul) da China. Esta endemia se manifesta em crianças de 2 a 10 anos e mulheres adolescentes. A doença de Keshan, um distúrbio causado por um vírus e que lesa o miocárdio (músculo cardíaco), tem como manifestações clínicas: fadiga, após exercícios físicos, arritmia e insuficiência cardíaca com palpitações, perda do apetite, cardiomegalia, com necrose e fibrose do miocárdio. Esta doença pode ser prevenida com a administração de suplementos de selênio (GE: YANG, 1993), (<http://www.who.int/en>).

Outra endemia também relacionada à falta de selênio no solo é a doença de Kaschin-Beck. Esta doença ocorre geralmente em crianças de 5 a 13 anos na China e na região leste (sul) da Sibéria. Esta doença é caracterizada por necrose nas articulações com degeneração das articulações de braços e pernas, resultando no retardamento ou atrofia de dedos e ossos longos (GE: YANG, 1993; LI et al., 1984). Um decréscimo espontâneo na incidência da doença de 1970 (44% portadores), 1980 (14% portadores) e 1986 (1% portadores), foi atribuído à melhora das condições nutricionais de comunidades rurais da China (LI et al., 1984), (<http://www.who.int/en>).

A deficiência de selênio também se reflete em pacientes com hipotiroidismo e doenças cardiovasculares (ARTHUR et al., 1993; STRANGES et al., 2006)). Os primeiros estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos demonstraram que dietas pobres em selênio e aumento da incidência de mortalidade em pacientes com câncer são fatores que estão relacionados (GANther, 1999; BIRRINGER et al., 2002). Dados descritos pela Prevenção

Nutricional do Câncer (NPC) indicam que uma dieta suplementada com 200 µg/dia de selênio resulta em uma redução de 49% da incidência de câncer de próstata (DIWADKAR-NAVSARIWALA et al., 2006)

O selênio parece estar associado com a progressão e alta mortalidade em pacientes HIV positivos. Acredita-se que a deficiência do sistema antioxidante aumente a morte induzida e programada de linfócitos (apoptose) e promove a ativação do genoma viral e facilita a indução da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). Existem especulações sobre a possibilidade de o vírus consumir selênio para produção de selenoproteínas virais (BIRRINGER et al., 2002).

1.4 Selenoproteínas

Umas das principais formas de incorporação do selênio é na forma de um aminoácido denominado selenocisteína (Sec, U), que é incorporado co-traducionalmente ao polipeptídio nascente em posições específicas do códon UGA, que normalmente é reconhecido como códon de parada (“stop-codon”) (ZINONI et al., 1986; CHAMBERS et al., 1986; LEE et al., 1989).

A selenocisteína é um aminoácido presente em muitas enzimas de organismos pertencentes às linhagens eubactéria, arqueobactéria e eucariotos (FORCHHAMMER et al., 1991). Este aminoácido é análogo a cisteína se diferenciando pela substituição de um átomo de enxofre pelo átomo de selênio em sua cadeia lateral.

As selenoproteínas, como são conhecidas as proteínas que contém esse aminoácido raro em sua constituição, tem o elemento selênio como principal forma ativa que participa do sítio catalítico de várias enzimas.

Muitas selenoproteínas, incluindo selenofosfato sintetase, glutationa peroxidase entre outras, são comuns em procariotos e eucariotos. A mais abundante selenoproteína encontrada

em procariotos é a formato dehidrogenase (FDH) (ZINONI et al., 1986). O resíduo de selenocisteína nesta proteína é coordenado pelo molibdênio e diretamente envolvido na oxidação do formato para dióxido de carbono (GLADYSHEV et al., 1994; BOYINGTON et al., 1997). Em muitas bactérias, a formato dehidrogenase é a única selenoproteína encontrada e deve ser responsável pela manutenção de selenocisteína nesses organismos (ROMERO et al., 2005).

Em 1973, Rotruck e seus colaboradores identificaram a primeira selenoproteína em mamíferos, a glutationa peroxidase (GPx1). Encontra-se descrito em literatura a existência de oito glutationa peroxidases em mamíferos, sendo que cinco são selenoproteínas (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4 e GPx6). A glutationa peroxidase GPx4, também conhecida como PHGPx, destaca-se por ser essencial durante a embriogênese em mamíferos (YANT, et al, 2003). Além de sua função como antioxidante, esta proteína está envolvida estruturalmente na maturação do esperma e na formação sítio específica da ponte dissulfeto (URSINI et al., 1999; HATFIELD et al., 2006; CONRAD et al., 2007).

Outras selenoproteínas também muito estudadas em mamíferos são a tirredoxina redutase (TR) e a selenoproteína P. As tirredoxinas são pequenas proteínas envolvidas no sistema antioxidante celular com uma essencial função no metabolismo e reparo de DNA, transcrição e comunicação celular, além de proteger as células contra danos oxidativos (ARNER: HOLMGREN, 2000; NORDBERG: ARNER, 2001; CONRAD et al., 2004).

Duas isoenzimas (TR 2 e TR3) em adição com a TR 1 foram identificadas em humanos e ratos. Todas as três tirredoxina redutases contém um resíduo de selenocisteína que está localizado na penúltima posição do carboxi terminal, o qual é codificado pelo códon UGA (SUN et al, 1999). A TR1 (TrxR1, TxnRd1) é uma proteína citosólica que controla o estado de redução da tirredoxina, já a tirredoxina/glutationa redutase (TGR) também conhecida como TR2 e Trx3 é uma proteína que comparada as demais tirredoxina redutases

tem um domínio adicional N-terminal glutaredoxina, que a torna capaz de catalisar reações específicas para os sistemas tirredoxina e glutationa (SUN et al., 2001). Esta proteína foi recentemente descrita na formação e isomerização das pontes dissulfeto durante a maturação do esperma (SU et al., 2005; HATFIELD, et al., 2006). A tirredoxina redutase TR3 (TrxR2) é uma proteína mitocondrial que também participa das reações de oxi-redução. As tirredoxinas citosólicas (Trx1) e mitocondrial (Trx2) são importantes por participarem ativamente nos processos de proliferação e apoptose durante a primeira fase da embriogenese estudada em ratos (NONN et al., 2003; CONRAD, et al., 2004).

A selenoproteína P (Sel P) apresenta múltiplos resíduos de selenocisteína em sua constituição (BURK: HILL, 2005). A Sel P humana tem 10 resíduos de selenocisteína (Sec, U) e zebrafish apresenta 17 resíduos Sec, entretanto a Sel Pb de zebrafish contém um único resíduo Sec (KRYUKOV: GLADYSHEV, 2000). A Sel P é a maior selenoproteína encontrada no plasma e é sintetizada no fígado e direciona selênio a outros órgãos e tecidos (HILL et al., 2003; SCHOMBURG et al., 2003, BERRY: GLADYSHEV, 2006). A ausência ou redução de Sel P, em ratos, resulta em uma disfunção neurológica em que o cérebro mostra-se sensível a deficiência de selênio, o que implica que esta selenoproteína é parte crucial do mecanismo que mantém preferencialmente o suprimento de selênio para o cérebro (SCHOMBURG et al., 2004; SCHARPF et al., 2007).

1.4.1 Biossíntese de selenocisteína em procariotos e eucariotos

Na biossíntese de selenocisteína (Sec), o primeiro passo consiste na aminoacilação de tRNA^{Sec} (SelC) com uma serina por uma seril-tRNA sintetase (SerRS), (BÖCK et al., 1991). SelC está descrito na seção 1.4.2. Revisado por Krol, em 2002, a conversão de serina em selenocisteína está bem estabelecida em *Escherichia coli*, mas ainda não está elucidada em eucariotos. Na *E. coli*, a enzima selenocisteína-sintase (SelA), dependente de piridoxal 5'

fosfato, remove o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário aminoacrilil, este intermediário serve como acceptor de seleno-fosfato gerando a selenocisteína (BÖCK et al., 1991; KROL, 2002). O seleno-fosfato é obtido através da fosforilação de selenito ou selenocisteínas, a partir de ATP, pela enzima seleno-fosfato sintetase (SelD), (LEINFELDER et al., 1990). Dessa forma, selenocisteína está preparada para ser incorporada ao polipeptídeo nascente (Figura.14).

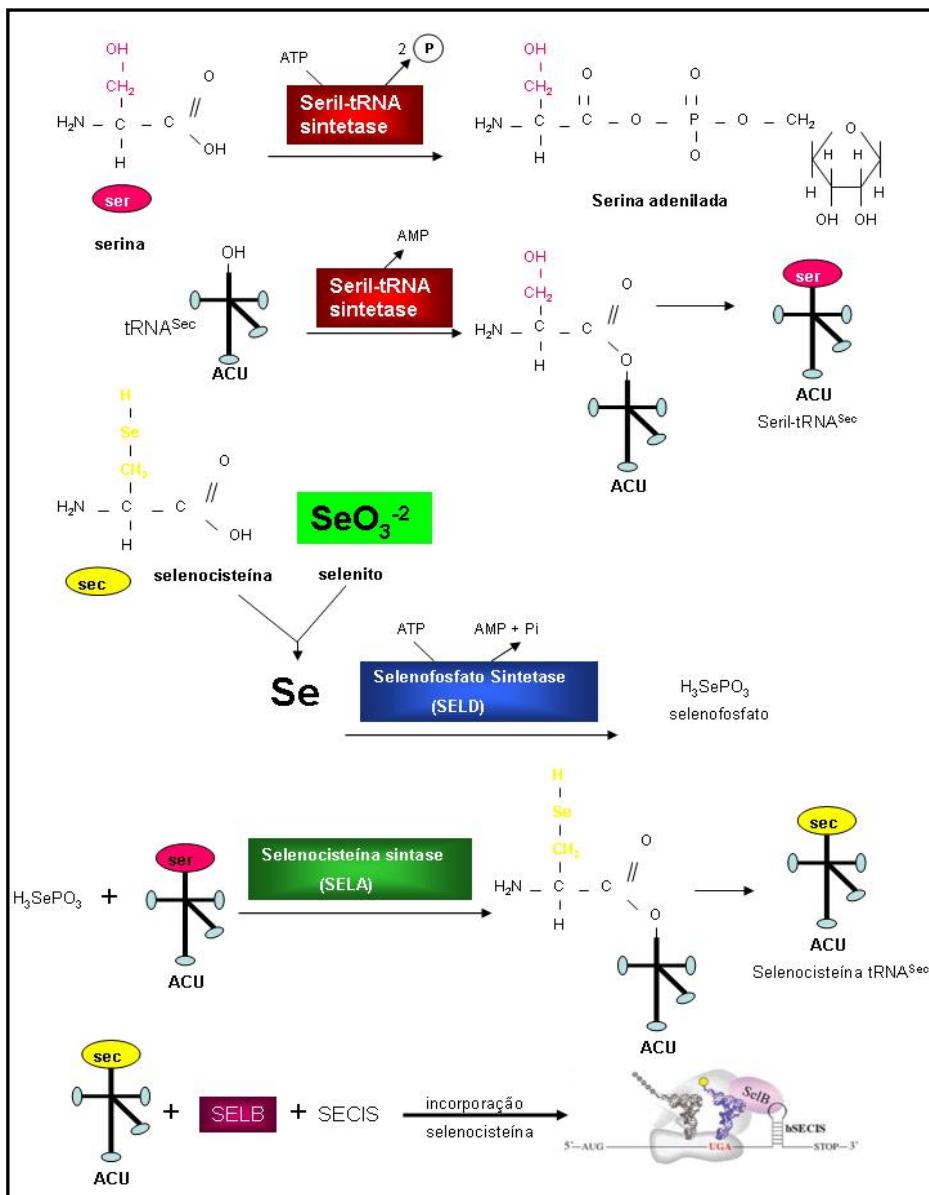


Figura 14. Biossíntese e incorporação de selenocisteína em *E.coli*. A ilustração demonstra passos fundamentais envolvidos no processo: aminoacilação do tRNA^{Sec} pela seril-tRNA sintetase; a SELA que participa da formação do acceptor de seleno fosfato e SELD que atua na fosforilação de selenito ou de selenocisteínas, assim como SELB (fator de elongação) que participa da incorporação de selenocisteína. Figura de incorporação de selenocisteína extraída de COBUCCI-PONZANO et al., 2005.

Em eucariotos, a biossíntese e incorporação de selenocisteína requerem um complexo supramolecular, onde a dinâmica desse complexo é fundamental no aumento da eficiência de incorporação de selenocisteína, assim como na reciclagem de fatores que atuam na biossíntese. No modelo de biossíntese proposto por Small-Howard e colaboradores em 2006, sugere que passos preliminares ocorrem no citoplasma, mas a maturação do tRNA^{Sec} é realizada no núcleo como demonstrado para outros tRNAs aminoacilados (LUND: DAHLBERG, 1998).

Na literatura, foram descritas em eucariotos duas seleno-fosfato sintetasas (SPS1 e SPS2) homólogas a SELD. Em 1995, um homólogo de *selD* foi descrito por Low e seus colaboradores e posteriormente foi designado por *Sps1*. O cDNA de *selD* humano (*Sps1*) mostrou ser funcional em células de mamíferos e bactéria. A selenofosfato sintetase humana apresentou 32% de homologia com a proteína em bactéria, porém com regiões altamente conservadas com similaridade a domínio de ligação de proteína ATP/GTP, rico em seqüências do aminoácido glicina.

Através de busca em genomas, foram identificados homólogos originais de *selD* em humano, rato, *Haemophilus influenzae* e *Methanococcus jannaschii*, os quais apresentaram o códon Sec (TGA) correspondente ao sítio ativo predito da enzima. Esse homólogo de rato e humano caracterizado nesse trabalho foi designado por *Sps2* (GUIMARÃES et al., 1996). Análises de Northern blot demonstraram que *Sps2* é preferencialmente expressa em tecidos onde selenoproteínas são produzidas: fígado, rim e testículo, seguidos por sítios de células sangüíneas em desenvolvimento, como medula óssea (BERRY, 1991; KARIMPOUR et al., 1992; HILL et al., 1993). O gene *Sps2* foi mapeado no cromossomo sete e seu transcrito demonstrou ser autoregulável em linfócitos T. Através de experimentos para expressão de SPS2, obtida do isolamento do gene *Sps2* de células do tecido hematopoietico de rato, foram observados a incorporação de ⁷⁵Se e o códon TGA em fase aberta de leitura. Esses resultados

sugerem que SPS2 participa de um mecanismo auto regulatório envolvendo a incorporação de Sec, a qual é relevante na biossíntese de células sanguíneas. Um fator importante nesse processo regulatório é que selenocisteína presente na célula, possivelmente de expressão basal é necessário para produção de SPS2. Esta expressão poderia ser realizada por SPS1 em células de mamíferos, desde que esta homóloga SPS não requer selenocisteína para sua produção e é capaz de manter a taxa basal de monoselenofosfato e selenocisteína (GUIMARÃES et al., 1996).

O principal ponto que falta para elucidar a via de biossíntese de selenocisteína em eucariotos é a selenocisteína sintase (homóloga a SELA). Existem indicações em eucariotos e arqueobactérias de haver a necessidade de dois passos enzimáticos que substituem a atividade realizada por SELA, uma fosforilação da serina, seguida pela selenilação da mesma. Em uma primeira etapa, o tRNA^{Sec} é carregado com uma serina pela SerRS, onde esta reação já está bem estabelecida em eucariotos (WU; GROSS, 1993; OHAMA et al., 1994; STURCHLER-PIERRAT, 1995; GESLAIN et al., 2006). O tRNA^{Sec} é dependente de fosfo-serina (Sep), então a enzima Fosfo-Seril-tRNA^{Sec} Kinase (PSTK) faz a conversão de Ser-tRNA^{Sec} para Sep-tRNA^{Sec}, ou seja, PSTK fosforila a serina. Em uma segunda etapa, Sep-tRNA^{Sec} atua como um precursor para outra enzima, Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase (SepSecS), a qual converte Sep-tRNA^{Sec} para Sec-tRNA^{Sec} (Figura 15). Os genes arqueobactéria e humano *SepSecS* complementaram in vivo uma cepa de *E. coli*, onde o gene de *selA* havia sido deletado. A complementação só foi observada quando *SepSecS* foi cotransformado com o gene que codifica PSTK para *Methanococcus jannaschii* (YUAN et al., 2006).

A proteína SepSecS era denominada anteriormente como SLA/LP (soluble liver antigen /liver pancreas), uma ribonucleoproteína antigênica humana que forma um complexo com o tRNA^{Sec} em pacientes que sofrem de hepatite auto-imune crônica (GELPI et al., 1992). Esta proteína foi classificada computacionalmente como serina hidroximetil-

transferase piridoxal fosfato dependente (PLP dependent) que poderia exercer a função de SELA em eucariotos (KERNEBECK et al., 2001).

Em 1970, foi descrita a atividade de uma enzima kinase, encontrada em fígado de galo, que fosforilava a menor espécie de seril-tRNA para formar fosfoseril-tRNA (MÄENPÄÄ: BERNFIELD, 1970). No mesmo ano, também foi descrita uma menor espécie de seril-tRNA que codificava para o códon não-sense UGA, identificado em fígado de bovinos, coelhos e frangos (HATFIELD: PORTUGAL, 1970). Ambas as espécies de seril-tRNAs foram identificadas como selenocisteína tRNA^{Sec}, mas a atividade da kinase permaneceu elusiva. Experimentos desenvolvidos por Carlson e seus colaboradores no ano de 2004, através de busca em banco de dados de genomas, detectaram um gene de mamífero candidato a fosfoseril tRNA kinase (*pstk*). O produto de expressão PSTK de camundongo mostrou fosforilar o domínio seril na seril-tRNA^{Sec} na presença de ATP e Mg⁺². Proteínas homólogas para PSTK em mamíferos ocorrem em *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Methanopyrus kandleri* e *Methanococcus jannaschii*, sugerindo que PSTK tem sua função conservada em arqueobactérias e eucariotos que sintetizam selenoproteínas e ausência de sua função em bactérias, plantas e leveduras. Pelo fato da PSTK estar altamente conservada na evolução, desempenha papel importante na biossíntese e regulação de selenocisteína (CARLSON et al., 2004).

Um fato intrigante na biossíntese de eucariotos é que *Plasmodium falciparum* codifica para selenocisteína, mas os genes que expressam SELA e PSTK não foram encontrados (MOURIER et al., 2005; LOBANOV et al., 2006; YUAN et al., 2006). Também não foram relatados sitios de reconhecimento para PSTK e SepSecS no tRNA^{Sec}. Esses fatores vêm a contribuir com a idéia de uma terceira via para formação de selenocisteína em alguns organismos. (YUAN et al., 2006).

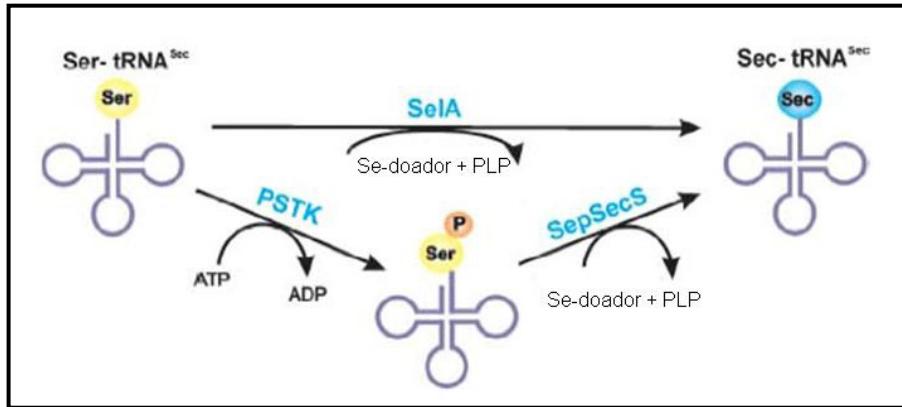


Figura 15. Mecanismo funcional de SELA em bactéria e de PSTK/SepSecS em arqueobactéria e eucariotos. Em bactéria, SELA, enzima dependente de piridoxal 5' fosfato (PLP), participa na formação do acceptor de selenofosfato e geração do aminoácido selenocisteína. No modelo proposto, em arqueobactérias e eucariotos, PSTK faz a fosforilação da serina e SepSecS (PLP dependente) a selenilação de serina com conversão Sep-tRNA^{Sec} para Sec-tRNA^{Sec}. Figura extraída de YUAN et al., 2006.

Além dos genes homólogos que codificam para seril-tRNA sintetase (SerRS), selenofosfato sintetase (SPS1 e SPS2) e do fator de elongação EFsec (SELB), muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos e tem identificado algumas proteínas em associação com elemento SECIS em mamíferos ou com anticorpos auto-imunes que reconhecem complexos proteína-tRNA^{Sec} (GELPI et al., 1992; SHEN et al., 1995; HUBERT et al., 1996). Dessa forma, uma proteína ligante de RNA que se associa especificamente com selenocisteína tRNA^{Sec} em mamíferos foi identificada e denominada SECp43. A proteína SECp43 é altamente conservada com dois domínios de ligação ribonucleoproteicos e seu carboxiterminal apresenta preferencialmente resíduos polares/ácidos. A aplicação de extratos de células Hela nativa em coluna de afinidade com anticorpo resultou na purificação de um RNA com 90 nucleotídeos identificado por sequenciamento e análise de Nothern blot como um tRNA^{Sec}. A proteína SECp43 recombinante marcada com ³²P radioativo mostrou haver interação com uma proteína de 48 kDa, a qual pode ser um possível componente da via de incorporação da estrutura SECIS em mamíferos (DING: GRABOWSKI, 1999). Estudos posteriores revelaram que esta proteína de 48 kDa corresponde ao tamanho da SepSecS (SLA/LP), (SMALL-HOWARD et al., 2006).

A proteína SepSecS (SLA/LP) se liga ao pré- tRNA^{Sec} e pode participar do fim do processamento do tRNA, facilitando a formação correta da estrutura do pré- tRNA. É possível que o tRNA^{Sec} se ligue a SepSecS ainda no núcleo. (WOLIN: MATERA, 1999). Não há evidências que SECp43 e SepSecS estão ligadas no mesmo domínio ribonucleoproteíco, já que SECp43 está ligada ao tRNA^{Sec} maduro e é predominantemente citoplasmática (DING: GRABOWSKI, 1999). Quando SPS1 e SepSecS foram expressas individualmente em expressão transiente em células humana embrionárias de rim (HEK 293) e em associação com tRNA^{Sec}, SepSecS foi detectada somente na fração citoplasmática e SPS1 foi encontrada em ambas frações citoplasmática e nuclear. A Co-expressão de SPS1 e SepSecS resultou em uma leve redistribuição de SepSecS na fração nuclear e co-precipitação de SPS1, SepSecS e SECp43 também foram localizadas no citoplasma e núcleo, o que indica a formação de complexos entre citoplasma e núcleo na biossíntese e incorporação de selenocisteína em eucariotos (SMALL-HOWARD et al., 2006), (Figura 16). Muitas proteínas e complexos que participam da via de selenocisteína são reciclados e em adição, o selênio é obtido de selenoproteínas com a participação da enzima selenocisteína liase (LACOURCIERE: STADTMAN, 1998).

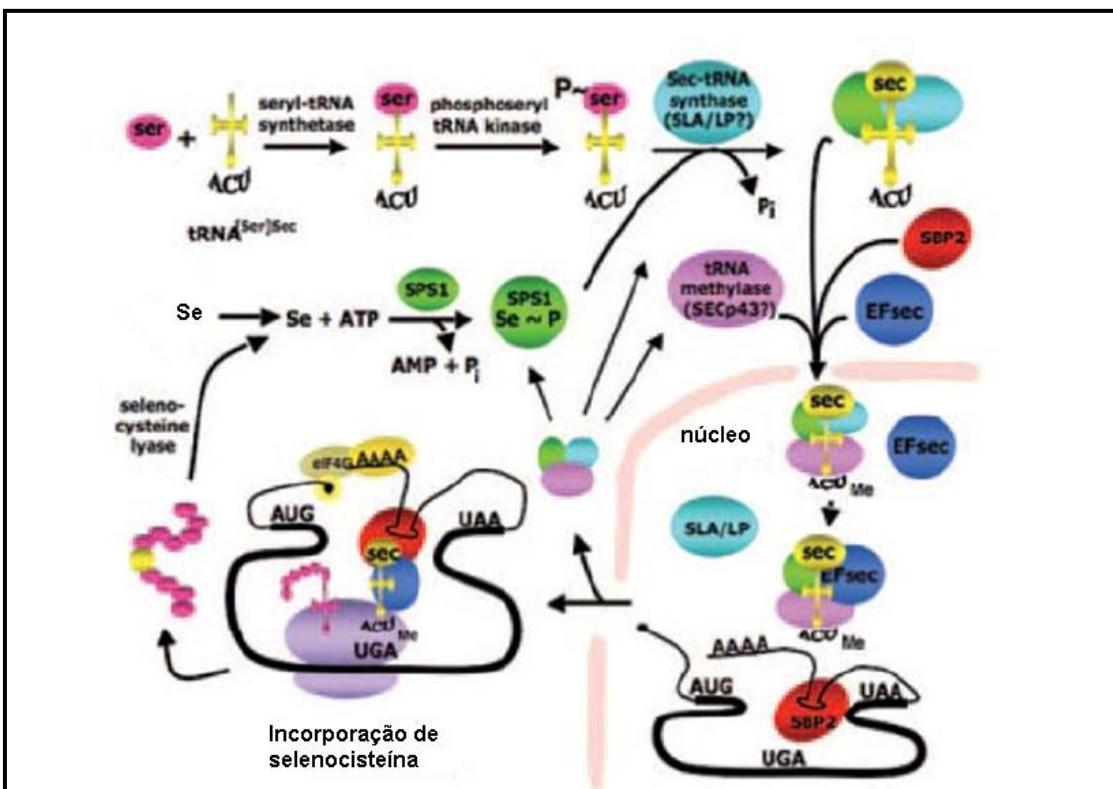


Figura 16. Modelo para biossíntese e incorporação de selenocisteína em eucariontes. A serina é então fosforilada pela PSTK. Um complexo protéico se associa ao tRNA^{Sec} contendo SECp43, SLA/LP (SepSecS), EFSec (SELB), SPS1 e SBP2 para transformar a serina em selenocisteína e apresentar o tRNA^{Sec} ao ribossomo. Figura extraída de SMALL-HOWARD *et al.*, 2006.

1.4.2 Incorporação de selenocisteína

A selenocisteína (Sec), também conhecida como o vigésimo primeiro aminoácido, requerer uma complexa maquinaria molecular para sua biossíntese e posterior incorporação em um códon interno UGA em fase.

Para a incorporação deste aminoácido raro nas proteínas são necessários vários componentes, que estão detalhados na figura 19, observa-se que são necessários para a incorporação de Sec no polipeptídeo nascente elementos no próprio RNA mensageiro (SECIS), um tRNA específico (SelC), um específico fator de elongação (SelB), além de proteínas auxiliares (SBP2), (COBUCCI-PONZANO *et al.*, 2005).

O processo de tradução na síntese de proteínas apresenta uma molécula fundamental, o tRNA. Essa molécula adaptadora, responsável por traduzir a seqüência de nucleotídeos em

aminoácidos, apresenta uma estrutura global em forma de folhas de trevo com braços estruturais: braço D ou diidrouridina, braço T ψ C ou T-pseudouridina-C, braço extra ou variável e dois braços com função crítica de adaptação: braço do aminoácido (AA), que transporta um aminoácido específico que se liga ao grupo OH na extremidade 3' do tRNA, e o braço do anticódon, onde ocorre interação do mRNA e tRNA nos ribossomos, (NELSON: COX, 2000), (Figura 17 A).

O RNA transportador específico para a incorporação de Sec é denominado tRNA^{Sec} (selC), este tRNA possui um anticódon UCA, correspondente à serina, no entanto, também reconhece o códon UGA. SelC possui características estruturais distintas dos demais tRNAs (Figura 17 B), e portanto não é reconhecido pela maquinaria normal que adiciona tRNAs aminoacilados ao peptídeo nascente pela via ribossomal.

O tRNA^{Sec} é responsável pela limitada síntese de selenocisteína quando interagem entre si, já que selenocisteína livre poderia ser incorporada a proteína nascente ao invés de cisteína, causando disfunções estruturais na proteína, (YOUNG: KAISER, 1975). Embora as seqüências sejam muito diferentes, a estrutura secundária é similar entre tRNA^{Sec} de procariotos e eucariotos: o tamanho total do braço T ψ C e do braço do aminoácido é de 13 pb ao invés de 12 pb e eles tem 6 pb no braço D ao invés de 3 ou 4 pb de tRNAs comuns, (SHÖN et al., 1989; BARON et al., 1993b; STURCHLER et al. 1993; TORMAY et al., 1994). Todos tRNA^{Sec} de eucariotos tem o mesmo tamanho e pode apresentar a mesma estrutura secundária (Figura 17B). As hélices do braço do aminoácido (AA) e do braço T ψ C formam o pequeno domínio da estrutura tridimensional em forma de “L” compartilhada por todos os tRNAs, (AMBERG et al., 1996).

O tRNA^{Sec} tem características estruturais secundárias distintas e uma delas é o braço extra longo, responsável pelo reconhecimento da seril-tRNA sintetase (SerRS), além do braço acceptor alongado para ligação do fator de elongação (SELB), (BARON: BÖCK, 1991). Uma

progressiva alteração na orientação do braço extra do tRNA^{Sec} causa alteração no emparelhamento de nucleotídeos na estrutura secundária e reduz a ligação de serina e a síntese de selenocisteína, (AMBERG et al., 1996).

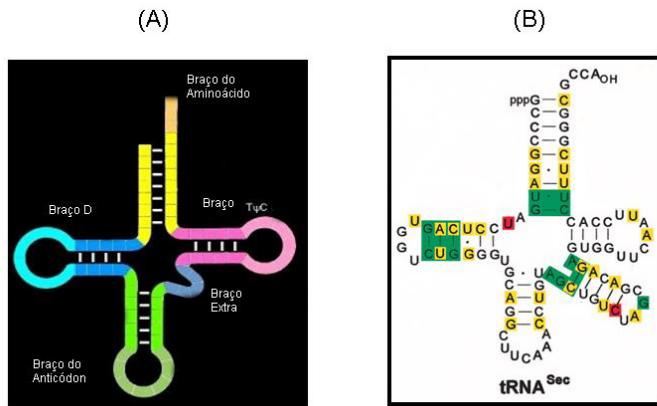


Figura 17. Estrutura secundária global em forma de folhas de trevo de todos os tRNAs. Em (A) estrutura de tRNA com seus 4 braços, além de um braço extra, necessários para a função de adaptação. Em (B) tRNA^{Sec} de eucarioto, onde destaca-se o braço extra alongado importante na formação de selenocisteína.. Em verde, diferenças secundárias estruturais entre tRNA^{Sec} e tRNA^{Ser}; em amarelo indica seqüências diferentes entre todos eucariotos; vermelho mostra nucleotídeos diferentes entre tRNA^{Sec} de vertebrados. (A) Figura extraída e modificada do site (www.biosciences.bham.ac.uk/) de Steve Minchin (University of Birmingham) e (B) Figura extraída de AMBERG et al., 1996.

O mRNA de selenoproteínas possui características únicas, e uma delas é a presença do códon UGA interno à região codificante e em fase de leitura, normalmente este é um códon que indica o sinal de parada de tradução, entretanto existe uma estrutura em alça na região 3' deste mRNA que ajuda no reconhecimento deste códon como um sinal de inserção de Sec, esta estrutura é conhecida como SECIS (“Seleno Cystein Insertion Sequence”), (BERRY et al., 1991), (Figura 18). Estudos estruturais com sondas (WALCZAK et al., 1996) e mutagênese sítio-dirigida (MARTIN III et al., 1998) propuseram modelos de estrutura secundária para SECIS, o qual consistem de uma alça composta por duas hélices (1 e 2) separadas por um “loop” interno. Todos os elementos SECIS podem adotar a conformação proposta pelo modelo, apesar de possuírem baixo grau de conservação de seqüências (FLETCHER et al., 2001). Adicionalmente, estudos estruturais e funcionais demonstraram

que SECIS possui uma estrutura secundária bem definida com quatro pares de bases consecutivas non-Watson-Crick G.A/A.G, o qual é um importante sítio de ligação para proteína SBP2 em eucariotos, além de três resíduos de adenosinas sem pareamento no loop apical ou terminal. (WALCZAK et al., 1996; COPELAND et al., 2000; FLETCHER et al., 2001).

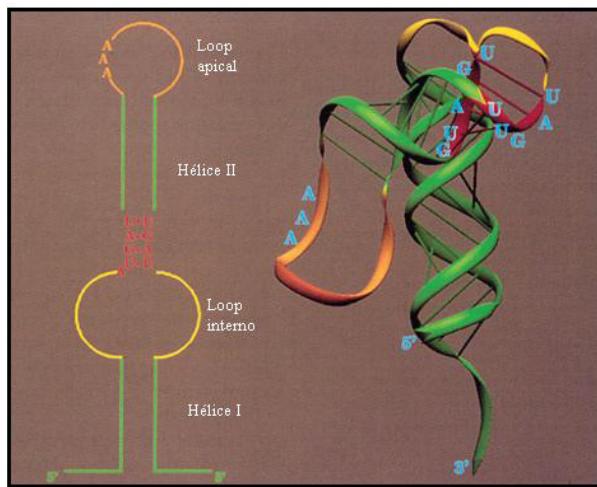


Figura 18. Modelo proposto para o elemento SECIS na incorporação de selenoproteína de rato tipo I iodothyronine deiodinase (5'DI). A estrutura secundária SECIS com as hélices I e II em verde, separadas pelo loop interno destacado em amarelo. No centro da hélice II, o pareamento non-Watson-Crick G.A/A.G, identificado em vermelho. Figura extraída e modificada de WALCZAK et al., 1996.

Em selenoproteínas de procariotos o elemento SECIS está localizado na região adjacente ao códon UGA. Qualquer alteração na estrutura SECIS ou na distância entre o códon UGA e SECIS é prejudicial na incorporação de selenoproteínas (CHEN et al., 1993; COBUCCI-PONZANO et al., 2005), (Figura 19 A).

Em eucariotos, o homólogo funcional de SECIS está localizado na região 3' não traduzida (3'UTR) e o espaçamento entre o códon UGA e SECIS está parcialmente restrita (BERRY et al., 1993). Nesses organismos, SELB liga tRNA^{Sec}, mas não reconhece SECIS, então a proteína ligante SECIS-RNA (SBP2) forma um complexo com SECIS e interage com SELB (FAGEGALTIER et al., 2000; TUJEBAJEVA et al., 2000; COBUCCI-PONZANO et al., 2005), (Figura 19 B).

Diferentes proteínas ligantes do elemento SECIS foram descritas, mas somente SBP2 mostrou ser eficientemente requerida para o processo de incorporação de selenoproteínas em mamíferos (SHEN et al., 1995; HUBERT et al., 1996; SHEN et al., 1998; COPELAND: DRISCOLL, 1999; COPELAND et al., 2000). Experimentos realizados com gradiente de sedimentação em glicerol estabeleceram que SBP2 está associada com ribossomos (80S) de forma estável e propõe que SBP2 corresponde a um dímero onde um domínio de ligação de RNA interage com SECIS e o outro com o ribossomo (COPELAND et al., 2001). Na ligação com SECIS, um modelo estabelece que SBP2 cobre a parte central da alça e liga-se ao pareamento non-Watson-Crick na hélice II (FLETCHER et al., 2001; LESCURE et al., 2002)

Arqueobactérias incorporam selenocisteína por um mecanismo que envolve características mistas de procariotos e eucariotos, (Figura 19 C). Em arqueobactérias, assim como em eucariotos a seqüência de inserção de selenocisteína está localizada na região 3'UTR, porém o complexo SELB/Sec-tRNA^{Sec} interagem diretamente como em procariotos (WILTING et al., 1997; COBUCCI-PONZANO et al., 2005). Homólogos de proteínas SBP2 de eucariotos não foram identificados em arqueobactérias (KROL, 2002).

Outro componente importante no processo de incorporação de selenocisteína, denominado SELB, liga-se ao elemento SECIS do mRNA e atua como um fator de elongação. SELB permite desta forma que tRNA^{Sec} seja posicionado no centro A do ribossomo pareando com o códon AUG, permitindo que a selenocisteína seja incorporada ao polipeptídeo nascente. SELB é um fator bifuncional, carregando homologia funcional com o fator de elongação EF-Tu em seu domínio N-terminal e possui atividade na ligação ao elemento SECIS em sua extensão C-terminal (LESCURE et al., 2002).

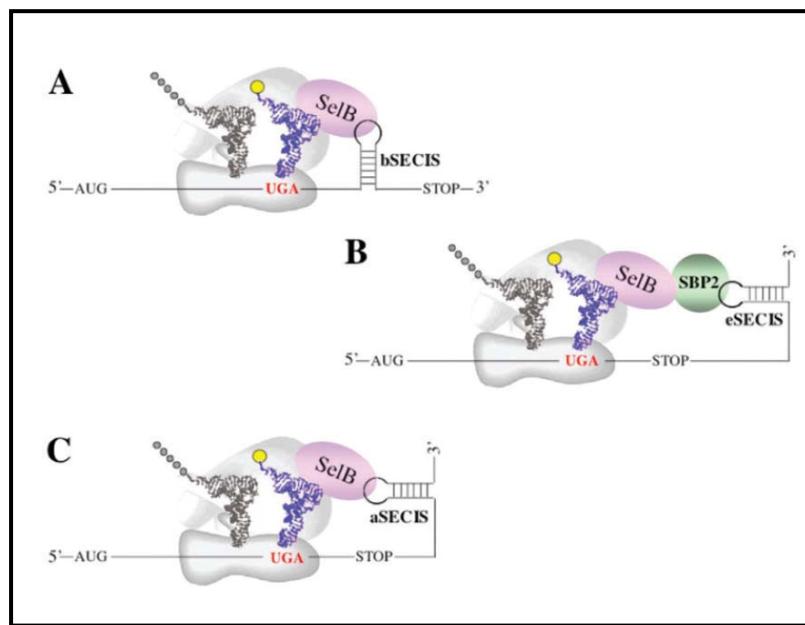


Figura 19. Incorporação de selenocisteína em bactéria (A), eucarioto (B) e arqueobactéria (C). Esse mecanismo ocorre em um códon UGA em fase, localizado no interior do gene. A linha simboliza o RNA mensageiro com o códon UGA em fase de leitura. O elemento SECIS, estrutura secundária adquirida pelo mRNA, compreende a estrutura onde a maquinaria de incorporação de selenocisteína (Sec) irá ligar-se. Figura extraída de COBUCCI-PONZANO et al., 2005.

1.6 Objetivos

Neste trabalho, nos propomos a estudar e compreender a biossíntese e incorporação de selenocisteína em *Trypanosoma* e *Leishmania*, assim os seguintes objetivos específicos foram realizados:

- Buscas computacionais e análises de transcritos na identificação de selenoproteínas e do tRNA^{Sec};
- Experimentos de clonagem, expressão e caracterização molecular foram realizados para o estudo da enzima selenofosfato sintetase (SELD) e fator de elongação (SELB) de *Trypanosoma brucei*,
- Desenvolvimento de uma nova metodologia para isolamento de novas proteínas envolvidas na biossíntese de selenoproteínas em *Trypanosoma brucei* através do sistema “PTP tagging”.

CAPÍTULO 2

Identificação de selenoproteínas em *Leishmania* e da estrutura SECIS

2.1 Introdução

Em Kinetoplastida, a via de síntese de selenocisteína não havia sido explorada e a primeira evidência de uma maquinaria para sua síntese resultou da identificação do gene ODD1 em *Leishmania major* que possui códons de terminação UGA em sua fase de leitura (IRIBAR et al., 2003). Esta observação nos motivou a realizar análises no genoma de *Leishmania* na busca de dados concisos que guiariam nossa investigação para elucidar essa via. Ao considerar que Kinetoplastida é uma das mais antigas linhagens, onde a mitocôndria possui como características peculiares a existência do cinetoplasto e a editoração do RNA mitocondrial (SIMPSON, 1972; SHAW et al., 1988), o estudo da via de incorporação de selenocisteína é muito relevante.

Selenoproteínas resultam da incorporação de selenocisteína (Sec-U) em um códon UGA interno em fase de leitura dirigido pelo elemento de inserção SECIS e, essas características intrínsecas dificultam a sua identificação. Entretanto, programas de busca em genomas para elemento SECIS (SECISearch and ERPIN) têm sido amplamente desenvolvidos e aplicados com sucesso (KRYUKOV et al., 1999; GAUTHERET; LAMBERT, 2001; KRYUKOV et al., 2003).

Através de buscas computacionais e análise de transcritos, este trabalho resultou na primeira descrição da maquinaria de síntese de selenocisteína em Kinetoplastida, com a identificação de homólogos de tRNA^{Sec} em todas as espécies de Kinetoplastida que tiveram seus genomas seqüenciados. Também foram identificados o elemento de inserção de Sec SECIS em *L. major* e *L. infantum*, a incorporação de Se⁷⁵ em proteínas de *Leishmania*, assim

como a identificação de todos os genes que participam da via: SELB, SELD, PSTK e SECp43.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Busca de selenoproteína e tRNA^{Sec} no genoma de *Leishmania major*

As seqüências dos 36 cromossomos de *L. major* estão depositadas no banco de dados GeneDB e as buscas por elemento SECIS foram gentilmente realizadas pelo Dr. Vadim N. Gladyshev e Alexey V. Lobanov (Department of Biochemistry, University of Nebraska, USA) usando o programa SECISearch 2.19. A busca de cada cromossomo foi realizada através do programa ERPIN (KRYUKOV et al., 1999; GAUTHERET: LAMBERT, 2001; KRYUKOV et al., 2003).

Os alunos de doutorado Alexandre Cassago e de iniciação científica Evandro Prieto realizaram a identificação de selenoproteínas, através de um método bem estabelecido e que se baseia na identificação de possíveis elementos SECIS em fase com um códon TGA contendo a fase aberta de leitura (ORF), (KRYUKOV et al., 1999; LESCURE et al., 2002; KRYUKOV: GLADYSHEV, 2002). Os possíveis candidatos SECIS identificados pelo programa SECISearch foram analisados por inspeção manual na região “upstream” da seqüência para identificar a presença do códon de parada TAG que interrompia uma ORF hipotética. Potenciais selenoproteínas foram confirmadas pela identificação de seqüências homólogas no genoma de *L. infantum*. Uma coleção de seqüências conhecidas de selenoproteínas foi usada para busca de seqüências no genoma de *L. major* e *T. brucei* através do modo NBLASTP no banco de dados GeneDB (<http://www.genedb.org/genedb/search.jsp>). O programa tRNA-scan-SE 1.21(SCHATTNER et al., 2005) foi usado para busca dos cromossomos de *L. major* e *T. brucei* para identificação dos genes que codificam para tRNA^{Sec} em genomas de Kinetoplastida seqüenciados e disponíveis.

2.2.2 Cultura de células e extração de RNA total

Promastigotas de *L. major* Friedlin e *L. infantum* foram cultivadas no meio M199 1X suplementadas com 10 % de soro fetal bovino inativado (MARIN et al., 1982). Formas procíclicas de *T. brucei* foram crescidas em meio SDM79 suplementado com 15 % de soro fetal bovino (WIRTZ et al., 1999). As culturas foram mantidas a uma temperatura de 25°C sem agitação.

A extração do RNA total foi realizada usando o método do Trizol (Life Technologies – Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A cultura de células em fase exponencial (1×10^7 células/ ml) foi concentrada por centrifugação a 5000 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 1 ml de Trizol e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. O RNA foi extraído com fenol e fenol-clorofórmio e o sobrenadante foi precipitado pela adição do mesmo volume de isopropanol e centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4 °C.

Em colaboração com nosso trabalho, a estudante de doutorado Maria Pilar Iribar do grupo da Prof^a. Dra. Angela K. Cruz, da Universidade de São Paulo do Departamento de Biologia Celular e Molecular Bioagentes Patogênicos realizou os experimentos de incorporação de selênio. A incorporação de ^{75}Se foi realizada com 500 µl de cultura contendo 5×10^6 células/ml. A estas células foram adicionados 1,5 ml de meio M199 1X suplementado com 30 nmol NaSe e 3µCi ^{75}Se . As células foram incubadas por 24 horas e a proteína total foi extraída e analisada por gel SDS-PAGE.

2.2.3 Síntese do tRNA^{Sec} e das selenoproteínas (LmSel1 e LinfSel1)

Os transcritos LmSel1, LinfSel1 (*L. major* e *L. infantum*) e SelC (*T. brucei*) foram sintetizados do RNA total (0,5 µg/µl) por reação da transcriptase reversa com oligonucleotídeos específicos Sel1d (LmSel1, LinfSel1) e TbSelC2 (SelC), (tabela 1), com a

utilização do kit ONE STEP RT-PCR (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante (tabelas 2 e 3). O cDNA de SELC foi submetido a reação de amplificação através de PCR com os oligonucleotídeos TbSelC1 e TbSelC2 utilizando o kit de PCR (Biotoools). O produto de PCR foi克隆ado em vetor pGEM-T e seqüenciado para confirmar sua identidade.

Tabela 1 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e PCR

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligonucleotídeos 5'-3'
LmSel1a	CGCCACACAGGCACATGCAGCGACATTG
LmSel1b	TCCGCAGCAACGCACCACAAGCAGGCAG
LmSel1c	ACTCGACTACCTCGTCCAGCTCCATCT
LmSel1d	GGCATGGATCTTCGCCTCATGATGCGCAC
TbSelC1	GCCACGATGAGCTCAGCTGGTGCTG
TbSelC2	CACCACAAAGGCCGAATCGAACGGC

Tabela 2 - Reagentes usados nas reações de RT-PCR (ONE STEP RT-PCR – Qiagen) para obtenção dos transcritos LmSel1, LinfSel1 (*L. major* e *L. infantum*) e SelC (*T. brucei*).

Mistura da reação de RT-PCR	Volume (μl)	Concentração final
Tampão RT-PCR [5x]	10,0	1x
dNTPs 10mM (A, G, C, T)	2,0	0,4mM cada
Oligonucleotídeos 100pmol/ul	0,5 cada	1μM cada
RNA molde		0,5μg
Enzima MIX (Reverse Transcriptase+ Hot Star Taq DNA Polymerase	2,0	
Solução Q [5x]	10,0	1x
Rnase out (40U/μl)	0,25	10U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 3 - Programa de RT-PCR utilizado pelo termociclagor PTC-100™ Programmable Thermal Controller.

Programa de RT-PCR								
Número de ciclos	1x	1x	1x	35x	1x			
Tº C	94	50	95	94	50	72	72	4
Tempo	1min	30min	15min	15seg	30seg	45seg	10min	infinito

Os cDNAs preditos das selenoproteínas de *L. major* e *L. infantum* foram amplificados por duas reações consecutivas de PCR. Para esta reação, foram desenhados um conjunto de oligonucleotídeos com dois primers internos a seqüência de Sel1 (LmSel1b-sense e LmSel1c-anti-sense) e dois externos (LmSel1a-sense e LmSel1d- anti-sense). Devido à alta conservação das seqüências de Sel1 em *L. major* e *L. infantum*, o mesmo conjunto de oligonucleotídeos pôde ser utilizado para ambas às reações. A primeira reação de PCR foi realizada usando os primers LmSel1a e LmSel1c e no segundo PCR foi utilizado como molde amostra da primeira reação com a combinação dos oligonucleotídeos LmSel1c e LmSel1b. Para as reações de PCR foi utilizado o aparelho PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.), sob condições descritas nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Reagentes usados nas reações de PCR realizadas com “Taq DNA Polymerase” (Biotoools)

Mistura da reação de amplificação	Volume (μl)	Concentração final
Tampão PCR [10X] sem Mg	5,0	1X
Solução estoque de dNTPs 10mM (A, G, C, T)	1,0	0,2mM cada
MgCl ₂ 50mM	1,5	1,5mM
Oligonucleotídeo senso 100pmol/ul	1,0	10pmol/ul
Oligonucleotídeo anti-senso 100pmol/ul	1,0	10pmol/ul
cDNA		100ng
Taq DNA Polimerase (5U/μl)	0,25	0,2U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 5 - Programa de PCR para amplificações com “Taq DNA Polymerase” (Biotolols)

Programa de PCR						
Número de ciclos	1x	30x			1x	
T° C	95	95	50	72	72	4
Tempo	3min	30seg	30seg	1min	10min	infinito

2.3 Resultados

2.3.1 Componentes da síntese de selenoproteínas em Kinetoplastida

Através de seqüências já conhecidas: selenocisteína sintase (SELA), selenofosfato sintetase (SELD), fator de elongação de selenocisteína (SELB), fosfoseril tRNA^{Sec} kinase

(PSTK), (CARLSON et al., 2004) e SECp43 (XU et al., 2005), as seqüências de proteínas foram encontradas no banco de dados GeneDB. Nesta análise foram encontradas as quatro proteínas homólogas preditas em *L. major*, *L. infantum*, *T. brucei*, *T. congolensis*, *T. cruzi* e *T. vivax* (tabela 6). A seqüência de proteína de SELD em *L. major* já havia sido descrita (JAYAKUMAR et al., 2004) e como em outros eucariotos e arqueobactérias, o homólogo de SELA é ausente.

Tabela 6 - Seqüências que codificam para síntese de selenocisteínas em Kinetoplastida. O código de acesso do GeneDB está indicado para cada gene identificado

Organismo	SELB	SELD	SEL C	PSTK	SECp43
<i>L. infantum</i>	LinJ34.2480	LinJ36.5900	LinJ06_20050901_V2.0	LinJ36.6030	LinJ35.5320
<i>L. major</i>	LmjF34.2440	LmjF36.5410	LmjF06_01_20050601_V5.2	LmjF36.5540	LmjF35.5040
<i>T. brucei</i>	Tb927.4.1820	Tb10.6k15.0990	Tb927_09_v4	Tb10.6k15.1110	Tb09.211.0930
<i>T. congolensis</i>	congo353e06.q1k_12	congo1180f06.p1k_6	Chr9 subsequence 207239-207426	congo1177g04.q1k_8	congo903e01.p1k_10
<i>T. cruzi</i>	Tc00.1047053504013.50	Tc00.1047053504079.6	18653 subsequence 506-693	Tc00.1047053504137.120	Tc00.1047053506885.70
<i>T. vivax</i>	tviv1742a01.q1k_13	tviv1120e08.p1k_1	Chr Unknow subsequence 29083630-29083817	tviv111d10.p1k_1	tviv918g12.p1k_3

2.3.2 Identificação do tRNA^{Sec} de Kinetoplastida

O tRNA^{Sec} predito para todos Kinetoplastida, com acesso disponível de seqüências genômicas, foi identificado. Inicialmente, a busca nos genomas de *Leishmania* e *T. brucei* foi realizada pelo programa tRNAscan-SE 1.21 (parâmetro Cove). Um candidato para cada espécie foi identificado e usado para busca em outros genomas de Kinetoplastida através do programa BLAST. Os tRNAs^{Sec} identificados estão listados na tabela 6. As seqüências de tRNA^{Sec} de Kinetoplastida foram alinhadas com alta identidade e possuem as características do braço variável longo e o anticôdon UCA presentes nos genes homólogos de tRNA^{Sec} (Figura 20 A), resultando na estrutura conservada do tRNA^{Sec} como indicado na figura 20 B.

Através de oligonucleotídeos específicos (TbSelC 1 TbSelC2) sintetizados para reação de RT-PCR, foi identificada uma banda de cDNA em gel de agarose 2% no tamanho esperado de 89 pb, indicando a presença de um transcrito específico em *T. brucei* (Figura 20 C). O sequenciamento do produto de PCR deste cDNA confirmou a seqüência predita.

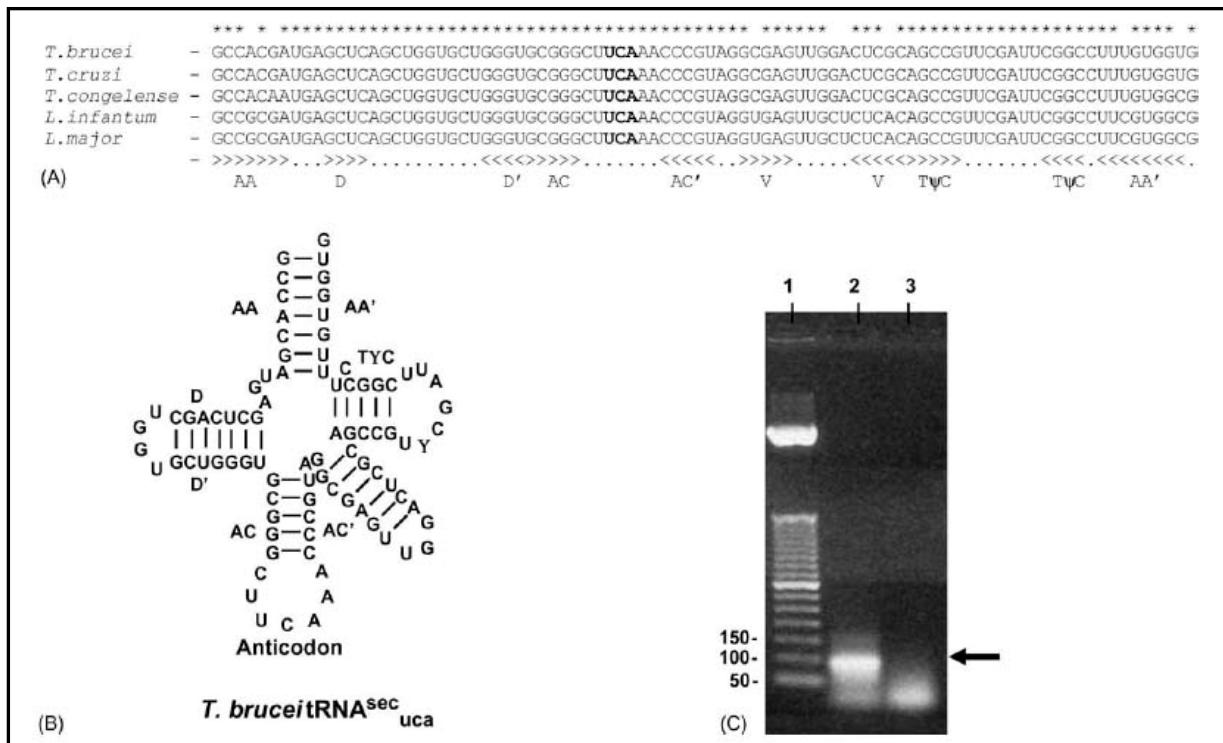


Figura 20. Identificação da seqüência do tRNA^{Sec} do genoma de *Trypanosoma* e *Leishmania* (A) Alinhamento múltiplo das seqüências do tRNA^{Sec} de Kinetoplastida de *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. congolensis*, *L. major* e *L. infantum*. Os símbolos: (*) indica identidade da seqüência, (<) ou (>) indicam pareamento de bases para formar os braços da estrutura que compõe o tRNA. AA e AA' braço do aminoácido; D e D', braço D; AC e AC', braço aceptor; TYC e TYC', braço T-pseudouridina-C. (B) Estrutura secundária predita do tRNA^{Sec} de *T. brucei* indicando todos elementos que o compõe assim como em (A). (C) Gel de agarose 2% da reação de RT-PCR do tRNA^{Sec} de *T. brucei*. Em 1, marcador de massa molecular 50 pb (Invitrogen); 2, tRNA^{Sec} de *T. brucei* e 3, controle do experimento sem a adição da enzima transcriptase reversa. A seta indica o tamanho esperado da migração do tRNA^{Sec} de *T. brucei* (89 pb).

2.3.3 Identificação de genes codificantes para selenoproteínas (LmSel1 LinfSel1) de *Leishmania* e do elemento SECIS

O genoma de *L. major* correspondente a 36 cromossomos foi verificado através do programa “SECISearch program”, com parâmetros “Loose, Default e Strict”, e resultou em 3394, 405 e 120 candidatos a elemento SECIS, respectivamente. A localização de cada

candidato dentro do genoma de *Leishmania* foi determinada. O candidato presente dentro de uma ORF era descartado, baseado na suposição de que os elementos SECIS de *Leishmania* estão presente na região 3'UTR (região não-traduzida) em analogia a estrutura SECIS de eucariotos. O elemento SECIS predito também foi verificado quanto à presença de um códon UGA em fase com pelo menos 1000 nucleotídeos acima da seqüência de SECIS. Seguindo estes critérios foi identificado um possível candidato a selenoproteína, que foi denominado LmSel1. Um homólogo de *L. infantum* (Linf-Sel1) foi identificado com todos os elementos equivalentes para início e parada do processo de tradução, assim como o elemento SECIS conservado e na mesma posição (Figura 21). O RT-PCR foi realizado com RNA total de *L. major* e *L. infantum* e oligonucleotídeos específicos e, para cada seqüência confirmou a presença de um transcrito de selenoproteína (Figura 22 A).

Os genes preditos identificados, LmSel1 e LinfSel1, possuem 354 bp (pares de bases) com conservado códon UGA em fase de leitura na posição 154. Os 102 nucleotídeos (nt) dos elementos SECIS para ambas as espécies estão localizados 60 nt “downstream” do códon de terminação TAG (Figura 21). O polipeptídeo traduzido LmSel1 corresponde a 117 resíduos com massa molecular aproximada de 12.7 kDA e não foi detectado nenhum homólogo na busca com programa BLAST (GeneBank).

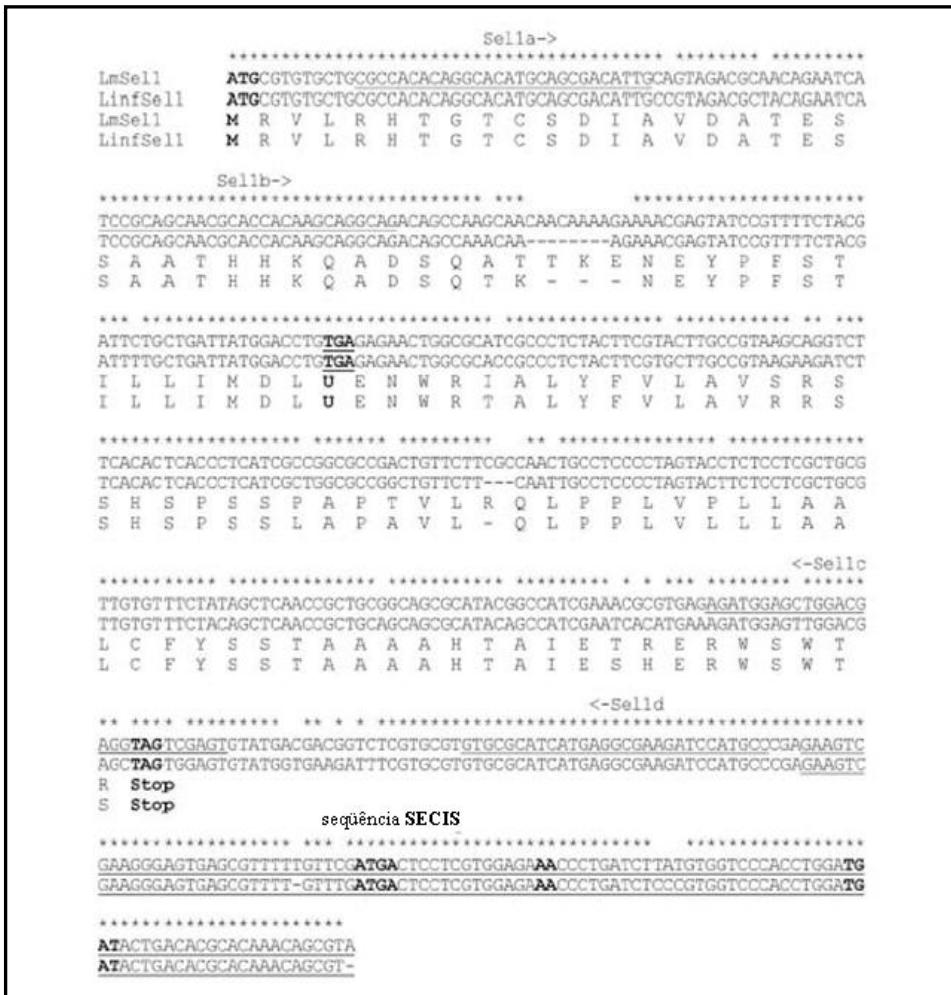


Figura 21. Alinhamento das seqüências Sel1 de *L. major* e *L. infantum*. O códon TGA, traduzido como selenocisteína (U), e os códons de início de parada, ATG e TAG, estão indicados respectivamente. A seqüência SECIS está sublinhada e o dinucleotídeo AA destacado. Os oligonucleotídeos usados na síntese do cDNA e na reação de PCR estão indicados nas orientações sense e anti-sense. (*) símbolo indica identidade das seqüências. Os números de acesso no NCBI: LmSel1: DQ269207; LinfSel1: DQ278902.

O elemento SECIS previsto de LmSel1 apresentou o quarteto de bases não-Watson-Crick , UGAN-NGAN, e as bases AA invariáveis e segue o mesmo padrão da forma 1 de eucariotos com características similares ao elemento SECIS identificado em *Plasmodium* (KROL, 2002; MOURIER et al., 2005), (Figura 22 B).

Para investigar a existência de selenoproteínas em *Leishmania* foi analisada a incorporação de ⁷⁵Se em células promastigotas de *L. major*. As células foram incubadas por 24 horas com uma mistura de Se⁷⁵ e NaSe e as proteínas foram analisadas em gel SDS-PAGE 18% seguida pela autoradiografia. O resultado detectou três bandas evidentes de 52, 40 e 12

kDa. A banda de 12 kDa é consistente com a migração esperada para a proteína LmSel1, identificada através das buscas computacionais realizadas neste trabalho, (Figura 22 C).

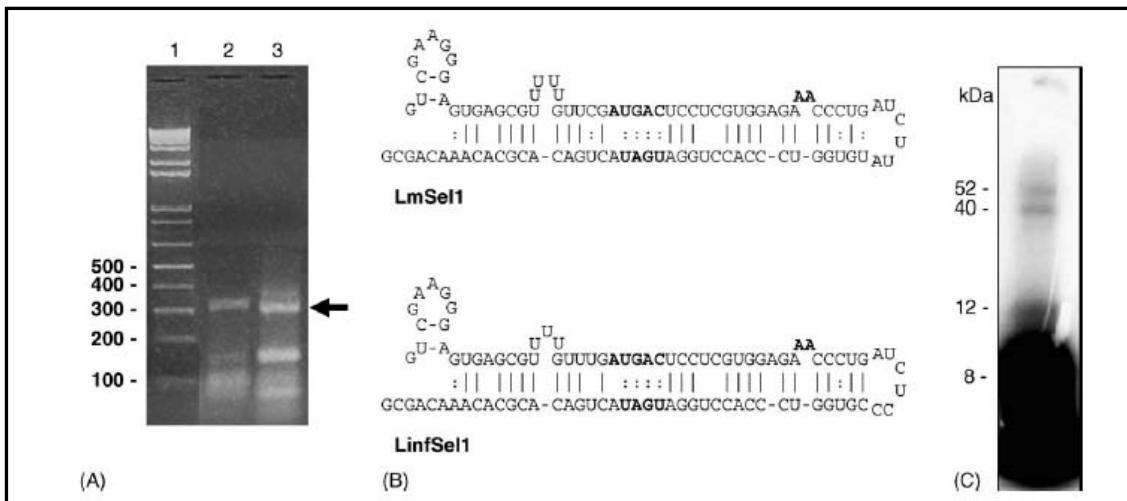


Figura 22. Identificação das selenoproteínas, LmSel1 e LinfSel1, e incorporação de Se⁷⁵ em *L. major*. (A) RT-PCR do transcrito das selenoproteínas de *L. major* e *L. infantum*. Em 1, marcador de massa molecular (1 Kb plus); 2, *L. major* Sel1 (LmSel1); 3, *L. infantum* Sel1 (LinfSel1), ambas com tamanho esperado de 354 pb. (B) Estrutura secundária prevista para os elementos SECIS de *L. major* e *L. infantum* das selenoproteínas Sel1. (C) Incorporação de Se⁷⁵ em células de Leishmania.

2.3.4 Identificação de candidatos a selenoproteínas de *Trypanosoma* e *Leishmania*

As seqüências de proteínas conhecidas (*Bos taurus* GPx, *D. melanogaster* SPS2 e *M. musculus* SELR) foram usadas para buscar seqüências homólogas nos genomas de *L. major* e *T. brucei* no banco de dados GeneDB (NBBLASTP). O resultado dessas buscas identificou quatro candidatos para selenoproteínas já conhecidas, GPx 1, SELR e SELD. Estes candidatos foram analisados por um método estatístico aplicando o algoritmo de Monte Carlo, PRSS (<http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta-www/prss.htm>). Duas seqüências, glutationa peroxidase (GPx) e selenoproteína R (SELR) estão presentes nos genomas de *Trypanosoma* e *Leishmania*. A selenoproteína SPS2 apresenta selenocisteína em humanos como em *Drosophila*. Em humanos, SPSI ao invés de um resíduo Sec, possui um resíduo de treonina. Foi identificado um candidato SPS2 *Drosophila* em *Leishmania* que tem um resíduo Cys conservado na posição do resíduo Sec de *Drosophila*. A selenoproteína X foi identificada

exclusivamente em *T. brucei*. Em todas as seqüências analisadas o resíduo Sec é substituído por um resíduo Cys na posição conservada, indicado na figura 23.

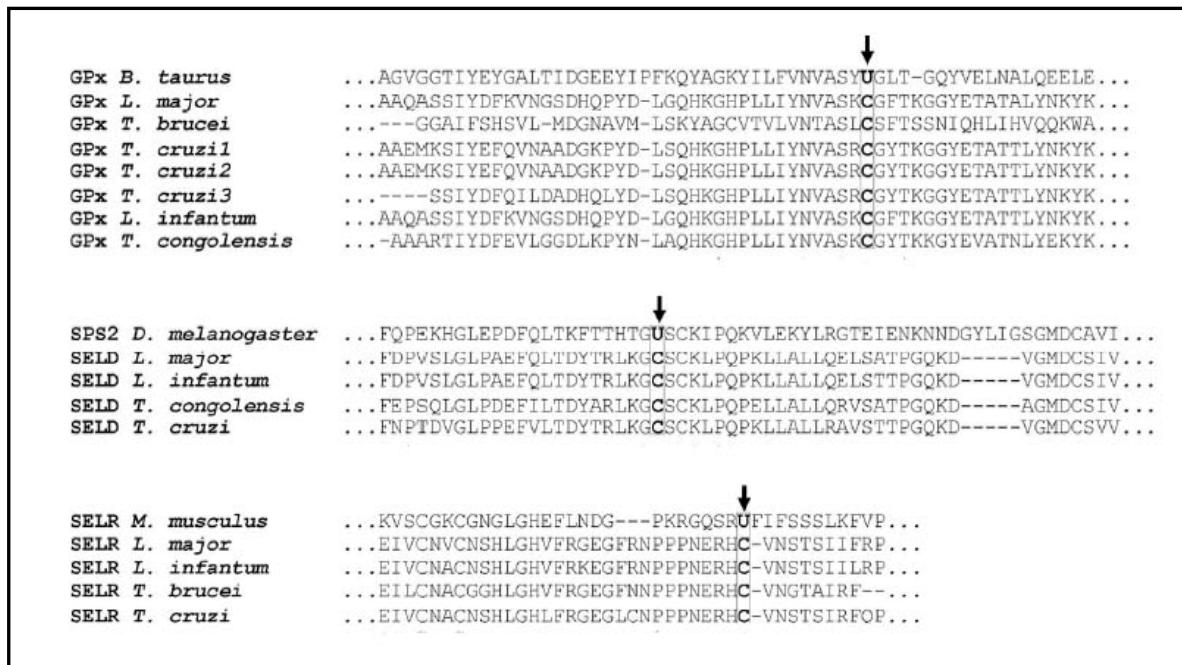


Figura 23. Alinhamento parcial das seqüências de selenoproteínas conhecidas para homólogos em *Trypanosoma* e *Leishmania*. A primeira seqüência em cada alinhamento representa selenoproteína conhecida (*Bos taurus* GPx, *D. melanogaster* SPS2 e *M. musculus* SELR) e estão alinhadas para cada homólogo em Kinetoplastida. As setas indicam a posição do resíduo de selenocisteína (U) no alinhamento.

2.4 Discussão

A identificação de genes homólogos que codificam proteínas envolvidas na síntese de selenocisteína (Sec), SELD, SELB, PSTK e SECp43 em genomas de *Leishmania* e *Trypanosoma*, assim como os dois genes preditos que codificam para selenoproteínas sustentam a existência da síntese completa de selenocisteínas nesses organismos. De acordo com trabalhos descritos sobre biossíntese de Sec em eucariotos, também não foi possível identificar o homólogo de SELA em *Leishmania* e *Trypanosoma* (LOW: BERRY, 1996), (tabela 6, pg. 64). Esta observação é consistente com dados disponíveis que citam SELA exclusivamente encontrada em bactérias (BÖCK et al., 1991; KROL, 2002).

Seqüências codificantes para tRNA^{Sec} foram identificadas por buscas em genoma de *L. major* e *T. brucei* e através dessas seqüências, homólogos de tRNA^{Sec} foram identificados nos genomas de *T. cruzi*, *T. congolensis* e *L. infantum*. Todos esses tRNAs possuem características distintas a todos tRNA^{Sec}. A estrutura secundária do tRNA^{Sec} revelou o braço variável longo com pareamento de 6 pares de bases e uma alça com 3 nucleotídeos não pareados e o códon UCA está presente em todos tRNA^{Sec} (AMBERG et al., 1996). A presença de um transcrito para o tRNA^{Sec} de *T. brucei* foi identificado por experimentos de RT-PCR (figura 20, pg. 65).

A busca no genoma de *L. major* por elementos SECIS resultou em 3919 candidatos. Após refinamentos e análises de dados foi selecionado um candidato a selenoproteína, LmSel1, que possui um homólogo em *L. infantum*, LinfSel1, os quais estão presentes os elementos SECIS e os códons de parada internos (LOW: BERRY, 1996; HATFIELD: GLADYSHEV, 2002), (figura 21, pg. 67). Os genes de selenoproteínas para ambas as espécies, *L. major* e *L. infantum*, codificam para proteínas que tem homólogos em *Trypanosomas*, mas não codificam para outros organismos. A presença de transcritos para LmSel1 e LinfSel1, com tamanho esperado de 354 pb foram verificados por reações de RT-PCR (figura 22 A, pg. 68). A identificação de uma banda de 12 kDa no experimento de incorporação de Se⁷⁵ é coincidente com tamanho predito de LmSel1. Neste experimento, foi possível constatar ao menos a presença adicional de três bandas marcadas com Se⁷⁵, indicando a possibilidade da existência de outras selenoproteínas em células de *Leishmania* (figura 22 C, pg. 68).

Os elementos SECIS estão localizados após 60 nucleotídeos do códon de parada na região não traduzida 3'UTR, como descrito em estudo anterior (BÖCK, 2000), e conservam as características do pareamento não Watson-Crick com e as bases AA desemparelhadas (WILTING et al., 1997; WALCZAK et al., 1998) . A divergência dos Kinetoplastidas dentro

da linhagem de eucariotos pode refletir em elementos SECIS divergentes em sua seqüência primária que torna sua identificação mais difícil que em outros organismos. Entretanto, a presença de dois elementos altamente conservados, em seqüências de Kinetoplastida, contribui fortemente para sua validação como elementos SECIS.

A pesquisa em genomas de *Leishmania* e *Trypanosoma*, partindo de selenoproteínas conhecidas, identificou um conjunto de seis genes. Dois candidatos, glutationa peroxidase e selenoproteína R estão presentes em ambos os genomas de *L. major* e *T. brucei*. A selenoproteína SPS2 homóloga de *D. melanogaster* foi identificada somente no genoma de *L. major* e a selenoproteína X exclusivamente no genoma de *T. brucei* (figura 23, pg. 69). Todas essas proteínas homólogas foram validadas pelo algoritmo Monte Carlo através do programa PRSS. Uma característica marcante nessas selenoproteínas homólogas é a presença do resíduo de cisteína (Cys) na posição equivalente do resíduo de selenocisteína (Sec) em *Leishmania* e *Trypanosoma*. Em *D. melanogaster* e humanos a proteína SPS2 contém o resíduo Sec em uma posição conservada e, em *Leishmania* codifica para um resíduo Cys. Provavelmente, estes genes perderam o resíduo Sec que codifica para o códon UGA, fixando um resíduo Cys (UGU ou UGC) na mesma posição. A perda deste resíduo durante a evolução dessas selenoproteínas é evidente em outros organismos e consistente com a dificuldade na identificação de seqüências de elementos SECIS nesses genes específicos.

Esse trabalho direcionado a busca de selenoproteínas em Kinetoplastida, resultou na publicação intitulada “Identification of *Leishmania* selenoproteins and SECIS element” (CASSAGO et al., 2006), e minha contribuição nesta pesquisa foi a realização dos experimentos com os transcritos de tRNA^{Sec} e de selenoproteínas LmSel1 e LinfSel1, através de extrações de RNA total e reações de RT-PCR. As evidências demonstradas neste estudo são coerentes com a existência de uma via ativa de selenocisteínas em Kinetoplastida e

viabilizará futuras investigações estruturais e funcionais dessas proteínas na bioquímica desses organismos.

CAPÍTULO 3

Estudos moleculares e estruturais das enzimas, SELB e SELD, na biossíntese de selenocisteínas em *T. brucei*

3.1 Introdução

O aminoácido selenocisteína é co-traducionalmente incorporado em selenoproteína em resposta a um códon de terminação UGA e a um sinal de inserção SECIS (ZINONI et al., 1986). Diversos genes codificantes para as enzimas conhecidas em eucariotos envolvidas nessa via de síntese de selenocisteína como Selenofosfato sintetase (SELD), Fator de Elongação (SELB), Fosfoseril tRNA^{Sec} Kinase (PSTK), Secp43 , foram identificados em *L. infantum*, *L. major*, *T. brucei*, *T. congolensis*, *T. cruzi* e *T. vivax*, e são fundamentais no reconhecimento e tradução do códon UGA (CASSAGO et al., 2006).

Em eucariotos, o tRNA^{Sec} é carregado com uma serina pela enzima seril-tRNA sintetase. Na ausência do homólogo de SELA, o resíduo seril pode sofrer fosforilação pela enzima fosfoseril tRNA^{Sec} Kinase (PSTK) e uma selenilação pela Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase (SepSecS), (YUAN et al., 2006). Essa reação requer um ativo doador de selênio, o selenofosfato. O selenofosfato é sintetizado através do selenito e ATP pela enzima SELD, selenofosfato sintetase, na biossíntese de selenocisteína (LOW et al., 1995). A selenofosfato sintetase, que é um componente central da biossíntese de selenocisteína, foi anteriormente descrita e estudada em alguns organismos como *Escherichia coli* (GLASS et al., 1993; VERES et al., 1994), *Salmonella typhimurium* (VERES: STADTMAN, 1994), *Haemophilus influenzae* (LACOURCIERE: STADTMAN, 1994) e mais recentemente em *Leishmania major* (JAYAKUMAR et al., 2004).

No passo final da biossíntese de selenocisteína, o tRNA^{Sec} é ligado a um fator de elongação específico, SELB, o qual reconhece e liga-se a estrutura de inserção de

selenocisteína “SECIS” e permite que o tRNA^{Sec} seja posicionado no ribossomo para leitura do códon UGA e incorporação do mesmo a selenoproteína nascente (FORCHHAMMER *et al.*, 1989; FORCHHAMMER *et al.*, 1990).

No presente trabalho, nos propomos a estudar dois componentes da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em *Trypanosoma brucei*: o fator de elongação para selenocisteína, SELB, e a enzima selenofosfato sintetase, SELD. Foram realizados experimentos de clonagem, sequenciamento das construções plasmidiais, expressão das proteínas, gel nativo, determinação do ponto isoelétrico (pI), ensaios de cristalização, produção de anticorpos e experimentos de imunolocalização.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Amplificação dos genes *selB* e *selD* de *T. brucei* e clonagem nos vetores de propagação pTZ57R/T e pGEM-T.

Para a amplificação dos genes *selB* e *selD* por PCR, foram sintetizados oligonucleotídeos específicos com sítios de clivagem para enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I para posterior clonagem em vetor de expressão (tabela 7). Em paralelo, foi realizada a extração do DNA genômico de *T. brucei* para ser usado como molde nesta amplificação.

Tabela 7 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes *selB* e *selD* de *T. brucei*.

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5'- 3'
TbSELBF	GCCCATATGACAGAAGTTAATGATGTTGCCTCTG
TbSELBR	GCCCTCGAGCTACTGCTGAAGCTGACTGTG
TbSELDF	ACGTACGTCATATGTCAGAGAAGGAAGGAAAAGTAATAAC
TbSELDR	GACTCGAGCTATCAAATAATCTTATCATTACCTCCGCTCCCA

Para extração do DNA genômico, 50 ml de células promastigota de *T. brucei* 2913 em fase exponencial (1×10^7 células/ml) foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas com tampão PBS 1X e ressuspendidas em 4 ml de tampão de extração (0,2 M Tris pH 8,0/0,01 M EDTA pH 8,0) adicionado de 50 µg/ml de proteinase K e 0,5% de solução de SDS, a reação foi incubada 37 °C por 24 horas. Após incubação, foram realizadas 2 extrações consecutivas: uma extração com acréscimo de 4 ml de fenol e outra com adição de 4 ml de clorofórmio com intervalos de centrifugação de 15 minutos a 2000 rpm a 4 °C para cada extração.O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 100% gelado e lavado com 1 volume de etanol 70%. O DNA foi ressuspendedido em 400 µl de TE com RNase (20 mg/ml) e armazenado a 4 °C. Esse DNA foi quantificado a 1,1 µg/µl em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm.

A fase aberta de leitura (ORF) dos genes *selB* e *selD* foi amplificada sob condições descritas nas tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Reagentes (Invitrogen) utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes *selB* e *SelD*

Reação de PCR	Volume (μl)	Concentração final
Tampão PCR [10X] sem Mg (Invitrogen)	5,0	1X
Solução estoque de dNTPs 10mM (A, G, C, T)	1,0	0,2mM cada
MgCl ₂ 50mM	1,5	1,5mM
Oligonucleotídeo senso 100pmol/ul	1,0	10pmol/ul
Oligonucleotídeo anti-senso 100pmol/ul	1,0	10pmol/ul
DNA molde		250ng
<i>Taq</i> DNA Polimerase recombinant (5U/μl)	0,25	1,25U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 9 – Programa de PCR para amplificação dos genes *selB* e *SelD*

Programa de PCR						
Número de ciclos	1x	25x			1x	
T° C	95	95	52 (<i>selB</i>) / 55 (<i>selD</i>)	72	72	4
Tempo	3min	45seg	30seg	1,5min	10min	infinito

Após ter sido concluída a reação de PCR, 5μl da reação foram analisados em gel de agarose 0,8% marcado com brometo de etídio (0,5 μg/ml) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0).

Em seguida, os fragmentos dos genes *selB* e *selD* amplificados foram purificados (Kit Concert – Invitrogen) para clonagem nos vetores pTZ57R/T (Fermentas – Inst/A clone™ PCR Product Cloning Kit) e pGEM-T (Promega), respectivamente. As clonagens foram realizadas seguindo os protocolos abaixo:

Reação de ligação do gene selD em vetor pGEM-T (Promega):

- 5 µl (2x Rapid Ligation Buffer - T4 DNA ligase);
- 1 µl vetor pGEM-T (50 ng);
- 3 µl do inserto (produto de PCR purificado);
- 1 µl T4 DNA ligase, (1U/ µL)

Esta reação ocorreu a 4 °C por 12 h.

Reação de ligação do gene selB em vetor pTZ57R/T (Fermentas):

- 3 µl (10x Ligation buffer);
- 3 µl (PEG 4000 solution);
- 3 µl vetor pTZ57R/T (0.165 µg, 0.18 pMol final);
- 4 µl do inserto (produto de PCR purificado);
- 1 µL T4 DNA ligase, (5U/ µL);
- 16 µl de H₂O

Esta reação ocorreu a 22 °C por 12 h.

3.2.2 Transformação dos produtos de ligação em cepas de *E. coli* DH5α

Após a ligação dos genes *selB* e *selD* em seus respectivos vetores de clonagem, foi efetuado o experimento de transformação, seguindo o protocolo de Ausubel, F. M. et al., 1995. O produto de ligação para cada construção, 10 µl, foi adicionado em 50 µl de células competentes *E. coli* DH5α previamente descongeladas. As células foram deixadas em repouso por 30 minutos em gelo. O choque térmico foi realizado a 42 °C por 2 minutos. Após incubação de 3 minutos das células em gelo, foram adicionados 270 µl de meio SOC (2% bactotriptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glicose, pH 6,8), previamente aquecido a 37 °C por 60 minutos.

Foram plaqueados 100 µl e 200 µl de mistura em meio LB/ágar contendo o antibiótico de seleção, para ambos os vetores ampicilina (100µg/ml), 0,5 mM de IPTG e 80 µg/ml de X-gal e as placas foram incubadas durante a noite a 37 °C. Após esse período de crescimento, foram escolhidas algumas colônias e inoculadas em 5 ml de meio LB, 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C, 250 rpm por 12 horas.

3.2.3 Extração e Clivagem dos DNAs plasmidiais e do vetor de expressão pET 28 a(+)

Para procedermos à expressão do produto gênico, torna-se necessário extrair o DNA recombinante, clivar com enzimas de restrição e introduzir o gene de interesse em vetor de expressão apropriado.

No procedimento de extração e purificação dos DNAs plasmidiais, a partir de bactérias *Escherichia coli* DH5 α transformadas, foi usado o Kit Concert (Invitrogen).

A checagem da eficiência de clonagem e extração do DNA foi feita através de PCR com primers específicos (tabelas 8 e 9) e analisados em eletroforese em gel agarose 0,8% marcado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em tampão TAE 1X (8 mM Tris-acetato, 0,2 mM EDTA pH 8,0) e, posterior sequenciamento de genes das construções recombinantes.

A seguir, os DNAs plasmidiais SELB/pTZ e SELD/pGEM-T foram digeridos com as endonucleases *Nde* I e *Xho* I, seguindo o protocolo da Invitrogen:

- 10 µl de DNA plasmidial;
- 3 µl tampão React 10x;
- 1 µl de cada enzima de restrição (1 U/ µL);
- 16 µl de H₂O

Utilizando o mesmo protocolo, digeriu-se o vetor pET 28 a(+) com as mesmas endonucleases utilizadas nas construções descritas acima.

As reações de clivagem ocorreram a 37 °C por 15 minutos. Os insertos e vetores digeridos foram purificados em gel de agarose preparativo.

3.2.4 Subclonagem dos genes *selB* e *selD* em vetor de expressão pET 28 a(+)

Nessa etapa, após digestão e purificação dos insertos e do vetor, estes apresentam extremidades coesivas complementares provenientes do experimento acima. Os plasmídeos do sistema pET foram desenvolvidos para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* e apresentam alto grau de eficiência. Dessa forma, foi realizada a ligação do DNA em vetor pET28 a(+), segundo o protocolo:

- 2 μ l 5x T4 DNA ligase Buffer;
- 3 μ l vetor pET28a digerido e purificado;
- 4 μ l do inserto (purificado do gel);
- 1 μ l T4 DNA ligase, (1U/ μ L)

Esta reação foi processada a 4 °C por 12 horas

Novamente foi realizada uma transformação em células competentes *E. coli* DH5 α , utilizando o protocolo: adição do volume total de ligação (10 μ l) em 50 μ l de DH5 α e choque térmico de 42 °C em 2 minutos. Após 5 minutos em gelo, foi adicionado 270 μ l de meio LB e a mistura foi incubada 37 °C por 1 hora. Foram plaqueados 100 μ l e 200 μ l da mistura de transformação em meio LB/ágar contendo o antibiótico canamicina (30 μ g/ml).

Os DNAs plasmidiais foram extraídos pelo Kit Concert (Invitrogen) e submetidos à reação de PCR que confirmou a presença do inserto e sequenciamento que delimitou a escolha de um clone para testes de expressão das proteínas recombinantes. O gene que codifica para SELB de *T. brucei* contém 1968pb, o que torna inviável o sequenciamento de todo o gene, no entanto foram construídos primers internos a seqüência do gene permitindo o alinhamento da mesma (tabela 10).

Uma nova transformação foi realizada com a cepa de *E. coli* BL21(DE3). O protocolo de transformação usado foi o de Ausubel, F. M. *et al.*, 1995, relatado acima. Mais uma vez,

colônias recombinantes foram analisadas em gel de agarose 0,8%/TAE1X e confirmaram a presença do inserto para expressão.

Todos os experimentos de seleção de colônias de transformação foram aliquotadas, suplementadas com 20% de glicerol e congeladas a -80 °C para conservação das mesmas.

Tabela 10 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos para sequenciamento dos genes *selB* e *selD* de *T. brucei*.

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5'- 3'
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT
M13R	GGAAACAGCTATGACCAT
T73G promoter	TAATACGACTCACTATAAGGG
SP6 (Reverse)	GATATCACAGTGGATATT
T74G promoter	TAATACGACTCACTATAAGGGG
T7 terminator	GGTGGCGACTCGTTATTGAT
SELB601F	CCAATCAACGTGGAGAAGGTG
SELB600R	ACTCATCATACAGCCCTCACACG
SELB990F	CATCCTGTGCCAGTGTTGAAAGTGCC
SELB990R	GGCACTTTCAAACACTGGCACAGGATG
SELB1426F	TGCCGGATAGCACTCGCGGGG
SELB1425R	CATGTTTCTCGTTCCACGTCAAG

3.2.5 Expressão das proteínas SELB e SELD em vetor de expressão pET 28 a(+)

Após a confirmação dos recombinantes, foram procedidos os testes de expressão e solubilidade. Uma colônia transformante obtida do plasmídeo SELB/pET28a foi cultivada em meio LB com antibiótico canamicina (30 µg/ml) a 37 °C, sob agitação (250 rpm) e ao atingir a

densidade óptica (D.O) de 0,6, foi induzida com IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranósideo). Foram realizados testes com variação de concentração de IPTG (sem IPTG, 0,05 mM, 0,3 mM e 1 mM) e variação de temperatura (37 °C e 20 °C) em 4 horas de indução. A cultura foi centrifugada a 4000 g por 15 minutos a 4 °C e o precipitado foi ressuspêndido em tampão 1X PBS (0,15 M/l de NaCl, 0,15 M/l de Na₂HPO₄ e para ajuste de pH em 7,4: solução, 0,15 M/l de KH₂PO₄). Foram realizados testes de lise celular por congelamento e descongelamento em N2 líquido e sonicação no aparelho “550 Sonic Dismembrator” (Fisher Scientific), e para ajudar na lise a ressuspensão de células foi previamente incubada com lisozima 1 µg/ml, 4 °C por 30 minutos. Após a lise celular, foi realizada nova centrifugação a 4000 g por 5 minutos para separação das frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado). Através da análise em gel de poliacrilamida 15% pelo método de Laemmli, (1970) e revelação com 0,010% de Comassie brilhant blue G-250, foi observado que SELB estava na fração insolúvel e não foi possível proceder com experimentos de purificação. Entretanto, foi possível realizar experimentos de imunoblotting e imunolocalização da SELB/pET28 recombinante em células de promastigotas 427 de *T. brucei*.

Para o plasmídeo SELD/pET28 foram realizados experimentos de expressão e solubilidade de uma colônia transformante em células de *E.coli* BL21 (DE3). O crescimento ocorreu a temperatura de 37 °C, sob agitação a 250 rpm e ao atingir a densidade óptica de 0,6 foi induzido com IPTG para uma concentração final de 1mM por 16 horas a 20 °C. A cultura foi centrifugada a 4000 g por 15 minutos e ressuspêndida em tampão PBS 1X e submetida a lise por sonicação (3 ciclos de 10 segundos cada, com intervalos de 1 minuto) Após centrifugação, foram separadas as frações solúvel e precipitado e analisados em gel de poiliacrilamida 15% SDS-PAGE e revelado com comassie (0,010%), (Laemmli, U. K., 1970). A análise revelou que a proteína SELD estava na fração solúvel, tornando possível o procedimento de purificação.

3.2.6 Purificação da proteína SELD de *T. brucei* em resina de afinidade

Estabelecido o protocolo de expressão e lise celular, o próximo passo foi a purificação da proteína SELD expressa em *E. coli*. O método cromatográfico utilizado neste trabalho foi o de cromatografia de afinidade. Essa cromatografia é frequentemente realizada em coluna composta por um ligante fixado covalentemente a uma matriz, capaz de interagir especificamente com a proteína de interesse. Na cromatografia de afinidade, ao passar a mistura protéica pelo complexo matriz-ligante ocorre interação entre a proteína alvo e o ligante imobilizado. As demais proteínas são retiradas da coluna por várias etapas de lavagem.

Como o gene de interesse foi克lonado no vetor pET28a em fusão com o N-terminal de uma seqüência que codifica 6XHIS, que por sua vez tem a capacidade de ligação ao metal divalente Co²⁺, foi possível a purificação em coluna de afinidade TALON Metal Affinity Resin (TALON Superflow Resin, Clontech). Neste tipo de purificação utiliza-se o composto imidazol para realizar a eluição da proteína, que apresenta o anel imidazólico (parte integrante da estrutura da histidina) e liga-se aos íons cobalto imobilizados na matriz.

Dessa forma, o sobrenadante proveniente da lise celular de 1 litro de cultura bacteriana, foi utilizado na purificação da proteína SELD de *T. brucei* na sua forma nativa em cromatografia de afinidade em resina de cobalto (TALON Superflow Resin, Clontech). A coluna foi empacotada com 5 ml de resina de cobalto e o sistema foi mantido a temperatura ambiente. Antes de equilibrar a coluna, foi realizada uma lavagem com 3 volumes de coluna de H₂O milliQ (15 ml de água) e posteriormente, a coluna foi equilibrada com o tampão (1X PBS + 10 mM de imidazol) em 3 volumes de coluna. Em seguida, foi aplicado o sobrenadante (50 ml) e a coluna foi lavada (3 volumes de coluna) com tampão (1X PBS + 10 mM de imidazol) para a retirada de proteínas inespecíficas que não se ligam ou se ligam fracamente a resina. Foram feitas eluições em duplicata de 10 ml cada em concentrações diferentes de imidazol (10 mM, 20mM, 50 mM e 200 mM). Após eluição as frações coletadas foram

analisadas em SDS-PAGE 15% (Laemmli, U. K., 1970). A fração com a proteína eluída foi dialisada em tampão 1X PBS (1litro). Foram efetuadas 3 trocas de tampão e o sistema foi mantido a 4 °C e a quantificação da proteína foi realizada pelo método de Bradford, 1976.

3.3 Caracterização das proteínas recombinantes SELB e SELD de *T. brucei*

3.3.1 Focalização Isoelétrica

A focalização isoelétrica é uma técnica de alta resolução que separa proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos. Proteínas são moléculas anfóteras, apresentam redes de cargas negativas, positivas ou nulas dependendo da sua composição de aminoácidos, do enovelamento e do pH do meio em que estão. A rede de cargas de uma proteína é a soma de todas as cargas positivas e negativas das suas cadeias laterais e dos resíduos amino e carboxi-terminal. O ponto isoelétrico é um pH específico no qual a soma da rede de cargas da proteína é nula. Proteínas são negativamente carregadas em valores de pH acima do seu pI e positivamente carregadas abaixo dele (STOYANOV et al., 2005), (Protein Electrophoresis Technical Manual, Amersham Pharmacia Biotech, disponível em <http://www1.gelifesciences.com>).

Nesta técnica, um gradiente de pH é estabelecido ao longo de um gel à base de uma mistura de compostos orgânicos de baixa massa molecular denominados anfólitos, que têm a propriedade de agir como ácidos (doadores de prótons). Quando uma mistura de proteínas é aplicada ao gel e sujeita a um campo elétrico, ela pode inicialmente mover-se através do gel em direção ao eletrodo com carga oposta. A proteína irá migrar até o ponto onde o valor de pH for igual ao seu pI (STOYANOV et al., 2005), (Protein Electrophoresis Technical Manual, Amersham Pharmacia Biotech disponível em <http://www1.gelifesciences.com>).

Neste experimento utilizou-se o sistema “Phast System” (Pharmacia LKB Biotechnology), que utiliza um “Phast Gel IEF 3-9” (Amersham Pharmacia), o qual permitiu

a determinação do pI situado no intervalo de pH 3 a 9. Para determinar o pI da proteína SELD foi aplicado 2 mg/ml de proteína em tampão 1X PBS. A determinação do pI foi realizada sob condições padrão do equipamento e a coloração por Comassie blue G-250 0,1% em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%. Os padrões de pI utilizados que constituem o Kit de calibração (Amersham Pharmacia Biotech) estão descritos na tabela 11.

Tabela 11 - Padrões de pI constituintes do Kit geral de calibração “Phast Gel IEF 3-9”

Padrões de pI	pI
Tripsinogênio	9,30
Banda básica de lectina	8,65
Banda média de lectina	8,15
Banda ácida de lectina	8,15
Mioglobina básica	7,35
Mioglobina ácida	6,85
Anidrase carbônica humana	6,55
Anidrase carbônica bovina	5,85
β Lactoglobulina A	5,20
Inibidor de tripsina de soja	4,55

3.3.2 Experimento de Gel nativo

O gel nativo é uma técnica que determina a homogeneidade da proteína, assim como estuda sua composição e estima sua estrutura nativa, desde que sua conformação e atividade biológica permaneçam intactas durante a técnica. É ocasionalmente usada para medidas de massa molecular, entretanto o SDS-PAGE é mais fácil e confiável para este tipo de aplicação. É difícil estimar se a proteína mantém seu enovelamento, volume parcial específico e grau de hidratação, portanto é importante a aplicação de outras técnicas para complementar esse

experimento (DAVIS, 1964), (Native PAGE Manual, Separation Technique File N₀. 120 Phastsystem TM, Amersham Biosciences, disponível em: <<http://www1.gelifesciences.com>>).

O gradiente de separação no gel determina um conjunto de massa molecular que é possível analisar em uma corrida. O PhastGel gradiente de 8-25 é composto para apresentar uma relação linear entre a distância de migração da proteína e o logaritmo de sua massa molecular para proteínas nativas e globulares entre 50 000 e 750 000 Da. Proteínas acima de 750 000 Da apresentam forma muito larga para entrarem no gradiente do gel e abaixo de 50 000 Da pode aparecer no gel, mas sua distância de migração pode não ser em proporção linear com o log de sua massa molecular. Similarmente, o gradiente do PhastGel de 10-15 apresenta limites entre 90 000 a 700 000 para proteínas nativas e globulares de acordo com sua relação linear entre a distância de migração e o log de sua massa molecular. A distância de migração para proteínas não globulares ou com cargas extremas não é proporcional ao log de suas massas moleculares. As proteínas são separadas no gradiente de acordo com seu tamanho e carga. O pH do PhastGel é 8,8, então proteínas com ponto isoelétrico abaixo de 8,5 adquirem uma rede de cargas negativas e migram através do empilhamento homogêneo do gel (DAVIS, 1964), (Native PAGE Manual, Separation Technique File N₀. 120 Phastsystem TM, Amersham Biosciences, disponível em: <<http://www1.gelifesciences.com>>).

Foi realizado experimento de gel nativo da proteína recombinante SELD em gradiente de PhastGel de 8-25 em tampão 0,112 M Tris, 0,112 M de acetato, pH 6,4. Foram aplicados no gel 2 µl de proteína a 1mg/ml e 2µl do padrão (Kit de padrões abaixo relacionados-Amersham Biosciences), (tabela 12). O gel foi revelado com comassie G-250 0,1% e descorado com solução de ácido acético 0,1%.

Tabela 12 - Padrões de massa molecular constituintes do Kit geral de calibração “PhastGel 8-25”

Padrões	Massa Molecular (kDa)
Tiroglobulina	669
Ferritina	440
Catalase	232
Lactase Deidrogenase	140
Albumina	67

3.3.3 Ensaios de cristalização

A cristalização de uma proteína permite a determinação de sua estrutura tridimensional por difração de raios X. A estratégia utilizada para induzir a cristalização de macromoléculas constitui em conduzir lentamente o sistema a um estado de supersaturação. Este estado é um ambiente favorável que maximiza as interações e diminui a repulsão entre as moléculas em solução. Dessa forma, as moléculas podem se arranjar de maneira ordenada e periódica dando origem a um cristal.

Existem vários métodos utilizados para a obtenção do cristal de proteína, dentre eles o método de Difusão de Vapor, baseado no processo de equilíbrio entre duas soluções, através da passagem das espécies voláteis da solução menos concentrada para a mais concentrada (BLUNDELL: JOHNSON, 1976). Neste método, a técnica mais utilizada é a Gota Suspensa (BRANDEN: TOOZE, 1991), no qual a gota da solução de proteína mais o agente precipitante e aditivos é colocada sobre uma lamínula de vidro siliconizada e, posteriormente fixada em um reservatório hermeticamente fechado, contendo a solução de cristalização em maior volume e mais concentrada. Os cristais tendem a se formar à medida que a

concentração da proteína e do agente precipitante aumenta lentamente na gota e os solventes voláteis passam dessa para a solução do poço.

Os experimentos de cristalização com a proteína SELD foram realizados após a obtenção da proteína pura fusionada à cauda de histidina. Foi adicionado 500 µl de cada solução precipitante em cada poço e em uma lamínula siliconizada fez-se uma gota contendo 3 µl de solução precipitante (solução do poço) e 3 µl da solução de proteína na concentração de 8 mg/ml. Todo o procedimento foi realizado em ambiente isolado com temperatura constante de 18 °C e foram utilizados como agentes precipitantes os fatorais: Crystal Screen Reagent Formulation I e II (Hampton Research).

3.3.4 Imunoblotting

Imunoblotting é a técnica usada para identificar抗igenos macromoleculares que reagem com um anticorpo específico. As proteínas são primeiramente separadas por eletroforese e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Os sítios de ligação da membrana que não reagiram são bloqueados para suprimir adsorção não específica de anticorpos. As proteínas imobilizadas reagem com o anticorpo específico. Em seguida, o complexo Ag-Ac (antígeno-anticorpo) reage com um segundo anticorpo (anti-Ig-G de camundongo) que está marcado com fosfatase alcalina que será visualizada após o uso de solução reveladora (SAMBROOK: RUSSEL, 2001).

Foi realizado experimento de Imunoblotting com as proteínas SELB e SELD em extrato celular de *T. brucei* 427. O extrato celular foi preparado com células de *T. brucei* 427 em fase exponencial (1×10^7 células/ml) e 1 ml dessa cultura foi centrifugada. O “pellet” foi lavado com 1ml de tampão PBS 1X e novamente foi centrifugado a 2070 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, o “pellet” foi ressuspensione em 10 µl de sample buffer SDS-PAGE 2X (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 0,1% bromophenol blue; 10 %

glicerol e 5% β - mercaptoethanol) e essa amostra foi fervida por 5 minutos e sonicada no ultra-som (Ultracleaner 1400-Unique, Ultrasonic clean) por 2 minutos para aplicação em gel.

A amostra de extrato celular foi aplicada em SDS-PAGE a 15% e este foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, posteriormente corada com Ponceau 0,5% para visualização das bandas. A membrana ficou em contato com uma solução de leite em pó desnatado dissolvido em tampão TBS 1X por 12 horas para o bloqueio de sítios inespecíficos e depois foi lavada em TBS 1X para a retirada do leite e incubada com o primeiro anticorpo (anticorpos anti-SELB e anti-SELD, para cada experimento) por 2 horas. Após lavagem da membrana com TBS 1X ocorreu a incubação com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) marcado com fosfatase alcalina por 2 horas. Foi realizada nova lavagem com TBS 1X. A seguir, a membrana foi tratada com uma solução reveladora (Kit da Biorad) por 10 minutos e lavada com água para interromper a reação.

Os reagentes utilizados nesse experimento foram:

1. Tampão de transferência: Tris-base 48 mM

Glicina 39 mM

SDS 0,035% (m/v)

800 mL de água destilada e 200 mL de metanol

2. TBS (Tris buffered saline): NaCl 1,5 M

Tris/HCl 0,5 M

1000 mL de água destilada (10 vezes concentrado)

OBS: Acertar pH para 8,0.

3. Solução Reveladora (Biorad): 9,5 ml de TBS 1X

400 µl de 25 x AP Color development buffer

100 µl de AP Color Reagent A

100 µl de AP Color Reagent B

4. Solução de Bloqueio: 2,5 g de leite desnatado (Molico) em 50 mL de TBS [1X].

5. Corante Ponceau: 0,5% de Ponceau em ácido acético 0,1%.

6. Solução descorante: ácido acético a 0,1%.

A obtenção dos soros anti-SELB e anti-SELD de camundongos foi gentilmente realizada pela Prof^a Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, docente do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

A proteína SELB na fração insolúvel foi aplicada em gel SDS-PAGE 15%. Após a eletroforese, a banda correspondente à SELB foi recortada do gel, macerada e ressuspandida em 200 µl de tampão PBS 1X. Foi utilizado 100 µl dessa ressuspensão para injeção intraperitoneal em camundongo. Também foi realizada injeção intraperitoneal de 100 µl da proteína SELD solúvel a 0,5 mg/ml em camundongo. Após 30 dias, outra injeção foi realizada sob as mesmas condições e 10 dias depois os soros foram coletados.

3.3.5 Imunolocalização

A imunolocalização é uma técnica que utiliza anticorpos específicos para a localização de proteínas em um tecido ou organismo. Esta técnica permite, mais especificamente em parasitas, observar se proteínas são nucleares, mitocondriais, citoplasmáticas, flagelares ou se fazem parte de vesículas ou organelas como glicossomos.

No experimento de imunofluorescência 1 ml de parasitas (5×10^6 células/ml) foram centrifugados por 2 minutos a 2070rpm em temperatura ambiente. A lavagem do “pellet” foi feita com tampão PBS 1X e, em seguida as células foram ressuspensas em 1 ml de PBS 1X. Foi adicionada uma gota da suspensão de parasitas em cada poço de uma lâmina (8 poços) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e dentro do fluxo laminar. As gotas foram retiradas e, em cada poço foi adicionada uma gota de paraformaldeído 2% em tampão PBS 1X e a lâmina foi incubada por 20 minutos. Depois do período de incubação o paraformaldeído foi retirado e cada poço foi lavado 3 vezes com tampão PBS 1X. Após a fixação dos parasitas, o experimento pode ser prosseguido fora do fluxo laminar. Após a lavagem para retirada do paraformaldeído, foi adicionada 10 μ l de Triton 0,1% em PBS 1X por poço e foi incubado por 5 minutos. Exatamente após 5 minutos de incubação, os poços foram lavados com PBS 1X (3 vezes), incubados com BSA 1% em PBS 1X por 30 minutos e novamente lavados com PBS 1X (3 vezes). Foi adicionado a cada poço 25 μ l do anticorpo primário nas diluições desejadas e incubação de 1 hora. O anticorpo foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1X (3 vezes). Em seguida, ocorreu a incubação de (1:300) do anticorpo secundário anti- IgG fluorescente (Alexa Flúor 555 - Invitrogen) e 1 μ l de DAPI (1:250) por 1 hora. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS 1X (3 vezes) e foi adicionado 8 μ l de vecta shield em cada poço, para preservar a fluorescência, e então a lâmina foi coberta com uma lamínula e fixada com esmalte.

O experimento de imunofluorescência foi realizado em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Sérgio Schenckman da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) com a ajuda das alunas de doutorado Teresa Cristina Leandro de Jesus e de mestrado Fernanda Costa, aluna do grupo de cristalografia de proteínas sob a orientação do Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann. Foram realizadas várias diluições dos anticorpos em células de *T. brucei* 427 nativa (1:100, 1:200, 1:400, 1: 800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 e 1:12800) para testar a

melhor titulação de cada anticorpo na imunolocalização das proteínas SELB e SELD. Também foram realizados experimentos de imunolocalização nas mesmas diluições acima descritas para as enzimas SECp43, projeto de estudo da aluna de doutorado Maria Amélia Oliva e seril-tRNA sintetase, enzima recombinante de *T. brucei* obtida pela primeira turma de Ciências Físicas e Biomoleculares do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo em aula experimental.

3.4 Resultados

3.4.1 Amplificação e clonagem dos genes *selB* e *selD* em vetores de clonagem pTZ57R/T e pGEM-T

Para amplificar o DNA foi seguida a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), com oligonucleotídeos desenhados para os genes *selB* e *selD* de *T. brucei* e utilizando-se a enzima Taq DNA polimerase (Figura 24).

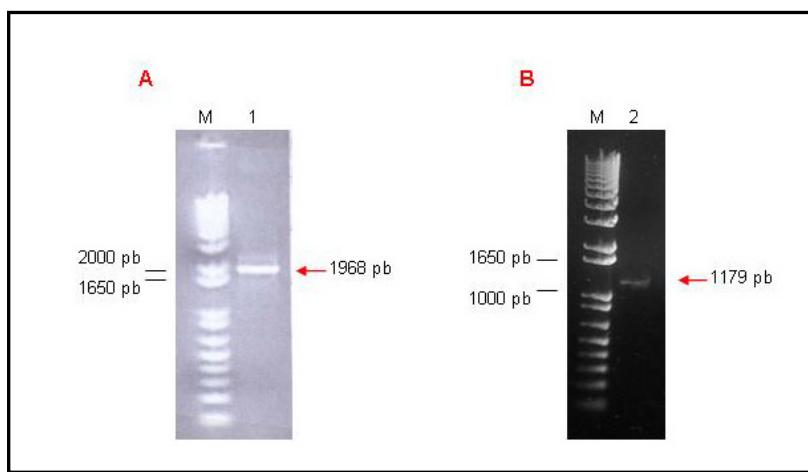


Figura 24 - Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) dos genes *selB* e *selD*. Gel de agarose 0,8% TAE 1X mostrando o resultado da eletroforese dos produtos de reação. Em A: coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen), (pb = pares de bases) e coluna 1: presença do fragmento amplificado em 1968 pb para *selB*. Em B: coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb plus e coluna 2: fragmento de 1179 pb referente à amplificação do gene *selD*.

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados em gel de agarose 0,8 % com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em tampão TAE 1X apresentando migração aproximada de 1968 pb e 1179 pb para *selB* e *selD*, respectivamente (Figura 24). Esses fragmentos de DNA foram purificados (Kit Concert – Invitrogen).

Foram realizadas as reações de ligação dos genes *selB* em vetor pTZ57R/T (Fermentas) e *selD* em vetor pGEM-T (Promega). Essas reações foram transformadas em bactérias competentes *Escherichia coli* DH5 α , plaqueadas em meio LB sólido contendo IPTG (0,5 mM), X-gal (80 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml). A seleção de recombinantes foi determinada pela clivagem das construções (Figura 25) SELB/pTZ e SELD/pGEMT com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I e sequenciamento dos DNAs plasmidiais.

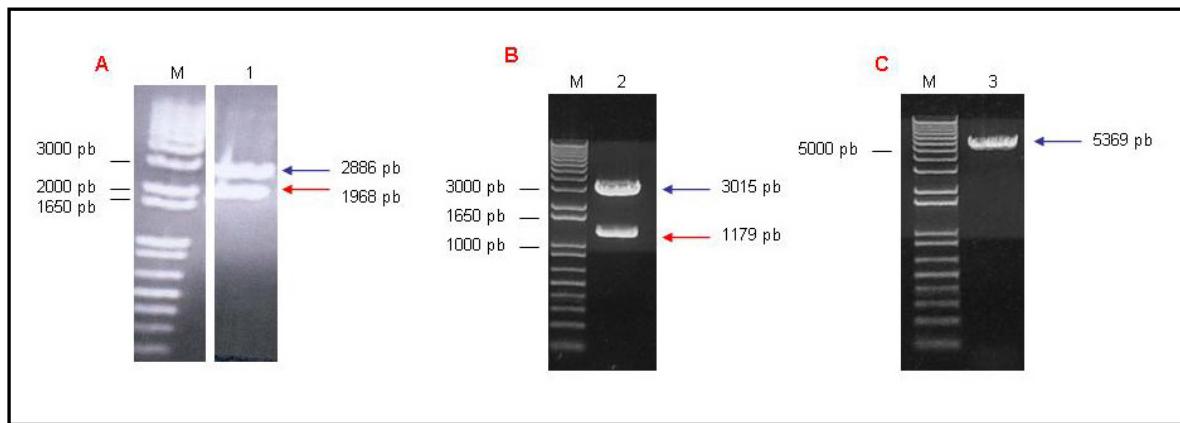


Figura 25. Digestão das construções recombinantes SELB/pTZ e SELD/pGEMT e do plasmídeo pET 28a (+) com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I. A análise foi realizada em gel de agarose 0,8% TAE 1X. Em **A:** coluna M: marcador de massa molecular (1 Kb Plus – Invitrogen) e coluna 1: digestão de SELB/pTZ com fragmento esperado de 1968 pb para SELB e evidencia-se uma banda de 2886 pb referente ao vetor pTZ57R/T. Em **B:** coluna 2: clivagem da construção SELD/pGEM-T com fragmento esperado de SELD (1179 pb) e pGEM-T (3015 pb). Em **C:** digestão do plasmídeo pET 28 a(+) em 5369 pb. Seta vermelha representa o fragmento do inserto e seta azul o fragmento referente aos vetores de clonagem e expressão.

3.4.2 Subclonagem dos genes *selB* e *selD* em vetor de expressão pET 28a (+) e sequenciamento das construções plasmidiais

Os fragmentos digeridos foram purificados para subclonagem em vetor pET 28 a (+) e a reação de ligação para cada gene, *selB* e *selD*, ocorreu a 4 °C por 12 horas. Em seguida, as

reações de ligação foram transformadas em bactérias competentes *E. coli* DH5 α e posteriormente em *E. coli* BL21 (DE3). As bactérias transformadas foram selecionadas após plaqueamento em meio de cultura LB/ágar contendo o antibiótico canamicina (30 μ g/ml) por 12 horas a 37 °C. Os recombinantes foram analisados por reação de PCR (Figura 26) e sequenciamento para confirmação da presença dos insertos (Figura 27).

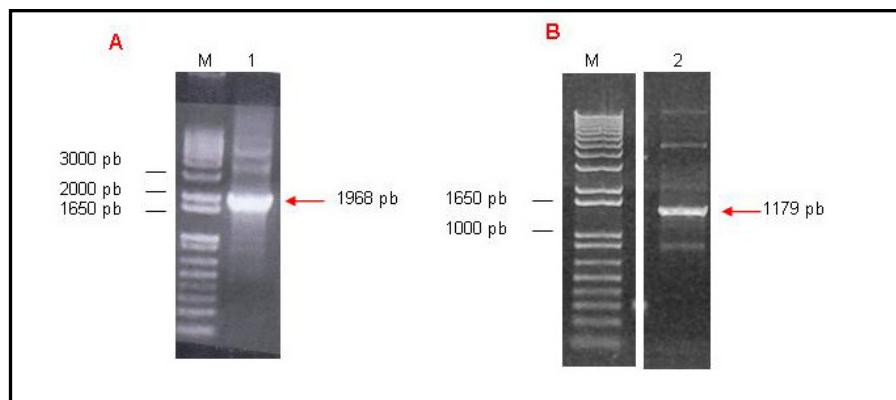


Figura 26. Experimento de amplificação dos DNAs plasmídias SELB/pET28 e SELD/pET28 com oligonucleotídeos específicos. Análise em gel de agarose 0,8% em TAE 1X. Em **A**: coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Invitrogen) e coluna 1: amplificação de SELB/pET28 com primers T74G + Term com fragmento esperado de 1968 pb. Em **B**: coluna 2: resultado de amplificação de SELD/pET28 com primers T74G + Term com fragmento de 1179 pb.

O sequenciamento dos genes *selB* e *selD* em vetor pET28 a(+) foi realizado pelo método de Sanger através do equipamento ABI-Prism 377 (Perkin Elmer) pela especialista de laboratório e aluna de doutorado Susana A. Sculaccio. Foram utilizados para o sequenciamento primers específicos descritos na tabela 10, item 3.25. Após obtenção das seqüências, o alinhamento foi feito no programa Seqman (DNA Star), (Lasergene Sequence Analysis Software – DNAStar, 2001). Esta estratégia permitiu a leitura de cada posição por pelo menos duas reações independente, aumentando a confiabilidade da seqüência consenso obtida (Figura 27).

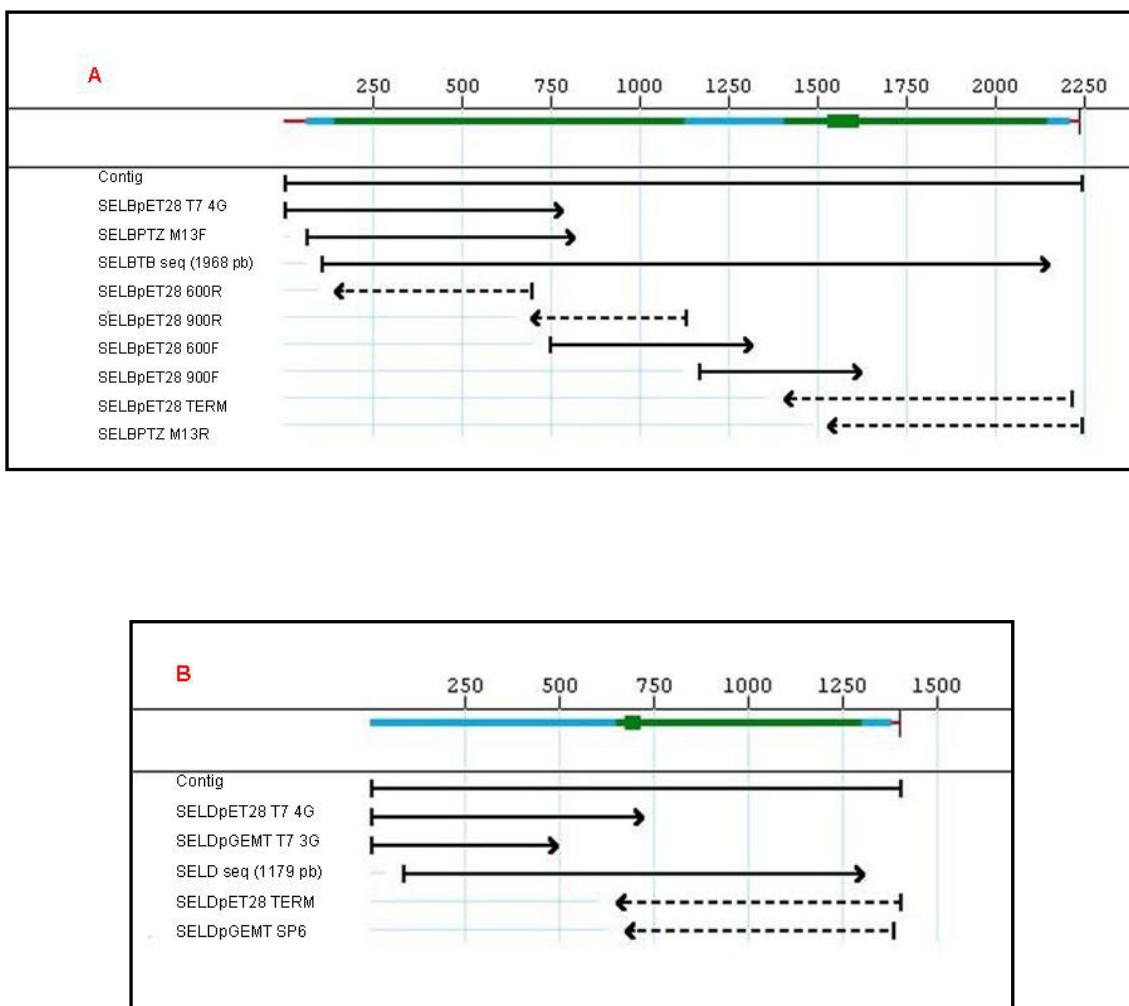


Figura 27. Alinhamento das extremidades 5' e 3' dos genes *selB* e *selD* produzido pelo programa SeqMan. Em **A**: alinhamento de *selB* nos vetores pTZ57R/T e pET28 a(+) e **B**: alinhamento de *selD* nos vetores pGEM-T e pET 28 a(+) com oligonucleotídeos específicos. Os alinhamentos indicados pelas setas (sentido esquerda para direita) representa o alinhamento da extremidade 5' e os alinhamentos indicados pelas setas (sentido direita para esquerda) representa o alinhamento 3'.

3.4.3 Testes de expressão e indução da construção SELB/pET 28 a(+)

Foi realizado um teste de expressão para o plasmídeo SELB/pET 28 a(+), variando-se a concentração de IPTG (0 – 1 mM), temperatura (20 a 37 °C), com tempo de indução de 4 horas. Os testes demonstraram que a proteína recombinante SELB expressa melhor a 37 °C e estava no precipitado, enquanto uma pequena banda foi visualizada em todas concentrações de IPTG na fração solúvel, fração essa que não era suficiente para dar prosseguimento aos experimentos de purificação (Figura 28).

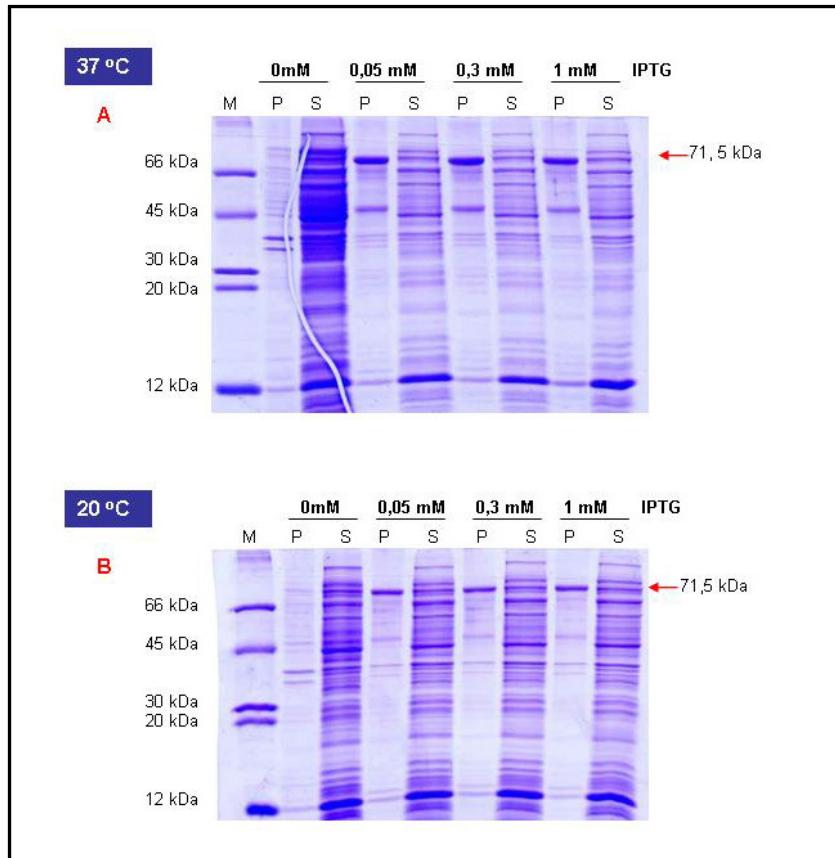


Figura 28. Teste de expressão e solubilidade da proteína recombinante SELB. A análise foi realizada em gel SDS-PAGE 15%. Na coluna M foi aplicado padrão de massa molecular em kDa. A seta vermelha indica a migração da proteína em 71,5 kDa. Em A: teste realizado a 37 °C e B: experimento realizado a 20 °C nas diferentes concentrações de IPTG. (M= marcador de massa molecular; P= Pellet e S= Sobrenadante).

3.4.4 Expressão e purificação da enzima selenofosfato sintetase, SELD, em plasmídeo

pET 28 a(+)

Após transformação na cepa *E. coli* BL21 (DE3), foi realizado o experimento de expressão do sistema SELD/pET28 a(+) a temperatura de 37 °C, sob agitação a 250 rpm e ao atingir a densidade óptica de 0,6 foi induzido com IPTG para uma concentração final de 1mM por 16 horas a 20 °C. Após indução, foram observadas em gel SDS-PAGE amostra não induzida e induzida (1 mM IPTG). Também foi realizada a lise celular por sonicação, e suas frações (sobrenadante e precipitado) foram aplicadas no gel SDS-PAGE. Pode ser visualizada migração de uma banda referente a 43 kDa esperada para SELD (Figura 29).

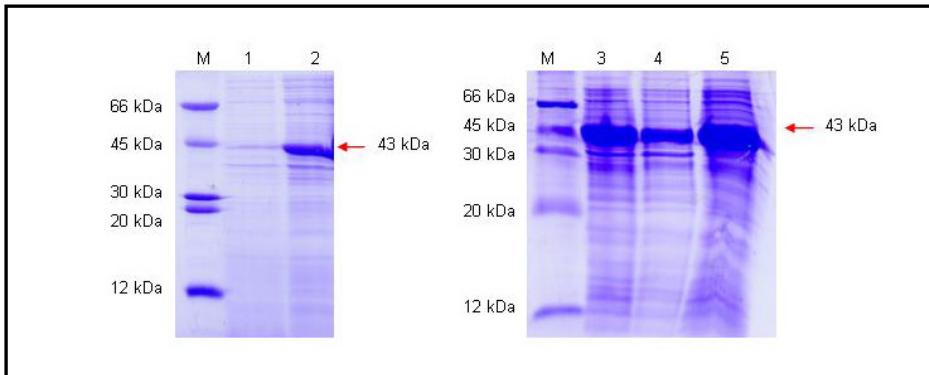


Figura 29. Experimento de indução e expressão da SELD. Colunas M = marcador de massa molecular; 1: amostra não-induzida; 2: amostra induzida em 1 mM de IPTG; 3: extrato bruto; 4: precipitado e 5: sobrenadante. A seta vermelha indica a migração da proteína SELD em 43 kDa.

A purificação da proteína SELD em larga escala foi feita a partir de 1 litro de meio de cultura, que após indução, foi centrifugada e lisada por sonicação. O sobrenadante proveniente da lise celular foi aplicado em cromatografia de afinidade em resina de cobalto (TALON Superflow Resin, Clontech). Foram realizadas eluições em diferentes concentrações de imidazol (10 mM, 20 mM, 50 mM e 200 mM) e a proteína foi eluída em 200 mM de imidazol e quantificada pelo método de Bradford em 1mg/ml em 10 ml de volume de eluição (Figura 30).

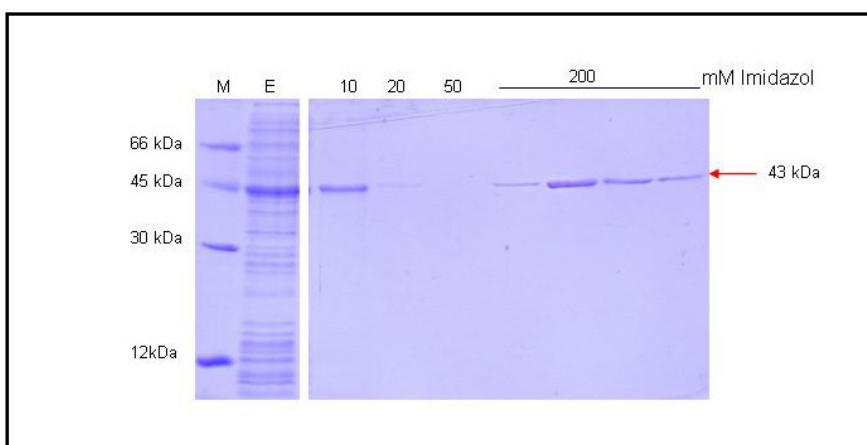


Figura 30. Resultado da purificação da SELD, após eluição na resina de cobalto (TALON). M: representa o padrão de massa molecular. Colunas E: eluato; 10; 20; 50 200 mM de imidazol (concentrações de eluição). A seta vermelha indica a migração da proteína SELD em 43 kDa.

3.4.5 Determinação do Ponto Isoelétrico (pI)

Para o experimento de focalização isoelétrica foi utilizado 2 μ l de uma alíquota contendo a proteína SELD na concentração de 2 mg/ml. Foi usado neste experimento o PhastGel com intervalos de 3 a 9 e padrões de pI que constituem o Kit de calibração (Amersham Pharmacia Biotech).

O ponto isoelétrico determinado experimentalmente (Figura 31) a partir da proteína SELD purificada foi de 6,34 (pI teórico 5,46).

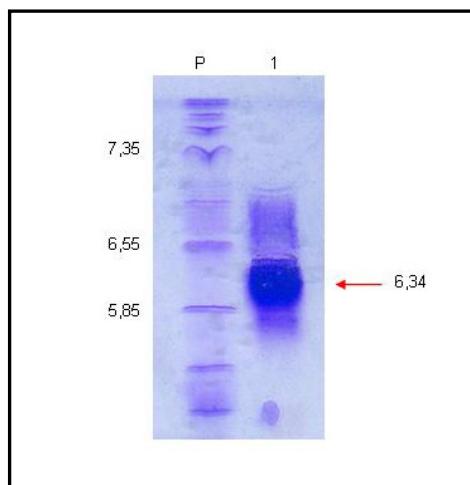


Figura 31. Determinação do ponto isoelétrico da proteína SELD. Coluna P: indica o padrão de pI e coluna 1: representa a migração da proteína SELD até o ponto onde a somatória de suas cargas é zero ou nula.

3.4.6 Experimento de gel nativo

Foi realizado experimento de gel nativo da proteína recombinante SELD em gradiente de PhastGel de 8-25 em tampão 0,112 M Tris, 0,112 M de acetato, pH 6,4. Foram aplicados no gel 2 μ l de proteína a 1mg/ml e 2 μ l do padrão (Kit de padrões - Amersham Biosciences).

A massa molecular estimada para SELD de *T. brucei* foi de 111 kDa, através do cálculo entre a distância de migração da proteína e o logaritmo de sua massa molecular (Figura 32).

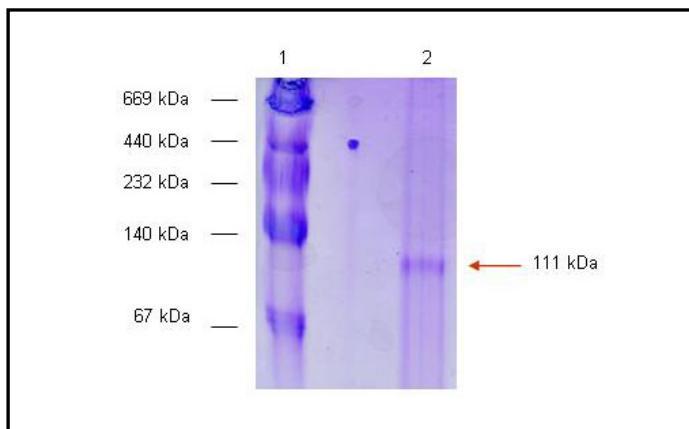
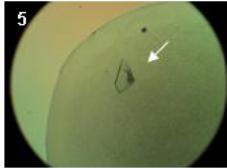
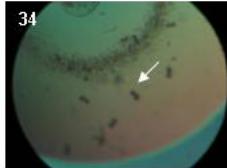
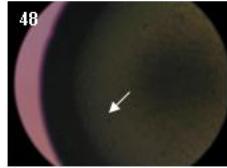


Figura 32. Experimento de gel nativo da SED de *T. brucei*. Coluna 1: padrão de massa molecular (kDa) e 2: migração da proteína recombinante SELD.

3.4.7 Ensaios de cristalização da proteína SELD

Com a proteína SELD purificada e concentrada (8 mg/ml) foram realizados testes de cristalização utilizando os Fatoriais I (50 condições) e II (48 condições), (Hampton Research), a temperatura de 18 °C. Na maioria das gotas foram observados a presença de precipitado amorfo e cristais de sal, porém existem condições favoráveis no Fatorial I (condições 5, 34 e 48) e no Fatorial II (condições 10 e 12) que precisam ser submetidas a condições de refinamento (Tabela 13).

Tabela 13 - Ensaios de cristalização da proteína SELD de *T. brucei* com Fatorial I (condições 5, 34 e 48) e Fatorial II (condições 10 e 12) da Hampton Reserch

FATORIAL I			
			5 34 48
FATORIAL II			
		10 12	
Condição	Sal	Tampão	Precipitante
5-I	0,2 M Citrato de sódio	0,1 M HEPES-Na pH 7,5	30 % v/v MPD
34-I	Nenhum	0,1 M Acetato de sódio triidratado pH 4,6	2,0 M Formato de sódio
48-I	Nenhum	0,1 M Tris/HCl pH 8,5	2,0 M Fosfato de amônio mono
10-II	0,2 M Cloreto de sódio	0,1 M Acetato de sódio pH 4,6	30 % v/v MPD
12-II	0,1 M Cloreto de cádmio	0,1m Acetato de sódio pH 4,6	30 % v/v PEG 400

3.4.8 Experimentos de Imunoblotting

As proteínas SELB e SELD foram submetidas ao experimento de caracterização através de Imunoblotting com extrato celular de *T. brucei* 427. O extrato celular foi preparado com células de *T. brucei* 427 nativa em fase logarítmica (1×10^7 células/ml).

Após incubação com o anticorpo primário (anticorpos anti-SELB e anti-SELD) e secundário (anti-IgG de camundongo) marcado com fosfatase alcalina, a membrana foi revelada com uma solução reveladora (Kit da Biorad) por 10 minutos e lavada com água para interromper a reação. O experimento de Imunoblotting da SELD foi realizado pela aluna de doutorado Susana A. Sculaccio.

Foi observada a reação do antígeno-anticorpo em uma banda na membrana de nitrocelulose com massa aproximada a SELB em 71,5 kDa nas diluições do soro (1: 5000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:60000 e 1:100000) e SELD em 43 kDa na diluição de 1:100 do soro em extrato celular *T. brucei* 427 (Figura 33).

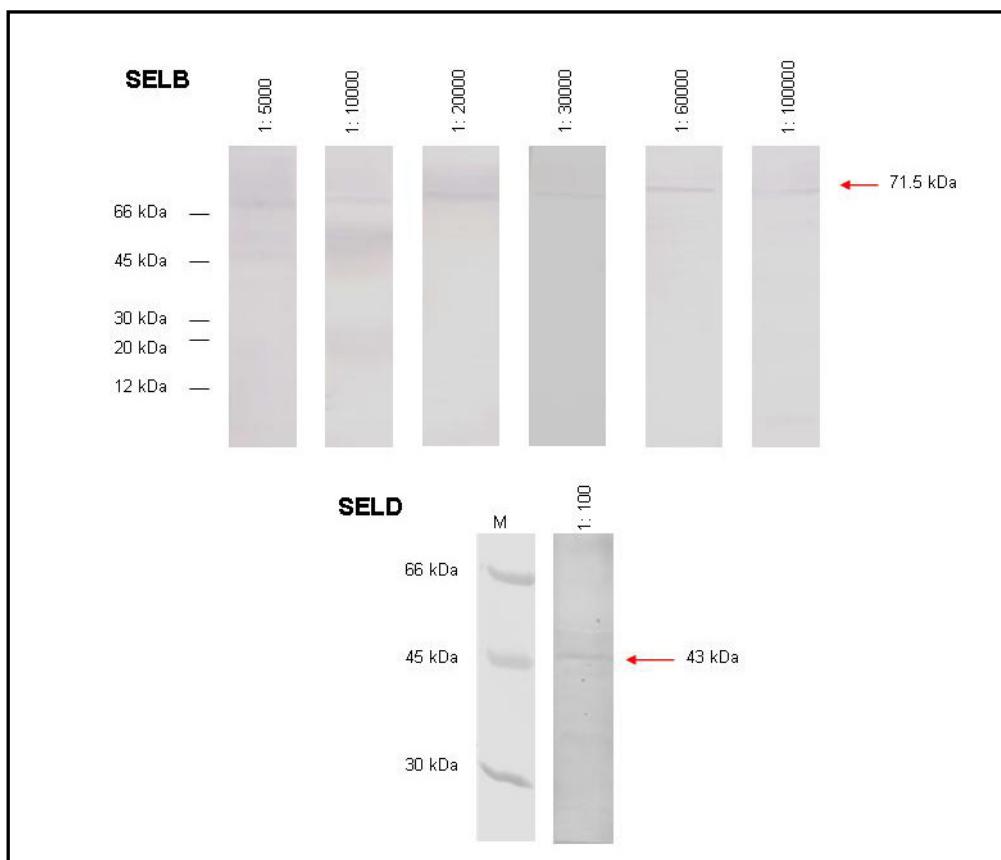


Figura 33. Imunoblotting dos soros anti-SELB e anti-SELD em células *T. brucei* 427. Cada fita representa as diluições do soro anti-SELB (1:5000-1:100000) com marcação em uma banda de 71,5 kDa e anti-SELD (1:100) na banda de 43 kDa. M = marcador de massa molecular (kDa).

3.4.9 Experimentos de Imunolocalização

As células de *T. brucei* 427 (5×10^6 células/ml) foram submetidas ao experimento de imunofluorescência para localização das proteínas SELB, SELD, SECp43 e seril-tRNA sintetase. As células foram fixadas com 2% de paraformaldeído, permeabilizadas com 0,1% de Triton e 1% de BSA e incubadas com os anticorpos primários em várias diluições (1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:700, 1:800, 1:900, 1:1000, 1:1100, 1:1200, 1:1300, 1:1400, 1:1500, 1:1600, 1:1700, 1:1800, 1:1900, 1:2000, 1:2100, 1:2200, 1:2300, 1:2400, 1:2500, 1:2600, 1:2700, 1:2800, 1:2900, 1:3000, 1:3100, 1:3200, 1:3300, 1:3400, 1:3500, 1:3600, 1:3700, 1:3800, 1:3900, 1:4000, 1:4100, 1:4200, 1:4300, 1:4400, 1:4500, 1:4600, 1:4700, 1:4800, 1:4900, 1:5000, 1:5100, 1:5200, 1:5300, 1:5400, 1:5500, 1:5600, 1:5700, 1:5800, 1:5900, 1:6000, 1:6100, 1:6200, 1:6300, 1:6400, 1:6500, 1:6600, 1:6700, 1:6800, 1:6900, 1:7000, 1:7100, 1:7200, 1:7300, 1:7400, 1:7500, 1:7600, 1:7700, 1:7800, 1:7900, 1:8000, 1:8100, 1:8200, 1:8300, 1:8400, 1:8500, 1:8600, 1:8700, 1:8800, 1:8900, 1:9000, 1:9100, 1:9200, 1:9300, 1:9400, 1:9500, 1:9600, 1:9700, 1:9800, 1:9900, 1:10000, 1:10100, 1:10200, 1:10300, 1:10400, 1:10500, 1:10600, 1:10700, 1:10800, 1:10900, 1:11000, 1:11100, 1:11200, 1:11300, 1:11400, 1:11500, 1:11600, 1:11700, 1:11800, 1:11900, 1:12000, 1:12100, 1:12200, 1:12300, 1:12400, 1:12500, 1:12600, 1:12700, 1:12800, 1:12900, 1:13000, 1:13100, 1:13200, 1:13300, 1:13400, 1:13500, 1:13600, 1:13700, 1:13800, 1:13900, 1:14000, 1:14100, 1:14200, 1:14300, 1:14400, 1:14500, 1:14600, 1:14700, 1:14800, 1:14900, 1:15000, 1:15100, 1:15200, 1:15300, 1:15400, 1:15500, 1:15600, 1:15700, 1:15800, 1:15900, 1:16000, 1:16100, 1:16200, 1:16300, 1:16400, 1:16500, 1:16600, 1:16700, 1:16800, 1:16900, 1:17000, 1:17100, 1:17200, 1:17300, 1:17400, 1:17500, 1:17600, 1:17700, 1:17800, 1:17900, 1:18000, 1:18100, 1:18200, 1:18300, 1:18400, 1:18500, 1:18600, 1:18700, 1:18800, 1:18900, 1:19000, 1:19100, 1:19200, 1:19300, 1:19400, 1:19500, 1:19600, 1:19700, 1:19800, 1:19900, 1:20000, 1:20100, 1:20200, 1:20300, 1:20400, 1:20500, 1:20600, 1:20700, 1:20800, 1:20900, 1:21000, 1:21100, 1:21200, 1:21300, 1:21400, 1:21500, 1:21600, 1:21700, 1:21800, 1:21900, 1:22000, 1:22100, 1:22200, 1:22300, 1:22400, 1:22500, 1:22600, 1:22700, 1:22800, 1:22900, 1:23000, 1:23100, 1:23200, 1:23300, 1:23400, 1:23500, 1:23600, 1:23700, 1:23800, 1:23900, 1:24000, 1:24100, 1:24200, 1:24300, 1:24400, 1:24500, 1:24600, 1:24700, 1:24800, 1:24900, 1:25000, 1:25100, 1:25200, 1:25300, 1:25400, 1:25500, 1:25600, 1:25700, 1:25800, 1:25900, 1:26000, 1:26100, 1:26200, 1:26300, 1:26400, 1:26500, 1:26600, 1:26700, 1:26800, 1:26900, 1:27000, 1:27100, 1:27200, 1:27300, 1:27400, 1:27500, 1:27600, 1:27700, 1:27800, 1:27900, 1:28000, 1:28100, 1:28200, 1:28300, 1:28400, 1:28500, 1:28600, 1:28700, 1:28800, 1:28900, 1:29000, 1:29100, 1:29200, 1:29300, 1:29400, 1:29500, 1:29600, 1:29700, 1:29800, 1:29900, 1:30000, 1:30100, 1:30200, 1:30300, 1:30400, 1:30500, 1:30600, 1:30700, 1:30800, 1:30900, 1:31000, 1:31100, 1:31200, 1:31300, 1:31400, 1:31500, 1:31600, 1:31700, 1:31800, 1:31900, 1:32000, 1:32100, 1:32200, 1:32300, 1:32400, 1:32500, 1:32600, 1:32700, 1:32800, 1:32900, 1:33000, 1:33100, 1:33200, 1:33300, 1:33400, 1:33500, 1:33600, 1:33700, 1:33800, 1:33900, 1:34000, 1:34100, 1:34200, 1:34300, 1:34400, 1:34500, 1:34600, 1:34700, 1:34800, 1:34900, 1:35000, 1:35100, 1:35200, 1:35300, 1:35400, 1:35500, 1:35600, 1:35700, 1:35800, 1:35900, 1:36000, 1:36100, 1:36200, 1:36300, 1:36400, 1:36500, 1:36600, 1:36700, 1:36800, 1:36900, 1:37000, 1:37100, 1:37200, 1:37300, 1:37400, 1:37500, 1:37600, 1:37700, 1:37800, 1:37900, 1:38000, 1:38100, 1:38200, 1:38300, 1:38400, 1:38500, 1:38600, 1:38700, 1:38800, 1:38900, 1:39000, 1:39100, 1:39200, 1:39300, 1:39400, 1:39500, 1:39600, 1:39700, 1:39800, 1:39900, 1:40000, 1:40100, 1:40200, 1:40300, 1:40400, 1:40500, 1:40600, 1:40700, 1:40800, 1:40900, 1:41000, 1:41100, 1:41200, 1:41300, 1:41400, 1:41500, 1:41600, 1:41700, 1:41800, 1:41900, 1:42000, 1:42100, 1:42200, 1:42300, 1:42400, 1:42500, 1:42600, 1:42700, 1:42800, 1:42900, 1:43000, 1:43100, 1:43200, 1:43300, 1:43400, 1:43500, 1:43600, 1:43700, 1:43800, 1:43900, 1:44000, 1:44100, 1:44200, 1:44300, 1:44400, 1:44500, 1:44600, 1:44700, 1:44800, 1:44900, 1:45000, 1:45100, 1:45200, 1:45300, 1:45400, 1:45500, 1:45600, 1:45700, 1:45800, 1:45900, 1:46000, 1:46100, 1:46200, 1:46300, 1:46400, 1:46500, 1:46600, 1:46700, 1:46800, 1:46900, 1:47000, 1:47100, 1:47200, 1:47300, 1:47400, 1:47500, 1:47600, 1:47700, 1:47800, 1:47900, 1:48000, 1:48100, 1:48200, 1:48300, 1:48400, 1:48500, 1:48600, 1:48700, 1:48800, 1:48900, 1:49000, 1:49100, 1:49200, 1:49300, 1:49400, 1:49500, 1:49600, 1:49700, 1:49800, 1:49900, 1:50000, 1:50100, 1:50200, 1:50300, 1:50400, 1:50500, 1:50600, 1:50700, 1:50800, 1:50900, 1:51000, 1:51100, 1:51200, 1:51300, 1:51400, 1:51500, 1:51600, 1:51700, 1:51800, 1:51900, 1:52000, 1:52100, 1:52200, 1:52300, 1:52400, 1:52500, 1:52600, 1:52700, 1:52800, 1:52900, 1:53000, 1:53100, 1:53200, 1:53300, 1:53400, 1:53500, 1:53600, 1:53700, 1:53800, 1:53900, 1:54000, 1:54100, 1:54200, 1:54300, 1:54400, 1:54500, 1:54600, 1:54700, 1:54800, 1:54900, 1:55000, 1:55100, 1:55200, 1:55300, 1:55400, 1:55500, 1:55600, 1:55700, 1:55800, 1:55900, 1:56000, 1:56100, 1:56200, 1:56300, 1:56400, 1:56500, 1:56600, 1:56700, 1:56800, 1:56900, 1:57000, 1:57100, 1:57200, 1:57300, 1:57400, 1:57500, 1:57600, 1:57700, 1:57800, 1:57900, 1:58000, 1:58100, 1:58200, 1:58300, 1:58400, 1:58500, 1:58600, 1:58700, 1:58800, 1:58900, 1:59000, 1:59100, 1:59200, 1:59300, 1:59400, 1:59500, 1:59600, 1:59700, 1:59800, 1:59900, 1:60000, 1:60100, 1:60200, 1:60300, 1:60400, 1:60500, 1:60600, 1:60700, 1:60800, 1:60900, 1:61000, 1:61100, 1:61200, 1:61300, 1:61400, 1:61500, 1:61600, 1:61700, 1:61800, 1:61900, 1:62000, 1:62100, 1:62200, 1:62300, 1:62400, 1:62500, 1:62600, 1:62700, 1:62800, 1:62900, 1:63000, 1:63100, 1:63200, 1:63300, 1:63400, 1:63500, 1:63600, 1:63700, 1:63800, 1:63900, 1:64000, 1:64100, 1:64200, 1:64300, 1:64400, 1:64500, 1:64600, 1:64700, 1:64800, 1:64900, 1:65000, 1:65100, 1:65200, 1:65300, 1:65400, 1:65500, 1:65600, 1:65700, 1:65800, 1:65900, 1:66000, 1:66100, 1:66200, 1:66300, 1:66400, 1:66500, 1:66600, 1:66700, 1:66800, 1:66900, 1:67000, 1:67100, 1:67200, 1:67300, 1:67400, 1:67500, 1:67600, 1:67700, 1:67800, 1:67900, 1:68000, 1:68100, 1:68200, 1:68300, 1:68400, 1:68500, 1:68600, 1:68700, 1:68800, 1:68900, 1:69000, 1:69100, 1:69200, 1:69300, 1:69400, 1:69500, 1:69600, 1:69700, 1:69800, 1:69900, 1:70000, 1:70100, 1:70200, 1:70300, 1:70400, 1:70500, 1:70600, 1:70700, 1:70800, 1:70900, 1:71000, 1:71100, 1:71200, 1:71300, 1:71400, 1:71500, 1:71600, 1:71700, 1:71800, 1:71900, 1:72000, 1:72100, 1:72200, 1:72300, 1:72400, 1:72500, 1:72600, 1:72700, 1:72800, 1:72900, 1:73000, 1:73100, 1:73200, 1:73300, 1:73400, 1:73500, 1:73600, 1:73700, 1:73800, 1:73900, 1:74000, 1:74100, 1:74200, 1:74300, 1:74400, 1:74500, 1:74600, 1:74700, 1:74800, 1:74900, 1:75000, 1:75100, 1:75200, 1:75300, 1:75400, 1:75500, 1:75600, 1:75700, 1:75800, 1:75900, 1:76000, 1:76100, 1:76200, 1:76300, 1:76400, 1:76500, 1:76600, 1:76700, 1:76800, 1:76900, 1:77000, 1:77100, 1:77200, 1:77300, 1:77400, 1:77500, 1:77600, 1:77700, 1:77800, 1:77900, 1:78000, 1:78100, 1:78200, 1:78300, 1:78400, 1:78500, 1:78600, 1:78700, 1:78800, 1:78900, 1:79000, 1:79100, 1:79200, 1:79300, 1:79400, 1:79500, 1:79600, 1:79700, 1:79800, 1:79900, 1:80000, 1:80100, 1:80200, 1:80300, 1:80400, 1:80500, 1:80600, 1:80700, 1:80800, 1:80900, 1:81000, 1:81100, 1:81200, 1:81300, 1:81400, 1:81500, 1:81600, 1:81700, 1:81800, 1:81900, 1:82000, 1:82100, 1:82200, 1:82300, 1:82400, 1:82500, 1:82600, 1:82700, 1:82800, 1:82900, 1:83000, 1:83100, 1:83200, 1:83300, 1:83400, 1:83500, 1:83600, 1:83700, 1:83800, 1:83900, 1:84000, 1:84100, 1:84200, 1:84300, 1:84400, 1:84500, 1:84600, 1:84700, 1:84800, 1:84900, 1:85000, 1:85100, 1:85200, 1:85300, 1:85400, 1:85500, 1:85600, 1:85700, 1:85800, 1:85900, 1:86000, 1:86100, 1:86200, 1:86300, 1:86400, 1:86500, 1:86600, 1:86700, 1:86800, 1:86900, 1:87000, 1:87100, 1:87200, 1:87300, 1:87400, 1:87500, 1:87600, 1:87700, 1:87800, 1:87900, 1:88000, 1:88100, 1:88200, 1:88300, 1:88400, 1:88500, 1:88600, 1:88700, 1:88800, 1:88900, 1:89000, 1:89100, 1:89200, 1:89300, 1:89400, 1:89500, 1:89600, 1:89700, 1:89800, 1:89900, 1:90000, 1:90100, 1:90200, 1:90300, 1:90400, 1:90500, 1:90600, 1:90700, 1:90800, 1:90900, 1:91000, 1:91100, 1:91200, 1:91300, 1:91400, 1:91500, 1:91600, 1:91700, 1:91800, 1:91900, 1:92000, 1:92100, 1:92200, 1:92300, 1:92400, 1:92500, 1:92600, 1:92700, 1:92800, 1:92900, 1:93000, 1:93100, 1:93200, 1:93300, 1:93400, 1:93500, 1:93600, 1:93700, 1:93800, 1:93900, 1:94000, 1:94100, 1:94200, 1:94300, 1:94400, 1:94500, 1:94600, 1:94700, 1:94800, 1:94900, 1:95000, 1:95100, 1:95200, 1:95300, 1:95400, 1:95500, 1:95600, 1:95700, 1:95800, 1:95900, 1:96000, 1:96100, 1:96200, 1:96300, 1:96400, 1:96500, 1:96600, 1:96700, 1:96800, 1:96900, 1:97000, 1:97100, 1:97200, 1:97300, 1:97400, 1:97500, 1:97600, 1:97700, 1:97800, 1:97900, 1:98000, 1:98100, 1:98200, 1:98300, 1:98400, 1:98500, 1:98600, 1:98700, 1:98800, 1:98900, 1:99000, 1:99100, 1:99200, 1:99300, 1:99400, 1:99500, 1:99600, 1:99700, 1:99800, 1:99900, 1:100000, 1:100100, 1:100200, 1:100300, 1:100400, 1:100500, 1:100600, 1:100700, 1:100800, 1:100900, 1:101000, 1:101100, 1:101200, 1:101300, 1:101400, 1:101500, 1:101600, 1:101700, 1:101800, 1:101900, 1:102000, 1:102100, 1:102200, 1:102300, 1:102400, 1:102500, 1:102600, 1:102700, 1:102800, 1:102900, 1:103000, 1:103100, 1:103200, 1:103300, 1:103400, 1:103500, 1:103600, 1:103700, 1:103800, 1:103900, 1:104000, 1:104100, 1:104200, 1:104300, 1:104400, 1:104500, 1:104600, 1:104700, 1:104800, 1:104900, 1:105000, 1:105100, 1:105200, 1:105300, 1:105400, 1:105500, 1:105600, 1:105700, 1:105800, 1:105900, 1:106000, 1:106100, 1:106200, 1:106300, 1:106400, 1:106500, 1:106600, 1:106700, 1:106800, 1:106900, 1:107000, 1:107100, 1:107200, 1:107300, 1:107400, 1:107500, 1:107600, 1:107700, 1:107800, 1:107900, 1:108000, 1:108100, 1:108200, 1:108300, 1:108400, 1:108500, 1:108600, 1:108700, 1:108800, 1:108900, 1:109000, 1:109100, 1:109200, 1:109300, 1:109400, 1:109500, 1:109600, 1:109700, 1:109800, 1:109900, 1:110000, 1:110100, 1:110200, 1:110300, 1:110400, 1:110500, 1:110600, 1:110700, 1:110800, 1:110900, 1:111000, 1:111100, 1:111200, 1:111300, 1:111400, 1:111500, 1:111600, 1:111700, 1:111800, 1:111900, 1:112000, 1:112100, 1:112200, 1:112300, 1:112400, 1:112500, 1:112600, 1:112700, 1:112800, 1:112900, 1:113000, 1:113100, 1:113200, 1:113300, 1:113400, 1:113500, 1:113600, 1:113700, 1:113800, 1:113900, 1:114000, 1:114100,

1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 e 1:12800). Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo fluorescente secundário anti- IgG (Alexa Flúor – 555) e DAPI (1:250). As imagens das imunolocalizações foram obtidas nas diluições de 1:800 (SELB e SELD) e 1:100 (SECp43 e Seril-tRNA sintetase). As proteínas foram localizadas no citoplasma como grânulos citoplasmáticos nas fases G1 (SELB, SECp43 e Seril tRNA) e G2 (SELD). Também foram observadas granulações em menor quantidade no núcleo para as proteínas SECp43 e Seril tRNA (Figura 34).

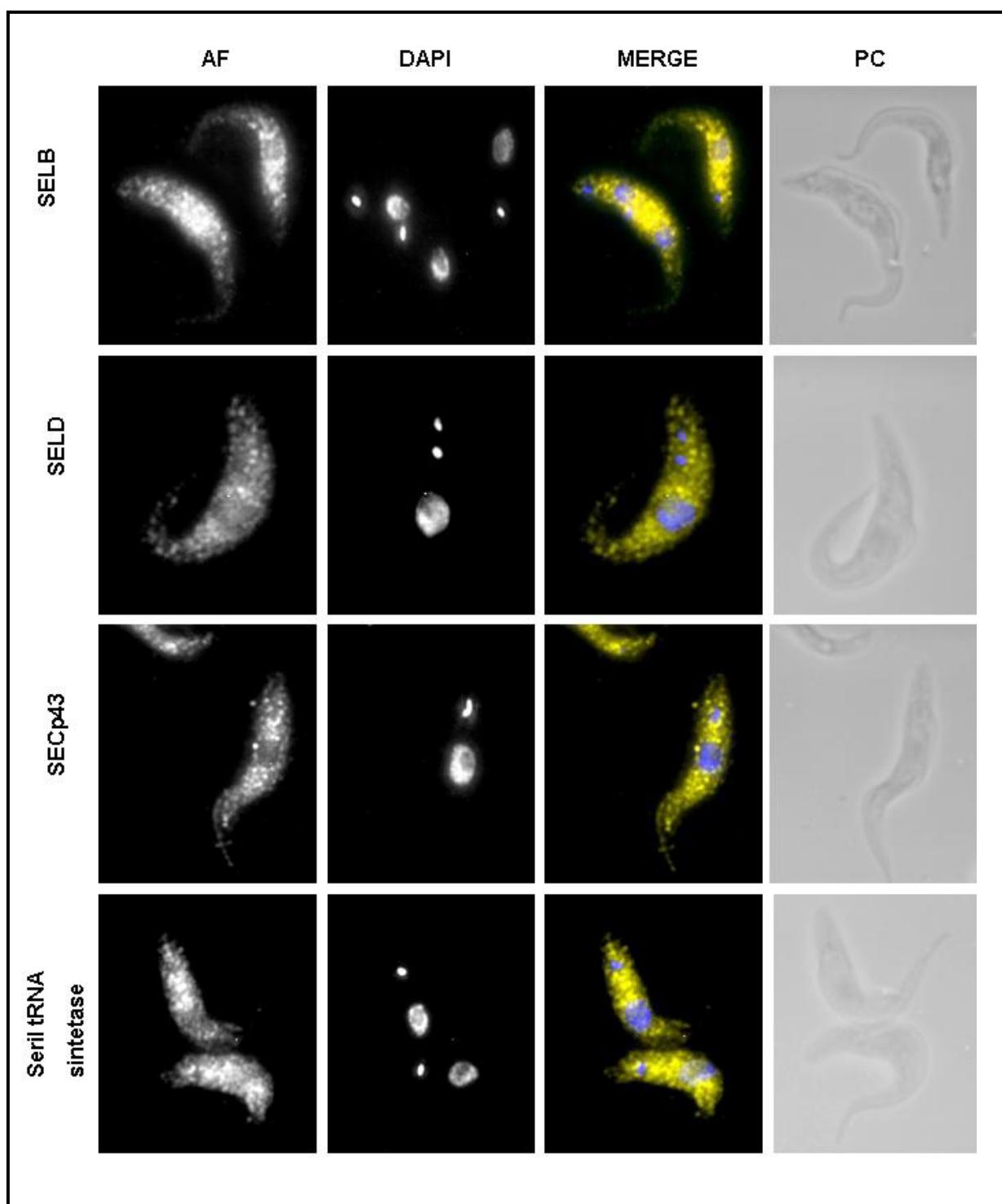


Figura 34. Imunolocalização das proteínas SELB, SELD, SECp43 e Seril-tRNA em células de *T. brucei* 427. AF = Alexa/Flúor 555, DAPI = coloração com DAPI; MERGE = sobreposição das imagens de coloração com Alexa/Flúor e DAPI e PC = imagens de contraste de fase. Imagens realizadas em microscópio de contraste de fase e de fluorescência (Nikon).

3.5 Discussão

Dois importantes componentes da via de selenocisteína, SELB e SELD, são descritos em arqueobactérias, procariotos e eucariotos. A selenofosfato sintetase, produto do gene *selD*, participa da formação do monoselenofosfato, selênio em sua forma biológica, sintetizado através do ATP e selenito na síntese de selenocisteína (JAYAKAMUR et al., 2004). Na incorporação de selenocisteína, um específico fator de elongação, SELB, liga-se ao tRNA^{Sec} e reconhece a estrutura de inserção SECIS e participa do posicionamento do tRNA^{Sec} no ribossomo para leitura do códon UGA (COBUCCI-PONZANO et al., 2005). Devido ao papel central de síntese e incorporação do vigésimo primeiro aminoácido, selenocisteína, através de uma maquinaria particular tanto em células mamíferos como em parasitas, essa via começa a ser investigada como um possível alvo para o planejamento de drogas quimioterápicas.

Por serem elementos centrais da via de síntese e incorporação de selenocisteína, o fator de elongação SELB e a enzima selenofosfato sintetase SELD foram selecionados para estudo em Kinetoplastida, em parasitas da espécie *Trypanosoma brucei*. Fragmentos de 1968 e 1179 pb foram amplificados dos genes *selB* e *selD*, respectivamente, a partir da extração do DNA genômico de *T.brucei* da cepa 2913 (figura 24, pg.91). A amplificação seguiu a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando primers que foram hibridizados às seqüências complementares na molécula de DNA. Os fragmentos amplificados foram clonados em vetores pTZ57R/Te pGEM-T e os DNAs plasmidiais foram transformados em células de *E. coli* DH5α.

Após clivagem e sequenciamento das construções SELB/pTZ e SELD/pGEMT foi realizada a subclonagem em vetor de expressão pET 28 a(+). A construção do plasmídeo resultante foi seqüenciada para confirmação de suas seqüências nos recombinantes e verificar a orientação correta com relação à região promotora. Os plasmídeos foram transformados em

células competentes *E. coli* BL21 (DE3). As células de *E. coli* transformadas, foram submetidas a teste de expressão, produzindo um bom nível da expressão de SELD satisfatoriamente na fração solúvel, enquanto SELB foi observada no precipitado, como visualizado nas figuras 28 e 29, pgs.95 e 96, respectivamente. A expressão em larga escala da proteína SELD foi realizada a partir de 1 litro de cultura celular e purificada em cromatografia de afinidade resina TALON e visualizada em gel SDS-PAGE corado com “comassie blue” (figura 30, pg. 96).

Foram realizados estudos moleculares para a caracterização das proteínas SELB e SELD. Através do experimento de focalização isoelétrica, determinou-se o ponto isoelétrico experimentalmente da proteína SELD igual a 6,34 (figura 31, pg. 97). A determinação do ponto isoelétrico foi importante na validação da escolha e preparo do tampão adequado durante experimento de purificação, evitando precipitação da proteína em valores incorretos de pH (STOYANOV et al., 2005). A proteína SELD foi submetida ao experimento de gel nativo e sua massa molecular foi estimada em 111 kDa, consistente com a forma de dímero (figura 32, pg.98). Esse valor de massa molecular foi coerente com experimento de cromatografia por exclusão molecular, com migração da proteína em 100 kDa, realizado pela aluna de doutorado Susana A. Sculaccio.

Pelas propriedades apresentadas pela SELD incluindo expressão solúvel, fácil purificação e rendimento médio de 1mg por litro de cultura, sugerem que esta seria uma boa candidata à cristalização e determinação de estrutura por análises de difração de raios X (BRANDEN: TOOZE, 1991). Partindo-se deste princípio a proteína SELD foi utilizada para ensaios de cristalização testando-a nos fatoriais I (50 condições) e II (48 condições). Obteve-se a formação de precipitados amorfos em algumas condições e em outras a formação de cristais (tabela 13, pg. 99). Nas condições 34 e 48 do fatorial I foram observados microcristais e são considerados um ótimo ponto de partida para otimização das condições de cristalização,

pois não apresentam sal na constituição dos agentes precipitantes. As condições em que houve formação de placas, condições 5 do fatorial I e 12 do fatorial II, também deverão ser serão submetidas ao processo de refinamento.

Também foram realizados experimentos de imunoblotting e imunolocalização das proteínas SELB e SELD em células de *T. brucei* 427 nativa (figura 33, pg. 100). Os anticorpos policlonais anti-SELB e anti-SELD foram testados em extrato celular *T. brucei* 427 (1×10^7 células/ml). Esse experimento confirmou a presença no extrato da expressão das proteínas SELB e SELD com massas moleculares de 71, 5 kDa e 43 kDa, respectivamente. Sabendo-se que os anticorpos reagiam em células de parasitas, foi possível a realização do experimento de imunolocalização.

Na imunolocalização os anticorpos (anti-SELB e anti-SELD) foram incubados em diferentes diluições (1:100, 1:200, 1:400, 1: 800, 1:1600, 1:3200, 1:6400 e 1:12800) para testar o melhor título, e com anticorpo secundário fluorescente anti-IgG (Alexa Flúor 555 - Invitrogen). Também foi realizado experimento de imunolocalização das proteínas SECp43 e seril tRNA sintetase de *T. brucei* nas mesmas condições. Todas as proteínas foram localizadas na porção citoplasmática do parasita como granulações citoplasmáticas. Esses resultados demonstraram coerência com trabalhos anteriores realizados em células de mamíferos, onde as proteínas SPS1, SepSecS e SECp43 quando co-precipitadas são localizadas no núcleo e citoplasma (XU et al., 2005; SMALL-HOWARD et al., 2006), (figura 34, pg. 102). Essas granulações podem ser indicativas de agregados protéicos, já que interações núcleo-citoplasma requerem um complexo supramolecular para biossíntese e incorporação de selenocisteína em eucariotos (SMALL-HOWARD et al., 2006).

Todas as análises realizadas com as proteínas SELB e SELD em *T. brucei* são de fundamental importância para entendimento da via de selenocisteína em eucariotos, mais especificamente em Kinetoplastida que ainda não é muito explorada. Os experimentos com a

enzima SELD vieram a somar em um trabalho de colaboração com a estudante de doutorado Susana A. Sculaccio em um artigo intitulado “Kinetoplastid Selenocysteine: Selenophosphate Synthetase (SELD) from *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*”, aceito em agosto de 2008, e que será publicado na revista “Molecular and Biochemical Parasitology”.

CAPÍTULO 4

Isolamento de novas proteínas envolvidas na biossíntese de selenoproteínas em *T. brucei* através do método “Tandem Affinity Purification” (TAP-PTP)

4.1 Introdução

A biossíntese de selenoproteínas e conversão de serina em selenocisteína estão completamente esclarecidas em *Escherichia coli*, mas em eucariotos não está elucidada (BÖCK et al., 1991; COBUCCI-PONZANO, 2005). A principal questão que permanece incógnita é a falta de homólogo de selenocisteína-sintase (SelA.) em eucariotos.

O produto do gene *SelC* é carregado com L-serina pela seril-tRNA sintetase (SerRS). Devido à ausência do homólogo de SELA em eucariotos, há evidências de que a enzima fosfoseril tRNA^{Sec} Kinase (PSTK) atue na fosforilação da serina e Sep-tRNA:Sec-tRNA sintase (SepSecS) faz a conversão da fosfoserina tRNA^{Sec} para selenocisteína tRNA^{Sec} (YUAN et al., 2006).

Em eucariotos, foi identificada outra proteína que se associa especificamente com selenocisteína tRNA^{Sec}, denominada SECp43. Esta proteína parece coordenar interações e localização de outros componentes envolvidos na biossíntese de selenocisteína, resultando em um modelo de interação na formação de um complexo supramolecular (SMALL-HOWARD et al., 2006).

Outro elemento fundamental na incorporação de selenocisteína é o fator de elongação SELB, que em eucariotos está localizado na região 3' UTR (BERRY et al., 1993). Nesses organismos, SELB se liga ao tRNA^{Sec} e precisa associar-se a proteína SBP2 para reconhecer a estrutura SECIS (FAGEGALTIER et al., 2000; TUJEBAJEVA et al., 2000; COBUCCI-PONZANO et al., 2005).

Devido à complexidade da via em eucariotos, ainda inexplorada em Kinetoplastida, este trabalho foi realizado para aprendizado de uma nova metodologia, “Tandem Affinity Purification” (PTP tagging), visando investigar e isolar novas proteínas ligantes a partir de proteínas já conhecidas SECp43, PSTK e SELB em *Trypanosoma brucei*.

Para o aprendizado desta nova metodologia foi realizado um estágio de três meses no laboratório do Prof. Dr. Larry Simpson no Instituto de Pesquisa “Gordon and Virginia MacDonald Medical Research Laboratories” (Howard Hughes), na Universidade da Califórnia em Los Angeles (UCLA).

4.2 Método de isolamento de proteínas “Tandem Affinity Purification” (TAP),(PTP)

Um dos grandes desafios em proteômica é o entendimento da função protéica e determinar a interação entre macromoléculas está se tornando um passo limitante na análise da função protéica. O sistema “Tandem Affinity Purification” (TAP, PTP) vem a ser uma excelente ferramenta para a detecção da interação de proteínas com a proteína alvo e para determinar a composição do complexo macromolecular protóico com baixa taxa de falsos-positivos.

O sistema “Tandem Affinity Purification” (TAP) foi desenvolvido como uma importante ferramenta que permite fácil purificação de complexos protóicos em “tandem” a partir de extrato bruto e sob condições nativas (PUIG et al., 2001). Esta metodologia foi inicialmente aplicada em leveduras (PUIG et al., 2001), mas atualmente é amplamente utilizado em outros organismos como *Escherichia coli* (GULLY et al., 2003), mamíferos (KNUESSEL et al., 2003), insetos (FORLER et al., 2003), plantas (ROHILA et al., 2004), Kinetoplastida (APHASIZHEV et al., 2003; SCHIMANSKI et al., 2005) e mais recentemente em *Plasmodium falciparum* (TAKEBE et al., 2007).

O sistema TAP original (PUIG et al., 2001), é baseado na proteína de interesse fusionada à um domínio calmodulina ligante de peptídeo (CBP) e dois domínios ligadores de IgG de *Staphylococcus aureus* proteína A (Prot A). Os dois domínios, CBP e Prot A, são separados por um sítio de clivagem para TEV protease. A proteína A (Prot A) se liga fortemente a uma matriz IgG, requerendo o uso de TEV para eluição. O eluato é incubado na resina de calmodulina para eluição com EGTA do complexo protéico (Figura 35).

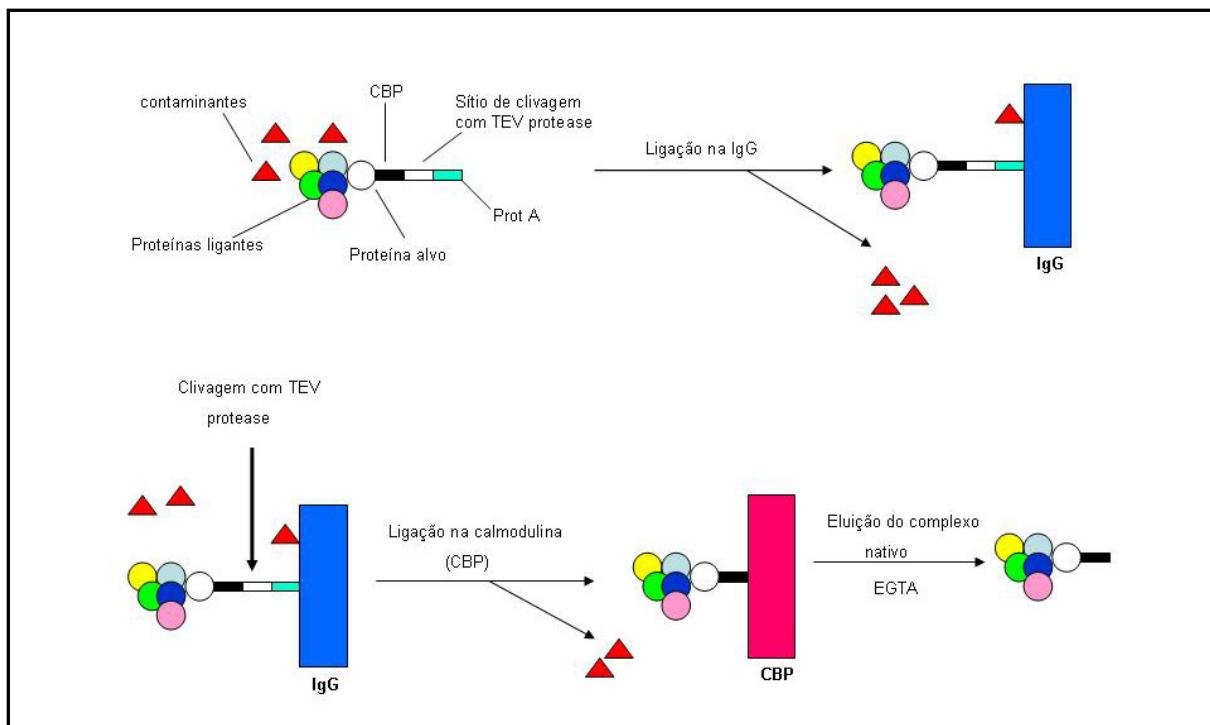


Figura 35. Esquema ilustrativo da purificação no sistema “Tandem Affinity Purification” (TAP). O sistema TAP apresenta um domínio de ligação de calmodulina e outro domínio Prot A, de ligação de IgG. Esses domínios são separados por um sítio de clivagem de TEV protease. A domínio Prot A se liga à resina de IgG e sua eluição é realizada com TEV protease. O eluato é incubado na segunda resina de calmodulina e o complexo protéico é eluído com EGTA.

Entretanto, o sistema TAP não foi capaz de recuperar proteínas ligantes de fatores de transcrição em *Trypanosoma brucei* e a cromatografia em calmodulina mostrou-se ineficiente, possivelmente porque a calmodulina livre no extrato celular pode bloquear o sítio de ligação na resina de calmodulina (DRAKAS et al., 2005). Para solucionar este problema, um novo sistema “PTP tagging” (ProtC-TEV-ProtA) foi elaborado com substituição da calmodulina

por Proteína-C (Prot-C). A proteína C liga-se com alta afinidade ao anticorpo monoclonal HPC4, o qual requer cálcio para o reconhecimento do antígeno (Figura 36 A). (SCHIMANSKI et al., 2005).

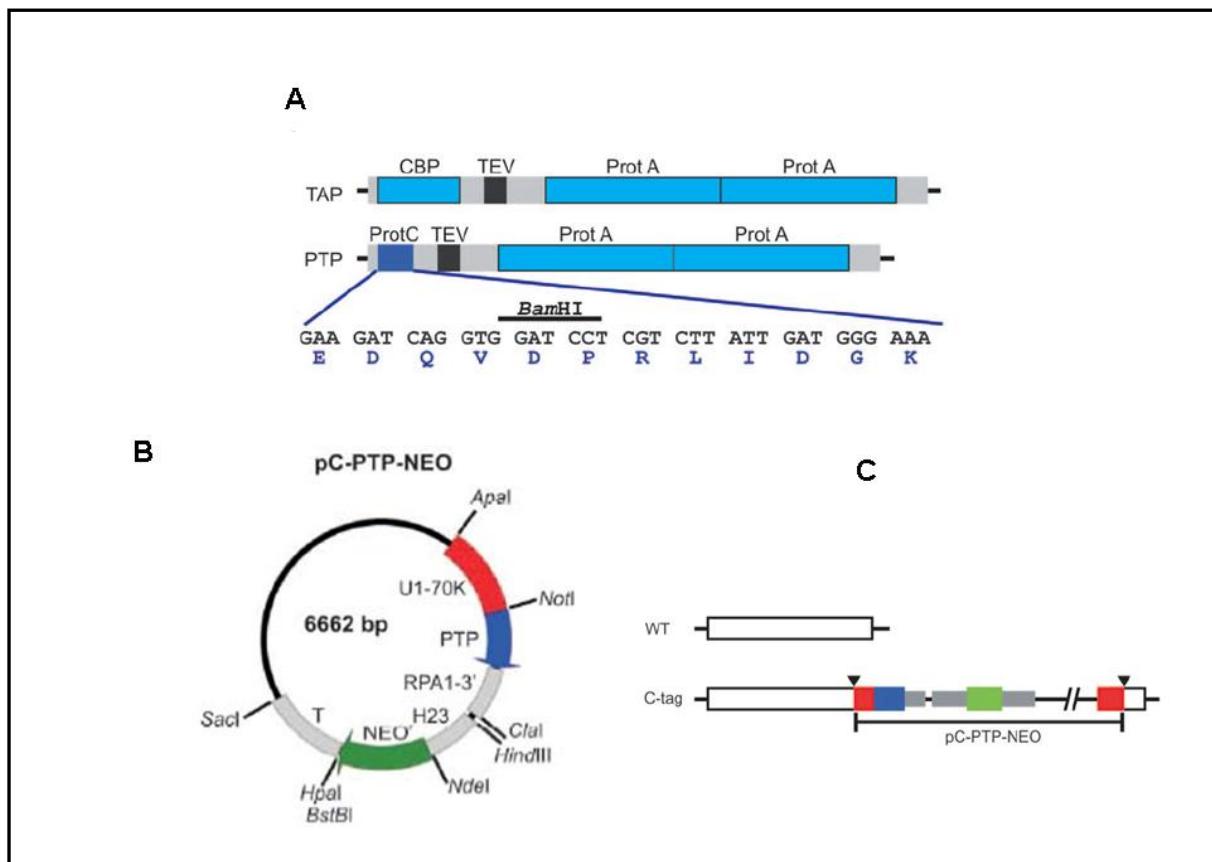


Figura 36 - Novo epítopo “PTP” para purificação em tandem em Tripanosomatídeos. A: estruturas dos epítopos TAP e PTP. No sistema TAP, calmodulina separada pela TEV protease da proteína A em tandem. No sistema PTP, a substituição da calmodulina pela Prot C. B: Plasmídeo de integração PC-PTP-NEO com PTP cassette (azul) com genes flankeadores (cinza) e de resistência NEO (verde), e a seqüência U1-70K (vermelho), onde ocorre substituição pela seqüência alvo a ser integrada. C: Recombinação homóloga com clivagem em um único sítio na seqüência alvo. Figura extraída de Schimanski, B. et al., 2005.

O vetor pC-PTP-NEO é um plasmídeo de integração no genoma de *T. brucei* que possui o cassette PTP com 745 pb de uma região que codifica o C-terminal da proteína U1-70K, com sítios de restrição para *Apa* I e *Not* I, onde ocorre a substituição da seqüência alvo, a seqüência que codifica a etiqueta PTP, o códon de terminação TGA, região adjacente 3' que codifica para RPA1-3', maior subunidade da RNA polimerase I. O cassette que contém o marcador de resistência contém o gene neomicina fosfotransferase (NEO), que confere

resistência ao antibiótico G418, com genes que flanqueiam na região 5' pelas regiões intergênicas da proteína de choque térmico HSP70 (genes 2 e 3) e na região 3' pelas regiões intergênicas dos genes que codificam para α e β tubulina (Figura 36 B), (SCHIMANSKI et al., 2005).

O plasmídeo pC-PTP-NEO é derivado do vetor pBluescript SK(+), (Stratagene, La Jolla,, Califórnia), e foi elaborado para obter uma transfecção estável da seqüência PTP inserido no alelo endógeno, dessa forma proteínas fusionadas ao PTP são expressas em níveis normais e interações não-específicas também são previstas, devido à classe I de promotores em *T. brucei*. A integração do DNA linear por recombinação homóloga é muito eficiente e requer somente 100 a 300 pb da seqüência alvo ligada pelo C ou N terminal. O sucesso da inserção no genoma depende de um único sítio de restrição dentro da seqüência alvo (SCHIMANSKI et al., 2005), (Figura 36 C). O plasmídeo pC-PTP-NEO foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Arthur Günzl da “University of Connecticut Health Center”.

A purificação do complexo é análoga a eluição em calmodulina com o uso do tampão EGTA e a única restrição do anticorpo monoclonal HPC4 é ter um sítio de ligação de cálcio que precisa ser ocupado para interação com a proteína C (Prot C), (SCHIMANSKI et al., 2005).

Para aplicação dessa nova metodologia, “PTP tagging”, no estudo de interação protéica na biossíntese de selenocisteína, foram selecionadas as proteínas SELB, PSTK e SECp43 como proteínas alvos na seleção de proteínas ligantes em *Trypanosoma brucei*.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Amplificação dos genes *selB*, *pstk* e *secp43* de *Trypanosoma brucei* e clonagem nos vetores pGEM-T e pCR4-TOPO

Para a amplificação pelo método da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) tornou-se necessário a síntese de oligonucleotídeos (primers) complementares as regiões terminais dos genes. Na primeira etapa do trabalho foram sintetizados primers para *selB*, *pstk* e *secp43* de *T. brucei* contendo sítios para clivagem das enzimas *Apa* I e *Not* I para posterior clonagem em vetor pC-PTP-NEO (tabela14). A fase aberta de leitura (ORF) dos genes foi amplificada a partir do DNA genômico de *T. brucei*, utilizando a Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). A reação foi feita segundo condições descritas nas tabelas 15 e 16. A seqüência dos genes *selB*, *pstk* e *secp43* de *T. brucei* encontra-se depositada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O gene *secp43* de *T. brucei* codifica 1701 pb, mas neste experimento foi desenhado primers para amplificação de 1026 pb para inserção no cassete PTP.

Tabela 14 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados no PCR para amplificação dos genes *selB*, *pstk* e *secp43* *T. brucei*.

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5'- 3'
SECp43 Tapc1	ATGCAGGGCCCGCGGGCATCACGAGCGCAGCGATATGCAA AGAC
SECp43 Tapc2	TCTTCCAGCGGCCGCGCTTGAGGCCTGTACCTTAGCAC
SELBTapc1	ATGCAGGGCCCATTGACAGAAGTTAACGATGTTGCCTCTGTAAAC
SELBTapc2	TCTTCCAGCGGCCGTGCTGAAGCTGACTGTGGAGTGCAAGTG
PSTK Tapc1	ATGCAGGGCCCATTGACAGTTGTCTTGTACTAACTG
PSTK Tapc2	TCTTCCAGCGGCCGAGATCTACTAAGGCATGCTCGAATTCC

Tabela 15 - Reagentes usados nas reações de PCR realizadas com “Taq DNA Polymerase, Recombinant” nas amplificações de *selB*, *pstk* e *secp43* *T.brucei*.

Mistura da reação de amplificação	Volume (μl)	Concentração final
Tampão PCR [10X] sem Mg (Invitrogen)	5,0	1X
Solução estoque de dNTPs 10mM (A, G, C, T)	1,0	0,2mM cada
MgCl ₂ 50mM	1,5	1,5mM
Oligonucleotídeo senso 100pmol/ul	1,0	10pmol/ul
Oligonucleotídeo anti-senso 100pmol/ul	1,0	10pmol/ul
DNA molde		100ng
Taq DNA Polimerase Recombinant (5U/μl)	0,25	1,25U
H ₂ O milliQ autoclavada q.s.p.	50,0	

Tabela 16 - Programa de PCR para amplificações nas amplificações de *selB*, *pstk* e *secp43* de *T.brucei*.

Programa de PCR						
Número de ciclos	1x	25x	1x			
T° C	95	95	52	72	72	4
Tempo	3min	45seg	30seg	1,5min	10min	infinito

Os produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etidio (0,5 μg/ml) em tampão TAE 1X (8 mM Tris- acetato, 0,2 mM EDTA pH 8.0). Em seguida, para a purificação do DNAs amplificados fez-se um gel preparativo com o Kit Perfect Gel Cleanup (Ependorf).

Antecedendo a reação de ligação dos insertos aos vetores de clonagem foi necessário a adição de desoxiriboadenina (dATP) às extremidades dos DNAs purificados, com a finalidade de aumentar a eficiência de ligação. Para este acréscimo de adenina, segui-se o seguinte protocolo:

- 5 μl do produto de PCR;
- 1 μl tampão PCR Buffer (10X);
- 1 μl MgCl₂ (25 mM);
- 0,4 μl dATP (0,2 mM);
- 1 μl de Taq DNA polimerase (5U/ μL), (Invitrogen);
- 1,6 μl de H₂O.

Esta reação com volume final de 10 µL foi incubada por 15 min a 70 °C. Em seguida à adição de adenina, pode ser efetuada a reação de ligação. Para esta reação foram utilizados dois vetores: pGEM-T (Promega) e pCR 4-TOPO (Invitrogen)

Reação de ligação em vetor pGEM-T (Promega):

- 5 µl (2x Rapid Ligation Buffer- PROMEGA);
- 1 µl vetor pGEM-T (50 ng);
- 3 µl do inserto (adicionado de dATP);
- 1 µl T4 DNA ligase, (1U/ µL), PROMEGA;

Esta reação ocorreu a 4 °C por 12 h.

Reação de ligação em vetor pCR 4- TOPO (Invitrogen):

- 3 µl do DNA (adicionado de dATP);
- 1 µl do vetor pCR4-TOPO (10 ng/ µL);
- 1 µl de solução salina

Esta reação se processa a 22 °C em 30 minutos e não necessita da DNA ligase.

Seguindo a descrição do protocolo de (Ausubel *et al.*, 1995), após a ligação dos insertos em seus respectivos vetores foi realizada a transformação do DNA proveniente da reação de ligação em células de *E. coli* DH5α para propagação e manutenção do plasmídeo. Cerca de 100µl e 200 µl de cada cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e o antibiótico de seleção adequado para os vetores pGEM-T (ampicilina numa concentração final de 100µg/ml, 0,5 mM de IPTG e 80 µg/ml de Xgal) e pCR4 –TOPO (contendo 100 µg/mL de ampicilina). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias transformadas.

Colônias isoladas foram inoculadas em 5ml de meio LB líquido, contendo ampicilina (100µg/ml) para ambos os vetores. Estes inóculos foram deixados a 37°C, sob 250rpm de agitação por 16 horas e foram feitas preparações plasmidiais com Kit de miniprep (Promega). A estratégia adotada para a verificação da orientação correta ou incorreta em relação ao promotor T7, de cada construção recombinante, envolveu a amplificação por PCR, com a enzima “Taq DNA Polymerase, Recombinant – Invitrogen” (seguindo protocolo das tabelas 15 e 16) e combinando-se oligonucleotídeos específicos do vetor e do gene inserido. Uma vez identificados os clones positivos, estes foram submetidos ao seqüenciamento de DNA.

4.3.2 Subclonagem dos genes *selB*, *pstk* e *secP43* de *T. brucei* em vetor apropriado para PTP-tag: (PC-PTP-NEO)

Após obtenção dos clones positivos, os DNAs plasmidiais foram digeridos com as endonucleases de restrição *Apa* I e *Not* I, seguindo protocolo da New England Biolabs:

- 10 µl de DNA plasmidial (100 ng/ µl);
- 3 µl tampão NBE buffer 4 (10x concentrado - New England Biolabs);
- 2 µl de BSA (10 mg/ml);
- 1 µl de enzima de restrição *Apa* I (1 U/ µl);
- 14 µl de H₂O

Utilizando o mesmo protocolo e as mesmas endonucleases de restrição foi digerido o vetor pC-PTP-NEO. As reações de clivagem ocorreram a 25 °C por 2 horas. Em seguida, os DNAs foram purificados com o Kit Perfect Gel Cleanup (Eppendorf) para uma segunda digestão com enzima de restrição *Not* I (protocolo da New England Biolabs):

- 15 µl de DNA plasmidial (100 ng/ µl);
- 3 µl tampão NBE buffer 3 (10x concentrado - New England Biolabs);
- 2 µl de BSA (10 mg/ml);
- 1 µl de enzima de restrição Not I (1 U/ µl);
- 9 µl de H₂O

Esta reação ocorreu a 37 °C por 2 h.

Novamente, o mesmo protocolo foi utilizado para a digestão do vetor pC-PTP-NEO.

Os insertos e vetores digeridos foram purificados em gel de agarose preparativo com o Kit Perfect Gel Cleanup (Ependorf).

Com os genes e vetor pC-PTP-NEO apresentando extremidades coesivas, foi possível realizar a reação de ligação:

- 2 µl 5X T4 DNA ligase buffer;
- 1 µl T4 DNA ligase (1U/ µl);
- 1 µl vetor pC-PTP-NEO (300 ng/ µl);
- 3 µl DNA purificado do gel (100 ng/ µl);
- 3 µl H₂O

Essa reação foi processada a 16 °C durante a noite.

O volume total das misturas de ligação (10 µl) foi utilizado para transformação de células competentes *E. coli* DH5α, através de choque térmico. Preparações plasmidiais, com Kit de miniprep da Promega, foram realizadas de cinco colônias das construções PSTKTB/PC- NEO, SELBTB/PC-NEO e SECp43TB/PC-NEO crescidas em meio LB líquido, contendo ampicilina (100µg/ml).

Foram realizadas análises dos clones positivos através de PCR, com a enzima “Taq DNA Polymerase, Recombinant – Invitrogen” (segundo protocolo das tabelas 15 e 16), combinando-se oligonucleotídeos específicos do vetor e do gene inserido e sequenciamento dessas construções. Para as reações de sequenciamento além dos primers das tabelas 14 e 17, foram utilizados os oligonucleotídeos M13 Forward e M13 Reverse, T7 3G e SP6, além dos primers internos para sequenciamento de gene *selB* descritos no capítulo 3, tabela 10, pg. 80.

Tabela 17 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos internos utilizados no sequenciamento do gene *pstk* de *T. brucei*

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5' - 3'
TBPSTK3S	ATGGGAAGTGCAGAGCATTGTTGTC
TBPSTK4S	GCGAACATCTCACTTCATCAACC

4.3.3 Transfecção de células de *Trypanosoma brucei* da linhagem 427

Para que ocorresse a integração genômica, a construção SELBTB/PC-NEO foi linearizada com a enzima de restrição *Sal* I, a construção SECp43TB/PC-NEO foi linearizada com a enzima *Nsi* I e PSTKTB/PC-NEO foi linearizada com *Sma* I, as quais apresentavam um único sítio de restrição aproximadamente no meio da seqüência alvo. Após linearização, as construções passaram a apresentar duas regiões homólogas ao gene selvagem em suas extremidades.

O experimento de transfecção e seleção de recombinantes em células de *T. brucei* 427 foram realizados em colaboração no laboratório do Prof. Dr. Sérgio Schenckman da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) com a ajuda da aluna de doutorado Teresa Cristina Leandro de Jesus. Para o experimento de transfecção, formas promastigotas de *T. brucei* 427 foram crescidas em garrafas de cultura a 28 °C, contendo 10ml de meio

“Cunningham’s SM” (Cunningham, I., 1977), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cutilab) e 0,25% de hemina.

O conteúdo total de uma cultura em fase de crescimento logarítmico ($\log \sim 1-3 \times 10^7$ cels/ml) foi centrifugado a 2000 rpm por 7 minutos. As células foram ressuspendidas para $2,5 \times 10^7$ cels/mL em Solução para Eletroporação (SE (tabela 18). Um volume de 400 μ l de células em SE foi adicionado a uma cubeta de eletroporação de 0,4cm (BioRad), contendo os 40 μ l de DNA (total de 10 μ g) já digerido com as respectivas enzimas e purificado. O conteúdo total de 440 μ L foi eletroporado num aparelho BioRad Gene Pulser, da seguinte maneira: 2 pulsos de 1.6 kV, 25 microF, esperando-se 10 segundos entre os pulsos (a constante de tempo deve ser entre 0,5 e 0,7 mseg). O mesmo procedimento foi realizado para eletroporar as células sem DNA (nossa controle). As amostras foram transferidas para garrafas contendo 10 ml de meio Cunninghams com hemina (0,25%) e 10% de soro fetal bovino, que foram colocadas na estufa a 28 °C.

Após 12 horas de crescimento das células que sofreram eletroporação, G418 (neomicina) foi adicionada às garrafas numa concentração final de 40 μ g/ml, para seleção de transfectantes estáveis, uma vez que o plasmídeo pC-PTP-NEO confere resistência a este antibiótico de seleção. A cultura foi diluída em série em placas de 24 poços, usando meio condicionado para obtenção de um único clone positivo, ou seja, que contenha os plasmídeos SELTB/PC-NEO, PSTKTB/PC-NEO e SECp43TB/PC-NEO integrado ao seu genoma. Quando as células foram selecionadas e atingiram a densidade de 4×10^6 células/ml, estas foram repicadas e mantidas em cultura ou congeladas a – 80 °C em meio contendo 10 % de glicerol. Apenas a cultura com a construção SECp43TB/PC-NEO não selecionou clones.

Tabela 18 - Reagentes usados no tampão de eletroporação

Reagentes	Concentração (mM)
NaCl	132
KCl	8
Na ₂ HPO ₄	8
KH ₂ PO ₄	1,5
Acetato de magnésio	0,5
Acetato de cálcio	0,09

* Ajustar pH 7,0 com Ácido Acético Glacial.

4.3.4 Experimento de PCR e Imunoblotting para checar a obtenção de clones positivos em *T. brucei* 427

Para checar a correta integração das construções, SELBTB/PC-NEO e PSTKTB/PC-NEO, foi realizado um reação de PCR com oligonucleotídeos construídos 100 pb às regiões 5'UTR (5' não traduzida), que flanqueiam os genes *selB* e *pstk* na região 5', e como anti-sense foi desenhado um primer 3' para proteína C, região do plasmídeo pC-PTP-NEO (tabela 19). Também foi extraído o DNA genômico referente a cada construção com fenol e clorofórmio e precipitação com etanol 100% para servir como molde na amplificação. As condições aplicadas à reação de PCR estão descritas nas tabelas 15 e 16.

Tabela 19 - Nome e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR para checar integração dos plasmídeos

Oligonucleotídeos	Seqüências dos oligos 5' - 3'
SELBFINT	ATTTTGAAAGCGCAACTAACAGC
PSTKFINT	GCGACGCCTTCCTGCTTCGTTCAAG
PROTCR	TCGCTAGCAGTCGTTGAATATCATATTCCCATCAATAAGACGAGG

A expressão das construções no sistema “PTP-tagging” foi verificada por imunoblotting com o uso do anticorpo “ProtA-specific PAP (peroxidase-anti-peroxidase

soluble complex) reagent” (Sigma). O experimento de imunoblotting foi realizado em membrana de nitrocelulose com diluição de 1:1000 do anticorpo PAP.

4.3.5 Preparação da amostra de células transfectadas para posterior purificação em sistema “PTP tagging”

Após confirmação dos clones positivos para as construções SELBTB/PC-NEO e PSTKTB/PC-NEO, as células de *T. brucei* 427 transfectadas foram tratadas com tampões adequados para purificação.

Foram crescidos 4 litros de parasitas (1×10^7 células/ml) e centrifugados a 2700 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi lavado duas vezes com 40 ml de tampão “Tryp wash solution” gelado (100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5), com ressuspensão de células no vórtex e centrifugação de 7 minutos a 2700 g a 4 °C. O volume do precipitado foi estimado em 8 ml e este, foi ressuspendido em 30 ml de “Transcription buffer” gelado (150 mM sucrose, 20 mM L- potassium glutamic acid, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.7 e 3 mM MgCl₂) e centrifugado 3300 g, 10 minutos a 4 °C.

O precipitado foi ressuspendido em 8 ml (volume estimado anteriormente) de “Transcription buffer” gelado e incubado por 30 minutos. Após esse período, foi adicionado para cada ml de células ressuspensas, 1 µl de DTT 1 M, 10 mg/ml de leupeptin e 10 mg/ml de aprotinin. As células foram lisadas na “French press” e examinadas em microscópio. A fração obtida foi congelada em nitrogênio líquido em alíquotas de 1 ml e estocada a -80 °C.

4.3.6 Método de purificação através do sistema “PTP tagging”

Para a purificação das proteínas SELB e PSTK de *T. brucei* através do sistema “PTP tagging” foram usadas 10 alíquotas de 1 ml do extrato congelado. Foram pipetados 100 µl do tampão de extração gelado, para cada 1 ml de extrato, em ependorfos previamente congelados

no gelo. As alíquotas de extrato foram descongeladas e adicionadas aos ependorfs com tampão de extração e incubadas por vinte minutos em gelo. A mistura foi centrifugada por 15 minutos, 21 000 g a 4 °C e o sobrenadante (6 ml) foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml e separado uma alíquota para gel.

Ao sobrenadante foram adicionados 500 µl de coquetel de inibidores (Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets – Roche) previamente dissolvido em 1 ml de tampão PA-150. O sobrenadante foi incubado com 0.2 ml de resina IgG por 2 horas, sob rotação a 4 °C. Após incubação, o sobrenadante foi eluído em coluna de 1 ml (Pierce) e reeluído para aumentar a eficiência de ligação da proteína à resina. A resina foi lavada com 25 ml de PA-150, equilibrada com 2 ml de solução “TEV buffer” e incubada com 2 ml de “TEV buffer” com 300U de TEV protease 4 °C, 12 horas, sob rotação (baixa velocidade).

Ao volume eluído, após clivagem com TEV protease, foi adicionado 7,5 µl de CaCl₂ (1 M) e 500 µl de inibidor de protease e a mistura foi incubada em resina “Anti-prot C affinity matrix” (Roche), (0,2 ml) por 2 horas, 4 °C, sob rotação. Após incubação, o conteúdo da resina foi eluído e reservado para correr gel. Em seguida, a resina foi lavada com 40 ml de tampão PC-150 e a coluna foi cortada na posição correspondente a 1 ml para facilitar a eluição subsequente.

A próxima eluição foi realizada com adição de 600 µl de tampão de eluição EGTA/EDTA e incubado 5 minutos, sob rotação a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes totalizando 1800 µl de eluato. Os resultados foram analisados através de experimento de Imunoblotting.

Soluções para a purificação em PTP-tagging

1. Tampão de extração:

20 mM Tris-HCl pH 7.7
 150 mM KCl
 3 mM MgCl₂
 0,5 mM DTT
 1% Tween 20

2. Tampão PA-150:

20 mM Tris-HCl pH 7.7
 150 mM KCl
 3 mM MgCl₂
 0,5 mM DTT
 0,1% Tween 20

3. Tampão TEV, “TEV buffer”:

20 mM Tris-HCl pH 7.7
 150 mM KCl
 3 mM MgCl₂
 0,5 mM EDTA
 1 mM DTT
 0,1% Tween 20

4. Tampão PC-150:

20 mM Tris-HCl pH 7.7
 150 mM KCl
 3 mM MgCl₂
 1 mM CaCl₂
 0,5 mM DTT
 0,1% Tween 20

5. Tampão de eluição EGTA/EDTA:

5 mM Tris-HCl pH 7.6
 10 mM EGTA
 5 mM EDTA
 10 mg/ml leupeptina

4.3.7 Experimento de Imunoblotting e Imunolocalização das células de *T. brucei* 427 transfetada com o plasmídeo SELBTB/PC-NEO

A construção SELB/PC-NEO transfetada em células de *T. brucei* 427 foi submetida ao experimento de caracterização através de Imunoblotting. As células de *T. brucei* 427 (SELB/PC-NEO), (1×10^7 células/ml) foram centrifugadas e o “pellet” ressuspandido em 10 µl de sample buffer SDS-PAGE 2X para cada amostra a ser titulada. As amostras foram fervidas

por 5 minutos e sonicada no ultra-som (Ultracleaner 1400-Unique, Ultrassonic clean) por 2 minutos para aplicação em gel.

As amostras de extrato celular foram aplicadas em SDS-PAGE 10% e, este foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após incubação na solução de bloqueio por 12 horas, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-SELB por 2 horas. Em seguida, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo (anti-IgG de camundongo) e revelada com solução reveladora (Biorad).

Na imunofluorescência da célula transfetada com o plasmídeo SELB/PC-NEO, os parasitas (5×10^6 células/ml) foram fixados em uma lâmina com 2% de paraformaldeído e permeabilizados com 0,1% de Triton e incubados com 1% de BSA. Após sucessivas lavagens com tampão PBS 1X, foi adicionado a cada poço 25 µl do anticorpo primário nas diluições desejadas e incubação de 1 hora. O anticorpo foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1X. Em seguida, ocorreu a incubação de (1:300) do anticorpo secundário anti- IgG fluorescente (Alexa Flúor 555 - Invitrogen) e 1 µl de DAPI (1:250) por 1 hora. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS 1X e foi adicionado 8 µl de vecta shield por poço, a fim de preservar a fluorescência.

4.4 Resultados

4.4.1 Resultado de amplificação dos genes *selB*, *pstk* e *secp43* de *Trypanosoma brucei* e clonagem nos vetores pGEM-T e pCR4-TOPO

Na amplificação dos genes *selB*, *pstk* e *secp43* de *T. brucei* foi utilizada a técnica de PCR através de oligonucleotídeos sintetizados contendo sítios para clivagem das enzimas de restrição *Apa* I e *Not* I para posterior clonagem em vetor pC-PTP-NEO. O tamanho esperado

dos fragmentos de DNA da *pstkTB* é de 1083 pb, *selTB* é 1968 pb e *secp43TB* é 1026 pb (Figura 37).

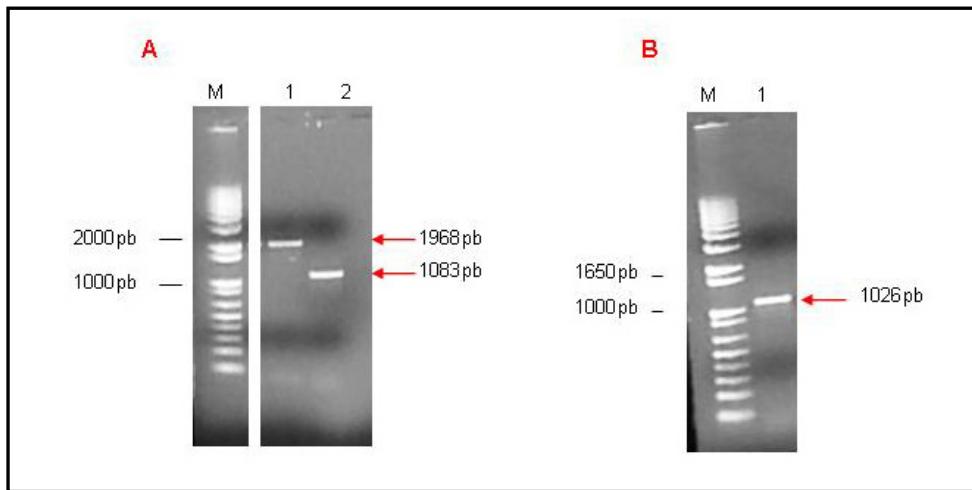


Figura 37. Amplificação da fase aberta de leitura (ORF) dos genes *pstkTB*, *selTB* e *secp43TB*. Gel de agarose 0,8% TAE 1X mostrando o resultado da eletroforese dos produtos de reação. Em **A**: Coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb (pb=pares de bases) e colunas 1: presença do fragmento com 1968 pb para *sel/B TB* e em 2: fragmento de 1083 pb para *pstk TB*. Em **B**: Coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb e coluna 1: fragmento de 1026 pb referente à amplificação do gene *secp43 TB*.

Em seguida, para a purificação do DNAs amplificados fez-se um gel preparativo com o Kit Perfect Gel Cleanup (Eppendorf). Foi realizado o acréscimo de desoxiriboadenina (dATP) e os fragmentos *pstkTB* e *secp43TB* foram ligados ao vetor de clonagem pCR 4-TOPO (Invitrogen) e *selTB* foi ligado ao vetor pGEM-T (Promega).

Células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram eficientemente transformadas com os produtos das reações de ligação e clones recombinantes positivos foram obtidos (Figura 38).

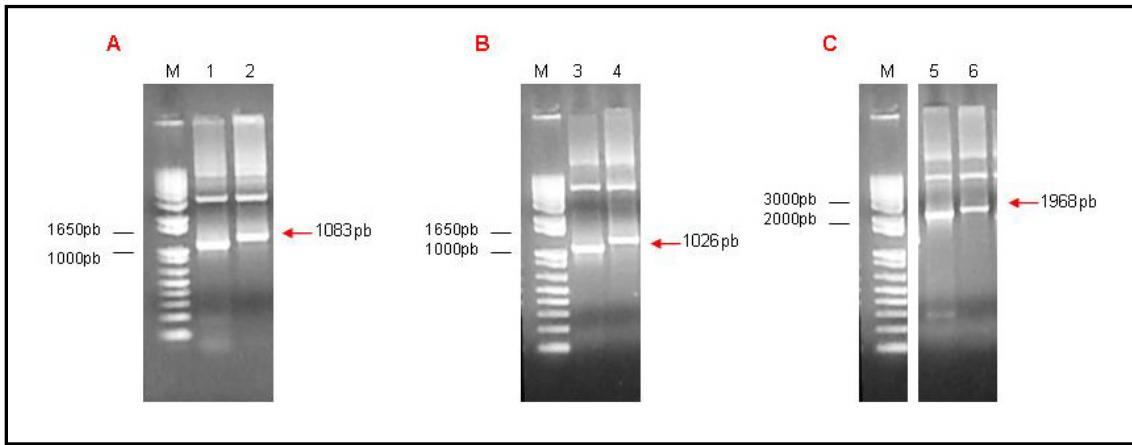


Figura 38. Análise de clones recombinantes por PCR. Gel de agarose 0,8%. Em **A** (PSTK/pGEM-T- 1083pb): M: marcador de massa molecular 1 Kb (pb=pares de base); coluna 1: combinação de oligonucleotídeos PSTK TAPC1F e PSTK TAPC2R e coluna2: oligonucleotídeos M13Forward (plasmídeo pGEM-T) e PSTK TAPC2. Em **B** (SECp43/pGEM-T- 1026pb): M: marcador de massa molecular 1Kb; coluna 3: combinação de oligonucleotídeos SECp43 TAPC1F e SECp43 TAPC2R e coluna 4: oligonucleotídeos M13Forward (plasmídeo pGEM-T) e SECp43 TAPC2. Em **C** (SELB/pCR4-TOPO – 1968pb): M: marcador de massa molecular 1Kb; coluna 5: combinação de oligonucleotídeos SELB TAPC1F e SELB TAPC2R e coluna 6: oligonucleotídeos M13 Forward e SELB TAPC2.

4.4.2 Subclonagem dos genes *selB*, *pstk* e *secp43* de *T. brucei* em vetor PC-PTP-NEO

O próximo passo foi digerir estas construções e o vetor PC-PTP-NEO com as enzimas *Apa* I e *Not* I para posterior reação de ligação (Figura 39).

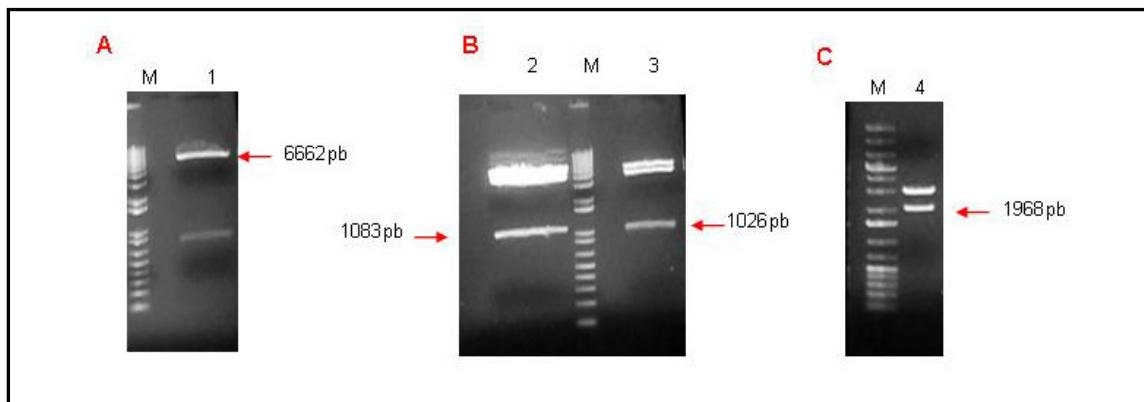


Figura 39. Reação de digestão com as enzimas *Apa* I e *Not* I para subclonagem em vetor pC-PTP-NEO. Gel de agarose 0,8% em A e B e, em C gel de agarose 0,6% Em **A**: coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb (pb=pares de base) e coluna 1: clivagem do vetor pc-PTP-NEO (6662pb). Em **B**: coluna 2: digestão da construção PSTK/pCR4-TOPO, com fragmento esperado de 1083pb; M: marcador de massa molecular 1 Kb e coluna 3: clivagem da SECp43/TOPO, com fragmento de 1026pb. Em **C**: M: marcador de massa molecular 1 Kb e coluna 4: digestão de SELB/pGEM-T, com fragmento esperado de 1968pb.

As bandas correspondentes a cada fragmento foram purificadas do gel e utilizadas em reação de ligação. Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com os produtos destas reações. As cinco colônias escolhidas de cada construção mostraram-se positivas em reação de PCR com oligonucleotídeos específicos descritos na tabela 14. E foram selecionadas as primeiras colônias de cada construção para dar continuidade ao trabalho (Figuras 40).

As construções também foram avaliadas através de sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, utilizando primers específicos para cada plasmídeo. Foram obtidas seqüências que quando alinhadas pelo programa SeqMan (DNAStar), possibilitaram a obtenção das seqüências consenso (Figura 41).

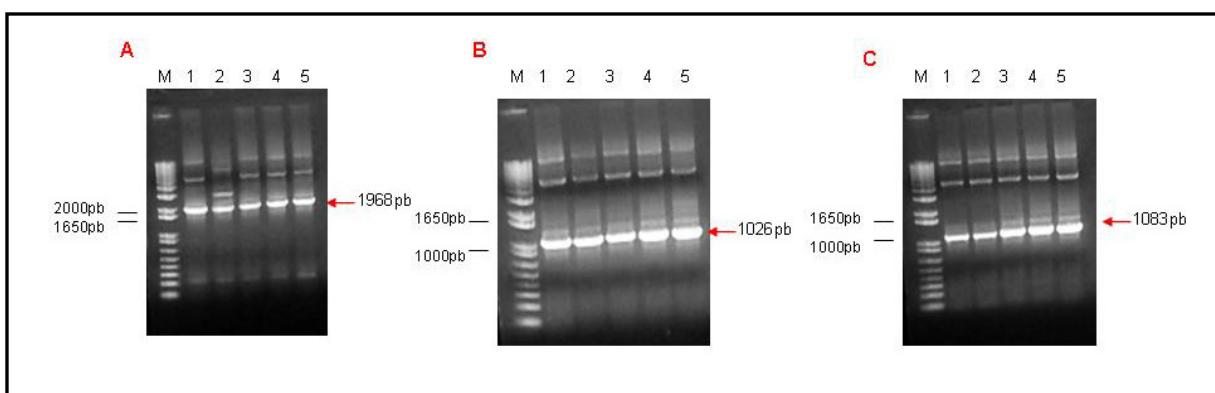
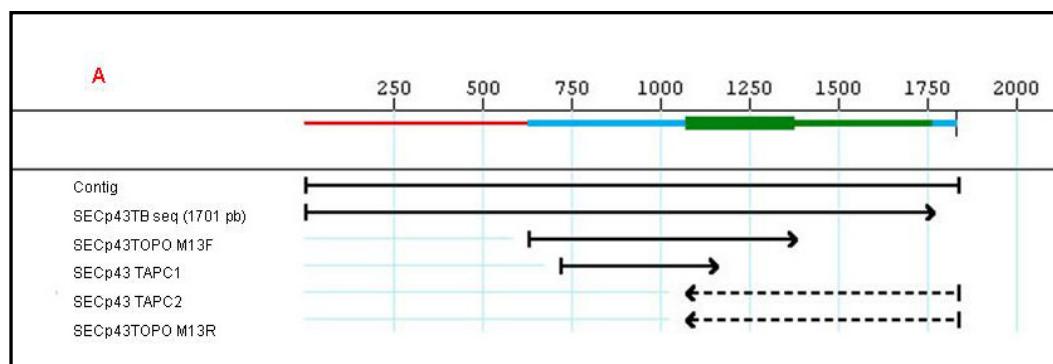


Figura 40. Recombinantes positivos para as construções em vetor pC-PTP-NEO. Gel de agarose 0,8%. Em **A:** M: marcador de massa molecular 1 KB plus (pb=pares de bases); 1, 2, 3, 4 e 5 colônias positivas para a construção SELB/TAPC. Em **B:** M: marcador de massa molecular; 1- 5 colônias positivas para SECp43/TAPC. Em **C:** M:marcador de massa molecular ; 1- 5 colônias positivas para PSTK/TAPC.



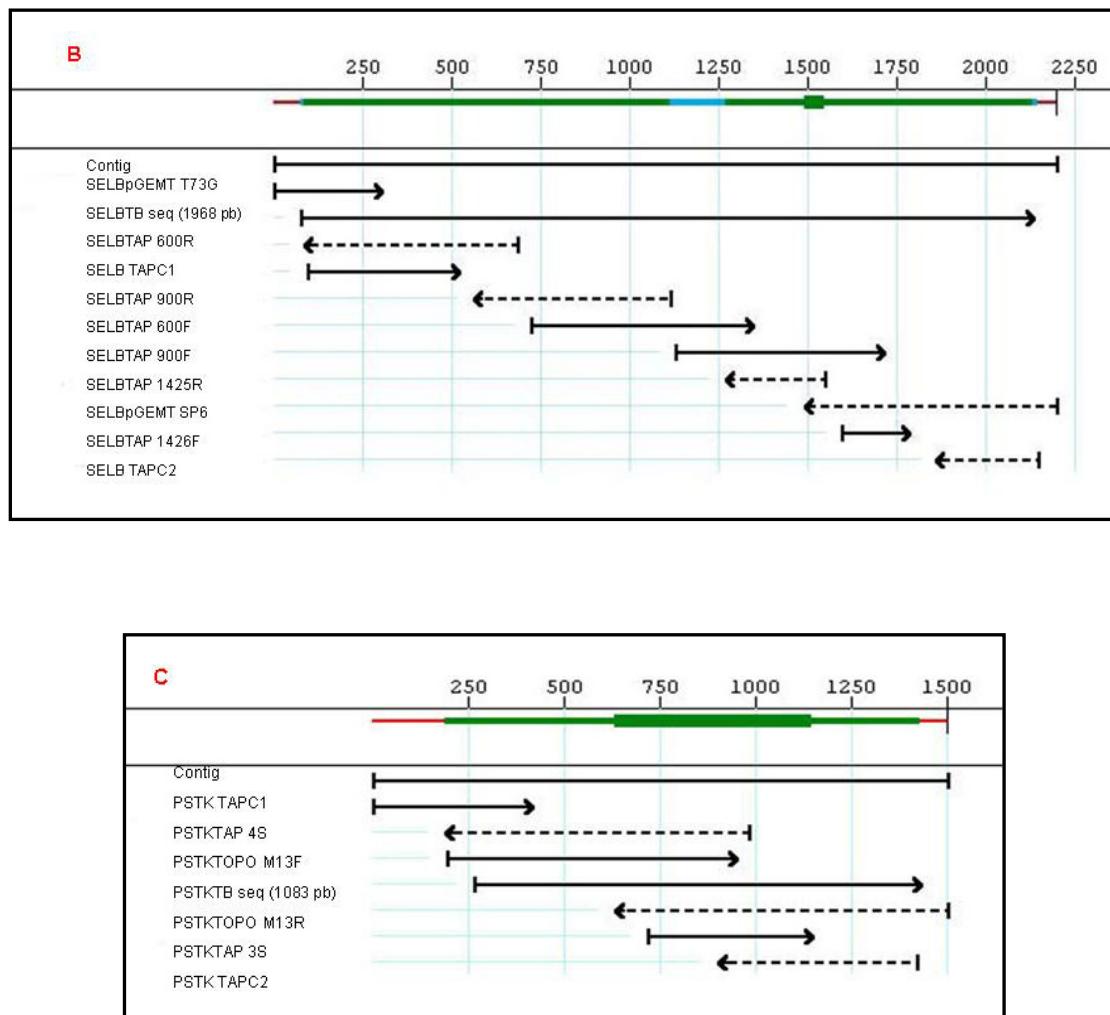


Figura 41. Resultado de alinhamento das seqüências 5' e 3' dos genes *secp43*, *selB* e *pstk* produzido pelo programa Seqman. Em **A**: alinhamento de *secp43* nos vetores pCR4-TOPO e pC-PTP-NEO, **B**: alinhamento de *selB* nos vetores pGEM-T e pC-PTP-NEO e **C**: alinhamento de *pstk* nos vetores pCR4-TOPO e pC-PTP-NEO com oligonucleotídeos específicos. A seta (sentido esquerda para direita) representa o alinhamento da extremidade 5' e a seta (sentido direita para esquerda) representa o alinhamento da extremidade 3'.

4.4.3 Transfecção das construções em vetor pC-PTP-NEO em células *T. brucei* 427

Para que ocorresse a integração genômica, a construção SELBTB/pC-PTPNEO foi linearizada com a enzima de restrição *Sal* I na posição 634, a construção SECp43/pC-PTPNEO foi linearizada na posição 1211 com a enzima *Nsi* I e PSTK/PTPNEO foi clivada na posição 604 com a endonuclease de restrição *Sma* I, as quais apresentavam um único sítio de restrição aproximadamente no meio da seqüência alvo (Figura 42).

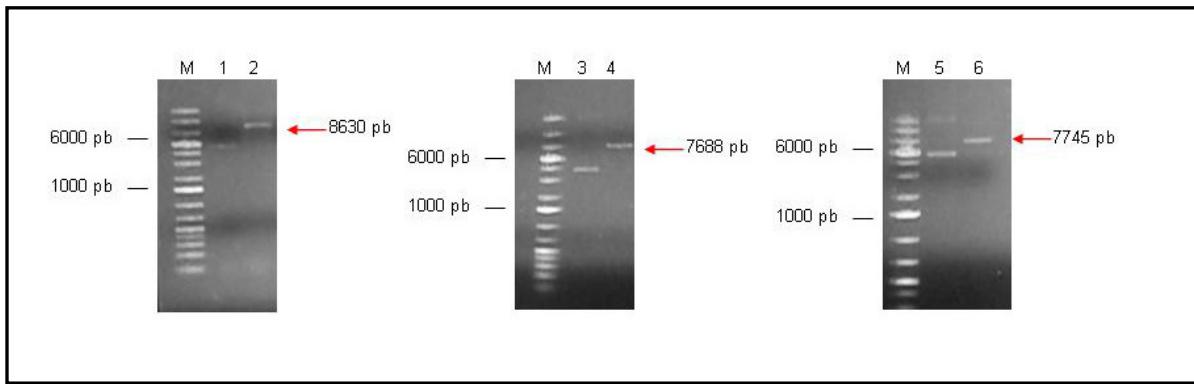


Figura 42. Digestão das seqüências alvos em vetor pC-PTP-NEO para integração genômica. Gel de agarose 0,6%. M: marcador de massa molecular 1 Kb (Fermentas); coluna 1: SELB/pC-PTP-NEO sem digerir; coluna 2: SELB/pC-PTP-NEO clivada com *Sal* I (posição 643); coluna 3: SECp43/pC-PTP-NEO sem digestão; coluna 4: SECp43/pC-PTP-NEO digerida com *Nsi* I (na posição 1211); coluna 5: PSTK/pC-PTP-NEO sem clivar e coluna 6: PSTK/pC-PTP-NEO clivada com *Sma* I (posição de clivagem na seqüência 604).

Células de *T. brucei* da linhagem 427 ($2,5 \times 10^7$ células/ml) foram transfectadas com as construções SELB/pC-PTP-NEO, SECp43/pC-PTP-NEO e PSTK/pC-PTP-NEO linearizadas. Para seleção foi usado o antibiótico G418 (neomicina) na concentração de 40 μ g/ml, que apresenta resistência conferida pelo vetor pC-PTP-NEO. Foi realizada diluição em série das culturas em placas de 24 poços e meio condicionado para seleção de clones positivos para cada construção. Entretanto, não houve seleção de clones para a construção SECp43/pC-PTP-NEO.

4.4.4 Análises de integração e expressão das construções SELB/pC-PTP-NEO e PSTK/pC-PTP-NEO

Uma reação de PCR foi realizada para analisar a correta integração dos plasmídeos SELBTB/PC-NEO e PSTKTB/PC-NEO em células de *T. brucei* 427. As reações foram realizadas a partir do DNA genômico extraído de parasitas transfectados e oligonucleotídeos iniciadores complementares às regiões 5'UTR nativa do cromossomo, que flanqueiam os genes *selB* e *pstk* e um oligonucleotídeo anti-sense complementar ao gene da proteína C, o qual foi integrado com o cassete “PTP tagging”(tabela 17).

Foram amplificados fragmentos próximos a 2139 bp e 1254 pb que correspondem à *selB* e *pstk* respectivamente, nos tamanhos esperados que compreendem a região 5'UTR nativa dos genes e o gene da proteína C inserida durante a recombinação homóloga (Figura 43).

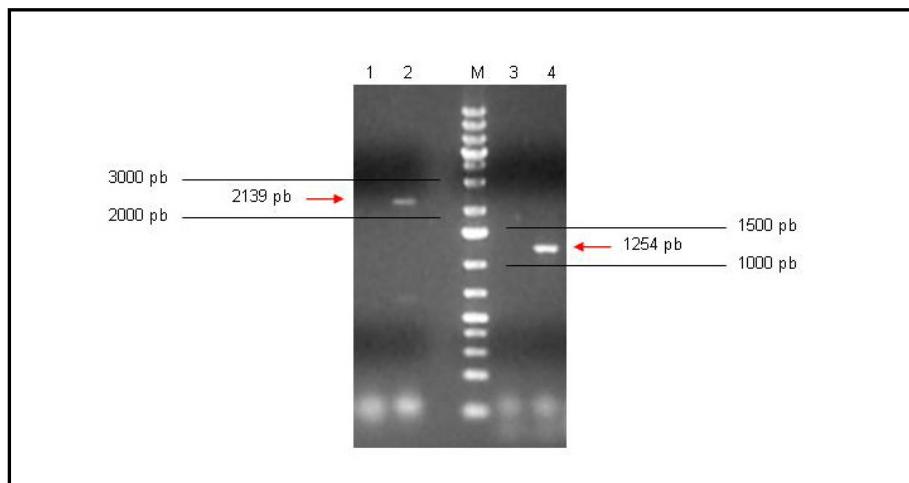


Figura 43. Análise da integração das construções SELBTB/PC-NEO e PSTKTB/PC-NEO no genoma de *T. brucei*. Gel de agarose 0,8% TAE 1X. Coluna M: marcador de massa molecular 1 Kb plus (Fermentas); coluna 1: controle negativo realizado com oligonucleotídeos específicos para o plasmídeo SELB/PC-NEO e DNA genômico de células selvagens que não sofreram integração da proteína C; coluna 2: fragmento esperado de 2139 pb para a construção SELB/PC-NEO com primers específicos e DNA genômico extraído de parasitas transfectados; coluna 3: controle negativo para o plasmídeo PSTK/PC-NEO com oligonucleotídeos específicos e DNA genômico de células nativas 427 que não foram integradas ao genoma de *T. brucei* e coluna 4: amplificação do fragmento de 1254 pb do plasmídeo PSTK/PC-NEO que sofreu integração.

Para verificar a expressão das proteínas SELB e PSTK no vetor pC-PTP-NEO em células de *T. brucei* foi realizado um experimento de imunoblotting. As células transfectadas em crescimento exponencial (1×10^7 células/ml) foram centrifugadas para preparo do extrato celular, ressuspendido e lisado em “sample-buffer 2x” para aplicação em gel SDS-PAGE e posterior transferência para a membrana de imunoblotting. Nesse experimento, foi utilizado como anticorpo “ProtA-specific PAP (peroxidase-anti-peroxidase soluble complex) reagent” (Sigma), na diluição de 1:1000, já que o vetor pC-PTP-NEO apresenta em sua construção proteína A em tandem. Foi usada membrana de nitrocelulose para transferência e a revelação foi realizada em filmes de autoradiografia (Amersham HyperfilmTM ECL) com reagente de quemiluminescência (West Pico Chemiluminescent – PIERCE).

Foram observadas bandas em autoradiografias referentes à expressão das proteínas nos tamanhos esperados de 90.4 kDa para SELB e 58.9 kDa para PSTK, pois o cassette PTP apresenta 18.9 kDa e as proteínas SELB e PSTK são expressas em 71.5 kDa e 40 kDa, respectivamente quando visualizadas em gel SDS-PAGE (Figura 44).

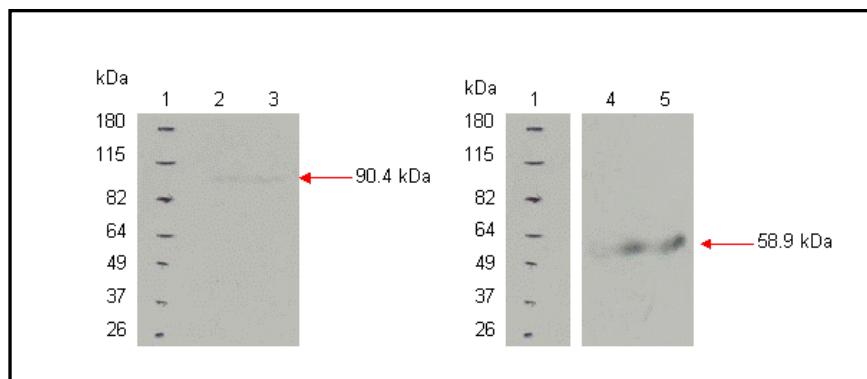


Figura 44. Análise das expressões de SELB/PCNEO e PSTK/PCNEO em *T. brucei* através de Imunoblotting. Na coluna 1: padrão de massa molecular (kDa), (Bench Pre-stained Protein ladder-Invitrogen); colunas 2 e 3; clones recombinantes do plasmídeo SELB/PCNEO; colunas 4 e 5: clones recombinantes do plasmídeo PSTK/PCNEO. Revelação em Hyperfilm (Amersham Pharmacia) com SuperSignal West Pico Chemiluminescent (PIERCE).

4.4.5 Purificação das proteínas SELB e PSTK em sistema “PTP-tagging”

Para purificação das proteínas SELB e PSTK em sistema “PTP-tagging” foram crescidos 4 litros de células transfetadas de *T. brucei* a 1×10^7 células/ml. Essas células foram tratadas com tampões adequados e lisadas no equipamento “French press” com adição de inibidores de protease. Após a lise, o extrato celular foi congelado em nitrogênio líquido em alíquotas de 1 ml e estocado a -80°C .

Dez alíquotas de 1 ml de extrato de parasitas foram descongeladas e tratadas com tampão de extração com inibidores de protease para serem incubadas em resina IgG por 2 horas a 4°C . Após esse período, foi realizada a clivagem com TEV protease por 12 horas a 4°C . Foi coletado o eluato da TEV e adicionado 2 mM de CaCl_2 e 500 μl de inibidor de protease para incubação na resina anti-prot C por 2 horas a 4°C . Após lavagem da coluna com tampão PC-150, foi realizada a última eluição em tampão EGTA/EDTA.

As alíquotas coletadas a cada passo de purificação no sistema “PTP-tagging” para ambas as proteínas SELB e PSTK foram analisadas através de imunoblotting em membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride – Biorad) com o uso do anticorpo monoclonal anti-prot-C-peroxidase, HPC4 (Roche) na concentração de 1:1000. O anticorpo anti-protC (HPC4) contém sítios de ligação de Ca^{+2} , por este motivo foi usado 1 mM de CaCl_2 na incubação do anticorpo e durante as lavagens da membrana. A membrana foi incubada com agente revelador ECL (ECL Direct Labeling and Detection System – GE Healthcare- Life Sciences) e a revelação foi realizada em filmes de autoradiografia (Amersham HyperfilmTM ECL).

Após a revelação, foram apenas visualizadas bandas nas frações do extrato celular antes da incubação em resina IgG (input) e no volume de exclusão do extrato da IgG (IgG Flow-through) tanto para SELB quanto para PSTK. Não foram observadas bandas correspondentes às proteínas SELB e PSTK nas frações do eluato de TEV, na eluição da resina anti-protC (prot C Flow through) e na eluição com EGTA (Figura 45).

Essas análises mostraram que não houve ligação das proteínas na resina de IgG. Foram realizados alguns experimentos para tentar maximizar a eficiência de ligação na resina IgG, entretanto sem resultados significativos. Esses resultados indicaram que há impedimento de ligação no C-terminal das proteínas por seus próprios enovelamentos ou por estarem complexadas a outras proteínas ligantes que escondem o sítio de ligação no C-terminal. Então, torna-se necessário o planejamento dessas mesmas construções com ligação no N-terminal para a realização da purificação em sistema “PTP-tagging” para a busca de complexos protéicos que interagem com SELB, PSTK e SECp43 em *T. brucei*.

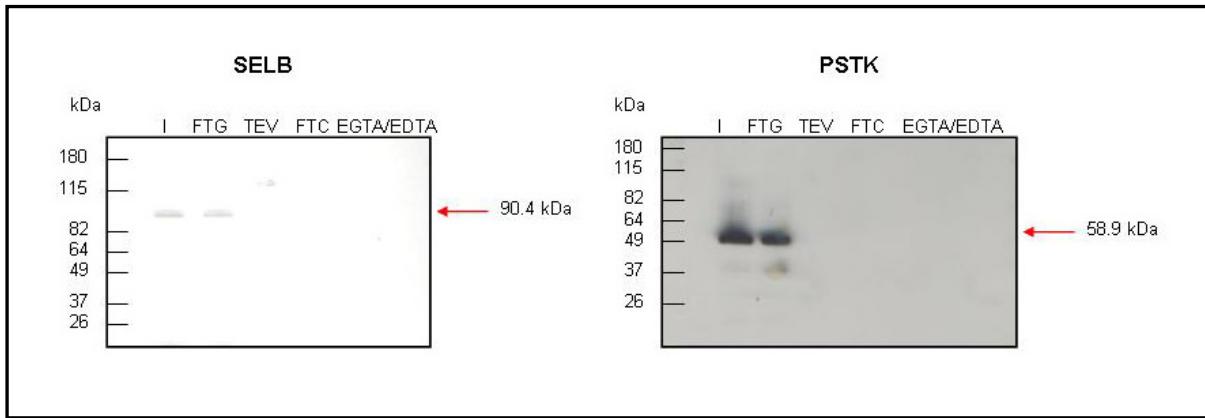


Figura 45. Purificação de SELB e PSTK no sistema “PTP tagging”. Padrão de massa molecular em kDa, (Bench Pre-stained Protein ladder-Invitrogen). I = extrato (Input); FTG = volume de exclusão de IgG (IgG Flow through); TEV = eluição após clivagem com TEV; FTC = volume de exclusão da anti prot C (anti-C Flow through) e EGTA/EDTA = eluição com tampão EGTA/EDTA em resina anti-prot-C. Revelação em filme de autoradiografia (Amersham Hyperfilm) com reagente ECL (ECL Direct Labeling and Detection System – GE Healthcare). As setas indicam os tamanhos esperados de 90.4 kDa e 58.9 kDa para SELB e PSTK em vetor pC-PTP-NEO, respectivamente

4.4.6 Imunoblotting e Imunolocalização em células de *T. brucei* 427 transfectadas com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO

Células de *T. brucei* 427 transfectadas com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO foram submetidas ao experimento de Imunoblotting para titulação do anticorpo anti-SELB (camundongo). Os parasitas (1×10^7 células/ml) foram centrifugados, ressuspensos em sample buffer 2X e lisados no ultra-som som (Ultracleaner 1400-Unique, Ultrasonic clean) por 2 minutos para aplicação em gel.

As amostras de extrato celular foram aplicadas em SDS-PAGE 10% e, este foi transferido para uma membrana de nitrocelulose. Foram realizadas incubações com o anticorpo primário anti-SELB nas diluições de 1:1000, 1:2000, 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:30000, 1:60000 e 1:100000 por 2 horas. Em seguida, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo 1:10000 (anti-IgG de camundongo) e revelada com solução reveladora (Biorad).

Através desse experimento pode ser visualizada a marcação de bandas no tamanho próximo a 90.4 kDa para a proteína expressa, SELB, em extrato celular de *T. brucei* 427 (Figura 46).

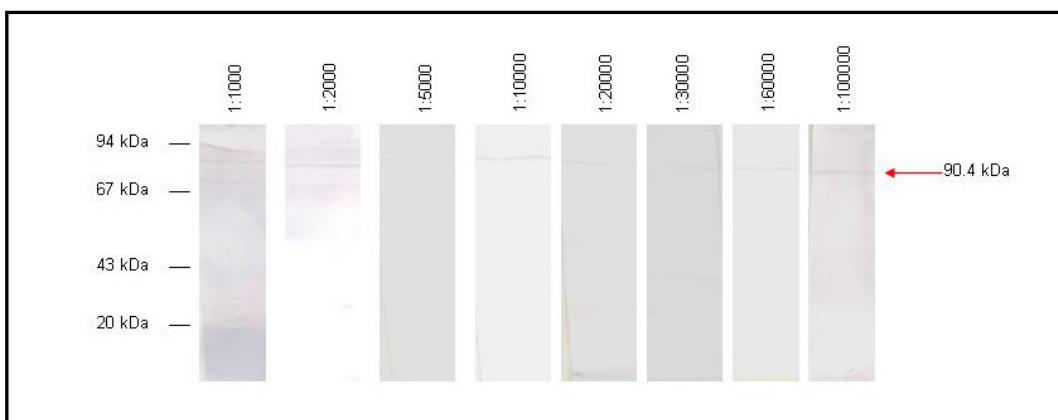


Figura 46. Imunoblotting de células de *T. brucei* 427 transfectada com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO. Cada fita representa as titulações do anticorpo anti-SELB (1:1000 – 1:100000) nos parasitas transfectados com a construção SELB/pC-PTP-NEO. A seta indica a marcação da banda em tamanho próximo a 90.4 kDa para SELB no vetor pC-PTP-NEO.

Na imunolocalização da célula transfetada com o plasmídeo SELB/PC-NEO, os parasitas (5×10^6 células/ml) foram fixados em uma lâmina com 2% de paraformaldeído e permeabilizados com 0,1% de Triton e incubados com 1% de BSA. Após sucessivas lavagens com tampão PBS 1X, foi realizada a incubação com anticorpo primário anti-SELB na diluição de 1:800 por 1 hora. Em seguida, ocorreu a incubação de (1:300) do anticorpo secundário anti- IgG fluorescente (Alexa Flúor 555 - Invitrogen) e 1 μ l de DAPI (1:250) por 1 hora. Para preservar a fluorescência foi adicionado ao poço 8 μ l de vecta shield.

Nos ensaios de imunofluorescência foram observados grânulos por todo citoplasma tanto na célula transfetada com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO quanto na célula de *T. brucei* 427 nativa usada como controle. Na figura 47, são observadas a célula transfetada SELB/PTP na fase G1 (um núcleo e um cinetoplasto) e a célula nativa com parasitas em G1 e G2 (um núcleo e dois cinetoplastos). As imagens nas fases G1 e G2 das células transfetadas

e nativa apresentam as mesmas granulações citoplasmáticas que podem ser indicativos de complexos protéicos que compõem a via de selenocisteína no citoplasma de *T. brucei*.

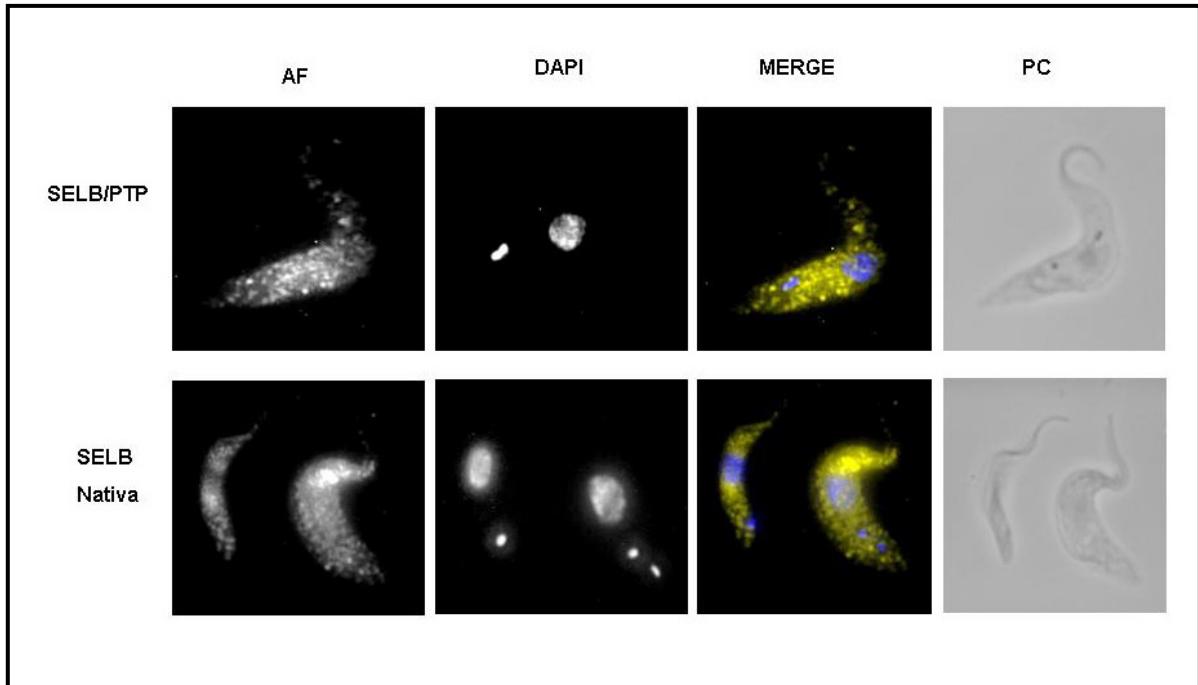


Figura 47. Imunolocalização da SELB em vetor pC-PTP-NEO transfetada em células de *T. brucei* 427. AF = Alexa/Flúor 555; DAPI = coloração com DAPI; MERGE = sobreposição das imagens de coloração com Alexa/Flúor e DAPI; e PC = imagens realizadas em microscópio contraste de fase e de fluorescência (Nikon).

4.5 Discussão

O aminoácido selenocisteína representa a principal forma disponível de selênio e sua síntese e incorporação co-traducional em selenoproteínas em resposta a um códon de terminação UGA em fase requerem uma complexa maquinaria molecular.

A ausência do homólogo de SELA em eucariotos permite hipóteses e busca de modelos que tentam explicar como acontece a remoção do grupo hidroxil da cadeia lateral da serina e formação do intermediário, aminoacrilil, que serve como acceptor de selenofosfato na geração de selenocisteína, função atribuída a SELA em *E. coli*. Yuan, J.e seus colaboradores em 2006 apresentaram evidências de que a enzima fosfoseril tRNA^{Sec} Kinase (PSTK) atue na fosforilação da serina e a enzima SepSec sintase na conversão tRNA^{Sec} para selenocisteína tRNA^{Sec}. Em outro trabalho, desenvolvido por Small-Howard, A. e colaboradores em 2006, é relatado que o fator de ligação a tRNA^{Sec}, SECp43, parece atuar na direcionamento das interações e localização de outros fatores na via de selenocisteínas em eucariotos.

Para compreensão e caracterização da via de selenocisteínas em *Trypanosoma brucei*, foi realizado estudos das proteínas SECp43, PSTK e SELB em sistema “Tandem Affinity Purification – PTP tagging” para o isolamento e investigação de novas proteínas ligantes. Esse sistema permite purificação de complexos protéicos a partir de extrato bruto, sob condições nativas. No sistema “Tandem Affinity Purification – TAP” original a proteína alvo é fusionada à calmodulina (CBP) separada pela protease TEV de duas proteínas A (Prot A) em “tandem” inseridos em um vetor de expressão (PUIG et al., 2001). O sistema “PTP tagging” foi elaborado com substituição da calmodulina por proteína C (Prot C), (SCHIMANSKI et al., 2005).

A partir da técnica de PCR foram amplificados fragmentos de 1083, 1968 e 1026 pb referente aos genes *pstk*, *selB* e *secp43*, respectivamente, a partir da extração de DNA genômico de *T. brucei* da cepa 2913 (figura 37, pg. 124). Na amplificação foram utilizados

oligonucleotídeos complementares as regiões terminais dos genes contendo sítios para clivagem das enzimas *Apa* I e *Not* I para posterior clonagem em vetor pC-PTP-NEO (SCHIMANSKI et al., 2005).

Após a subclonagem em vetor pC-PTP-NEO, os plasmídeos foram transfectados em células de *T. brucei* 427. Os clones selecionados com G418 tiveram suas construções verificadas por PCR. Foram obtidos fragmentos de 2139 bp e 1254 pb que correspondem as regiões entre 5'UTR dos genes *selB* e *pstk* respectivamente, e proteína C do cassete PTP (Figura 43, pg. 129). A célula clonal que foi gerada tem o plasmídeo integrado em um alelo e permanece com a cópia inalterada do outro alelo (SCHIMANSKI et al., 2005). A imunodetecção do epítopo proteína A, através de reação com anticorpo PAP, revelou que cada célula clonal especificamente expressou a proteína fusionada ao cassete PTP, com massas moleculares esperadas aproximadamente de 90.4 kDa para SELB e 58.9 kDa para PSTK, (SCHIMANSKI et al., 2005; TAKEBE et al., 2007), (figura 44, pg. 130).

Foram preparados 4 litros de cultura celular transfectada de *T. brucei* (1×10^7 células/ml) para purificação em sistema “PTP-tagging” das proteínas SELB e PSTK. Após o processo de purificação, a eficiência do método foi avaliada através de imunoblotting com o anticorpo anti-ProtC. (figura 45, pg.132). Foi observado que não houve ligação tanto de SELB quanto PSTK na resina de IgG. Um problema intrínseco dessa metodologia é que o cassete PTP adicionado à proteína alvo não deve estar suficientemente exposto para permitir a ligação da proteína à resina de imunoafinidade. Esse impedimento de ligação da proteína pode ser resolvido com mudança do cassete PTP para o N-terminal (RIGAUT et al., 1999; PUIG et al., 2001). É comum o cassete PTP fusionado ao C-terminal para manter a expressão da proteína alvo sob controle do seu próprio promotor. Entretanto algumas proteínas sofrem perda de função quando um peptídeo é fusionado em seu domínio C-terminal (PUIG et al., 2001).

O anticorpo anti-SELB foi testado em extrato celular *T. brucei* 427 transfectado com plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO. Esse experimento confirmou a presença no extrato da expressão da proteína SELB com massa molecular de 90.4 kDa (figura 46, pg. 133). Com a substituição do domínio de calmodulina pela proteína C no cassete PTP, houve redução no tamanho do cassete para 169 aminoácidos e massa molecular de 18.9 kDa (SCHIMANSKI et al., 2005). Na imunolocalização, as células de *T. brucei* transfectada com o plasmídeo SELB/pC-PTP-NEO foram devidamente fixadas e tratadas em paraformaldeído, triton e BSA. Também foram observadas granulações citoplasmáticas na célula transfectada com SELB/pC-PTP-NEO, vistas anteriormente no capítulo 3 (figura 34, pg. 102) no experimento de imunolocalização da SELB em células de *T. brucei* nativa, usada aqui como controle (figura 47, pg. 134).

Essa metodologia em sistema PTP será importante ferramenta para nos auxiliar no isolamento de complexos protéicos na via de selenocisteína em eucariotos, especialmente em *T. brucei*.

Perspectivas

- Realização de experimentos de “knockout” para validar os genes LmSel1 e LinfSel1 potencialmente envolvidos na via de selenocisteínas em *Leishmania*;
- Clonagem do fator de elongação de selenocisteína, SELB, em outros vetores de expressão a fim de obter a proteína na fração solúvel para estudos moleculares e estruturais;
- Refinar as condições de cristalização da proteína recombinante SELD de *T. brucei* para obtenção de um cristal para estudos estruturais;
- Construções de novos oligonucleotídeos para clonar os genes *pstk*, *selB* e *secp43* na porção N-terminal e dessa maneira, tentar isolar proteínas ligantes do complexo na via de selenocisteína em *T. brucei*;
- Novos experimentos de imunolocalização das proteínas SELB, SELD, SECp43 e Seril tRNA sintetase com marcadores citoplasmáticos para verificar se as granulações observadas podem ser aglomerados de proteínas ou apenas um tipo de marcação citoplasmática em forma de grânulos em células de *T. brucei* 427 nativa com acompanhamento em gel nativo para estimar o tamanho do complexo

Referências

- AMBERG, R. et al. Selenocysteine synthesis in mammalia: an identity switch from tRNA^{ser} to tRNA^{sec}. **Journal Molecular Biology**, v. 263, n. 1, p. 8-19, 1996.
- APHASIZHEV, R. et al. Isolation of a U-insertion/deletion editing complex from *Leishmania tarentolae* mitochondria. **European Molecular Biology Journal**, v. 22, n. 4, p. 913-924, 2003.
- ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6102-6109, 2000.
- ARTHUR, J. R.; NICOL, F.; BECKETT, J. Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. **The American Journal of Clinical Nutrition Supplements**, v.57, p. 236S-239S, 1993.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. **Short protocols in molecular biology**. 2 ed. New York: Wiley, 1995.
- BARON, C.; BÖCK, A. The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine – specific tRNA^{Sec} of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 30, p. 20375-20379, 1991.
- BARON, C. et al. Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA. **Journal Molecular Biology**, v. 231, n. 2, p. 274-292, 1993b.
- BARRET, M. P. et al. The Trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p 1469-1480, 2003.
- BERRY, M. J. et al. Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 39 untranslated region. **Nature**, v. 353, n. 6341, p. 273-276, 1991.
- BERRY, M. J. et al. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 12, n. 8, p. 3315-3322, 1993.

BIRRINGER, M.; PILAWA, S.; FLOHÉ, L. Trends in selenium biochemistry. **Natural Product Reports**, v. 19, n. 6, p. 693-718, 2002.

BISSER, S. et al. Equivalence trial of melarsoprol and nifurtimox monotherapy and combination therapy for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. **The Journal of Infectious Disease**, v. 195, n. 3, p. 322-329, 2007.

BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L. N. **Protein Crystallography**. London: Academic Press, 1976.

BÖCK, A. et al. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 463-467, 1991.

BÖCK, A. Biosynthesis of selenoproteins. **Biofactors**, v. 11, n. 1, p. 77-78, 2000.

BOYINGTON, J. C. et al. Crystal structure of formate dehydrogenase h: catalysis involving mo, molybdopterin, selenocysteine, and an fe₄s₄ cluster. **Science**, v. 275, p. 1305-1308, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantities for protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyses Biochemical**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDAO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.93, p.488-94, 1999.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York: Garland, 1991.

BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, p. 215-235, 2005.

CARLSON, B. A. et al. Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec} kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 35, p. 12848-12853, 2004.

CARMO, E. H. Leishmaniose visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, supl. III, p. 41-45, 2002.

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

CHAMBERS, I. et al. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active is encoded by the “termination” codon, TGA. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 5, n. 6, p. 1221-1227, 1986.

CHAPPUIS, F. et al. Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* Human African Trypanosomiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 748-751, 2005.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews/ Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

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

COBUCCI-PONZANO, B.; ROSSI, M.; MORACCI, M. Recoding in Archaea. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 339-348, 2005.

CONRAD, M. et al. Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 21, p. 9414-9423, 2004.

CONRAD, M. et al. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. **Biological Chemistry**, Minireview, v. 388, p. 1019-1025, 2007.

COPELAND, P. R.; DRISCOLL, D. M. Purification, sensitivity, and RNA binding properties of secis-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 25447-25454, 1999.

COPELAND, P.R. et al. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 19, n. 2, p. 306-314, 2000.

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

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal Medical Research**, v. 123, p. 399-410, 2006.

CUNNINGHAM, I. New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. **The Journal of Protozoology**, v. 24, n. 5, p. 325-329, 1977.

DAVIS, B. J. Disc Electrophoresis. II. Methods and Application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404-421, 1964.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nature Reviews/Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 692-693, 2004.

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

DIWADKAR-NAVSARIWALA, V. et al. Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8179-8184, 2006.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Current chemotherapy of human African trypanosomiasis. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. S10-S13, 2002.

DRAKAS, R.; PRISCO, M.; BASERGA, R. A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 132-137, 2005.

EL-SAYED, N. M. et al. The African trypanosome genome. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 329-345, 2000.

FAGEGALTIER, D. et al. Characterization of mSELB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 19, n. 17, p. 4796-4805, 2000.

FLETCHER, J. E. et al. The selenocysteine incorporation machinery: interactions between the SECIS RNA and the SECIS -binding protein SBP2. **RNA**, v. 7, p. 1442-1453, 2001.

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

FORCHHAMMER, K.; RÜCKNAGEL, K. P; BÖCK, A. Purification and biochemical characterization of SELB, a translation factor involved in selenoprotein synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 16, p. 9346-9350, 1990.

FORCHHAMMER, K. et al. Selenocysteine Synthase from Escherichia coli. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6318-6323, 1991.

FORLER, D. et al. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 89-92, 2003.

GANTHER, H. E. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase review. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 9, p. 1657-1666, 1999.

GAUTHERET, D.; LAMBERT, A. Direct RNA motif definition and identification from multiple sequence alignments using secondary structure profiles. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 5, p. 1003-1011, 2001.

GE, K.; YANG, G. The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. **The American Journal of Clinical Nutrition Supplements**, v. 57, n. 2, p. 259S-263S, 1993.

GENEDB – Sanger Institute, Pathogen Sequencing Unit.
Disponível em: <<http://www.genedb.org/>>. Acesso em: 10/fevereiro/2006.

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

GELPI, C.; SONTHEIMER, E. J.; RODRIGUEZ-SANCHES, J. L. Autoantibodies against a serine tRNA- protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9739-9743, 1992.

GLADYSHEV, V. N. et al. Coordination of selenium to molybdenum in formate dehydrogenase H from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 16, p. 7708-7711, 1994.

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

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. The **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUIMARÃES, M. J. et al. Identification of a novel *selD* homolog from Eukaryotes, Bacteria, and Archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15086-15091, 1996.

GULLY, D. et al. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. **FEBS Letters**, v. 548, p. 90-96, 2003.

HATFIELD, D.; PORTUGAL, F. H. Seryl-tRNA in mammalian tissues: Chromatographic differences in brain and liver and a specific response to the codon, UGA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 67, n. 3, p. 1200-1206, 1970.

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

HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N. **SELENIUM**: its molecular biology and role in human health. 2. ed. New York: Springer, 2006.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 50-54, 2003.

HILL, K. E.; LLOYD, R. S.; BURK, R. F. Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein p mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 2, p. 537-541, 1993.

HILL, K. E. et al. Deletion of selenoprotein p alters distribution of selenium in the mouse. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 16, p. 13640-13646, 2003.

HUBERT, N. et al. A protein binds the selenocysteine insertion element in the 3'UTR of mammalian selenoprotein mRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 3, p. 464-469, 1996.

IRIBAR, M. P.; TOSI, L. R.; CRUZ, A. K. A processed short transcript of *Leishmania*, ODD1. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 205-208, 2003.

JAYAKUMAR, P. C. et al. The Selenophosphate synthetase gene from *Leishmania major*. **DNA Sequence**, v. 15, n. 1, p. 66-70, 2004.

KARIMPOUR, I. et al. Sequence of the gene encoding the mitochondrial capsule selenoprotein of mouse sperm: identification of three in-phase TGA selenocysteine codons. **DNA and Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 693-699, 1992.

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

KNUESEL, M. P. et al. Identification of novel protein-protein interactions using a versatile mammalian TAP expression system. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, n. 11, p. 1225-1233, 2003.

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

KRYUKOV, G. V.; KRYUKOV, V. M.; GLADYSHEV, V.N. New mammalian selenocysteine containing proteins identified with an algorithm that search for selenocysteine insertion sequence elements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 33888-33897, 1999.

KRYUKOV, G. V.; GLADYSHEV, V. N. Selenium metabolism in zebrafish: multiplicity of selenoprotein genes and expression of a protein containing 17 selenocysteine residues. **Genes to Cells**, v. 5, n. 12, p. 1049-1060, 2000.

KRYUKOV, G. V.; GLADYSHEV, V. N. Mammalian selenoprotein gene signature: identification and functional analysis of selenoprotein genes using bioinformatics methods. **Methods in Enzymology**, v. 347, p. 84-100, 2002.

KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003.

LABORATORY identification of Parasites of Public Health Concern (DPDx).

Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm>. Acesso em: 05/maio/2008.

LACOURCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 30921-30926, 1998.

LACOURCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. Catalytic properties of selenophosphate synthetases: Comparison of the selenocysteine-containing enzyme from *Haemophilus influenzae* with the corresponding cysteine-containing enzyme from *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 1, p. 44-48, 1999.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W et al. **Leishmaniasis in biology and medicine**. London, Academic Press, 1987. v. 1, p.1-120.

LAINSON, R.; RANGEL, E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LEE, B. J. et al. Identification of a selenocysteyl-tRNA^{Ser} in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.17, p. 9724-9727, 1989.

LEINFELDER, W. et al. In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA^{UCA} from seryl-tRNA^{UCA}: Involvement and characterization of the *selD* gene product. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 2, p. 543-547, 1990.

LESCURE, A.; FAGEGALTIER, D.; KROL, A. Protein factors mediating selenoprotein synthesis. **Current Protein and Peptide Science**, v. 3, n. 1, p. 143-151, 2002.

LESCURE, A.; GAUTHERET, D.; KROL, A. Novel selenoproteins identified from genomic sequence data. **Methods in Enzymology**, v. 347, p. 57-70, 2002.

LI, J. Y. et al. Distribution of selenium in the microenvironment related to Kaschin-Beck disease. In: COMBS, G. F. et al. **Selenium in biology and medicine**. New York: AVI Van Nostrand, 1984. p. 911-925.

LOBANOV, A. V. et al. The *Plasmodium* selenoproteome. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 2, p. 496-505, 2006.

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

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

LUND, E.; DAHLBERG, J. E. Proofreading and Aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2082-2085, 1998.

MÄENPÄÄ, P. H.; BERNFIELD, M. R. A specific hepatic transfer tRNA for phosphoserine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 67, n. 2, p. 688-695, 1970.

MARIN, F. et al. Cultivation of *Leishmania*: comparison of different media for promastigote cultivation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 76, p. 607-613, 1982.

MARTIN III, G. W.; HARNEY, J. W.; BERRY, M. J. Functionality of mutations at conserved nucleotides in eukaryotic SECIS elements is determined by the identity of a single nonconserved nucleotide. **RNA**, v. 4, n. 1, p. 65-73, 1998.

MATTHEWS, K.R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 2, p. 283-290, 2005.

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

MINISTÉRIO da saúde do Brasil.

Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>; <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 23/abril/2008.

MOURIER, T. et al. A selenocysteine tRNA and SECIS element in *Plasmodium falciparum*. **RNA**, v. 11, n. 2, p. 119-122, 2005.

MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R. D.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 7, p. 320-328, 2003.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Institutes of Heath (United States). Disponível em :<<http://www.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 05/maio/2008.

NATIVE PAGE Manual, Separation Technique Phastsystem TM, Amersham Biosciences. Disponível em: <<http://www1.gelifesciences.com>>. Acesso 12/maio/2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2000.

NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

NONN, L. et al. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 3, p.916-922, 2003.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n. 11, p.1287-1312, 2001.

OHAMA, T.; YANG, D. C. H.; HATFIELD, D. L. Selenocysteine tRNA and serine tRNA are aminoacylated by the same synthetase, but may manifest different identities with respect to the long extra arm. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 315, n. 2, p. 293-301, 1994.

OSTROSKY-ZEICHMER et al. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 3, p. 415-425, 2003.

PARA-SITE Online.

Disponível em: <<http://www.med-chem.com/Para>>. Acesso em: 10/abril/2008.

PAYS, E.; VANHAMME, L.; PEREZ-MORGA, D. Antigenic variation in *Trypanosome brucei*: facts, challenges and mysteries. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, n. 4, p.369-374, 2004.

PINHEIRO et al. The T-cell anergy induced by Leishmania amazonensis antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 3, p. 519-527, 2004.

PROTEIN Electrophoresis Technical Manual, Amersham Pharmacia Biotech. Disponível em: <<http://www1.gelifesciences.com>>. Acesso 12/maio/2008.

PUIG, O. et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. **Methods**, v. 24, n. 3, p. 218-229, 2001.

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

RIGAUT, G. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**, v. 17, n.10, p. 1030-1032, 1999.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-Host-cell interaction: Complexities and Alternative Views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

RODITI, L.; LINIGER, M. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 128-134, 2002.

ROHILA, J. S. et al. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. **The Plant Journal**, v. 38, p. 172-181, 2004.

ROMERO, H. et al. Evolution of selenium utilization traits. **Genome Biology**, v. 6, n. 8, p. 1-11, 2005.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, n. 4073, p. 588-590, 1973.

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

SANTOS, M. A. et al. Predictors of an unsatisfactory response to pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n.6, p. 629-633, 2002.

SCHARPF, M. et al. Neuronal and ependymal expression of selenoprotein P in the human brain. **Journal of Neuronal Transmission**, v. 114, n. 7, p. 877-884, 2007.

SCHATTNER, P.; BROOKS, A. N.; LOWE, T. M. The tRNAscan-SE, snoScan and snoGPS web serves for the detection of tRNAs and snoRNAs. **Nucleic Acids Research** (Web server issue), v. 33, p. W686-689, 2005.

SCHIMANSKI, B.; NGUYEN, T. N.; GUNZL, A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 11, p. 1942-1950, 2005.

SCHOMBURG, L. et al. Gene disruption discloses role of selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 397-402, 2003.

SCHOMBURG, L.; SCHWEIZER, U.; KÖHRLE, J. Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, and enigmatic. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 16, p. 1988-1995, 2004.

SHAW, J. et al. Editing of kinetoplastid mitochondrial mRNAs by uridine addition and deletion generates conserved aminoacid sequences and AUG initiation codons. **Cell**, v. 53, n. 3, p. 401-411, 1988.

SHEN, Q.; McQUILKIN, P. A.; NEWBUGUER, P. E. RNA-binding proteins that specifically recognize the selenocysteine insertion of sequence of human cellular glutathione peroxidase mRNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 51, p. 30448-30452, 1995.

SHEN, Q. et al. Identification and molecular cloning of a human selenocysteine insertion sequence-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5443-5446, 1998.

SHÖN, A. et al. The selenocysteine-inserting opal suppressor serine tRNA from *E. coli* is highly unusual in structure and modification. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 18, p. 7159-7165, 1989.

SIMPSON, L. The kinetoplast of the homoflagellates. **International Review of Cytology**, v. 32, p.139-207, 1972.

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

STRANGES, S. et al. Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 8, p. 694-699, 2006.

SPÄTH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infectious in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9536-9541, 2003.

STOYANOV, A. V. et al. Conductivity properties of carrier ampholyte pH gradients in isoelectric focusing. **Electrophoresis**, v. 26, n. 2, p. 473-479, 2005

STURCHLER, C. et al. Unique secondary and tertiary structural features of the eukaryotic selenocysteine tRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1073-1079, 1993.

STURCHLER-PIERRAT, C. et al. Selenocysteylation in eukaryotes necessitates the uniquely long aminoacyl acceptor stem of selenocysteine tRNA Sec. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 31, p. 18570-18574, 1995.

SU, D. Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase (roles in disulfide bond formation and sperm maturation). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 28, p. 26491-26498, 2005.

SUN, Q. A. et al. Redox regulation of cell signaling by selenocysteine in mammalian thioredoxin reductases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 35, p. 24522-24530, 1999.

SUN, Q. A. et al. Selenoprotein oxidoreductase with specificity for thioredoxin and glutathione systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 7, p. 3673-3678, 2001.

TAKEBE, S. et al. Purification of components of the translation elongation factor complex of plasmodium falciparum by tandem affinity purification. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 584-591, 2007.

TORMAY, P. et al. Genes coding for the selenocysteine-inserting tRNA species from *Desulfomicrobium baculum* and *Clostridium thermoaceticum*: structural and evolutionary implications. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 5, p. 1268-1274, 1994.

TUJEBAJEVA, R. M. et al. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. **European Molecular Biology Organization**, v. 1, n. 2, p. 158-163, 2000.

URSINI, F. et al. Dual function of the selenoprotein phgpX sperm maturation. **Science**, v. 285, n. 5432, p. 1393-1396, 1999.

UVA FASTA SERVER, FASTA Sequence Comparison at the U. of Virginia.
Disponível em: <http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www/prss.htm>. Acesso em: 22/novembro/2005.

VERES, Z. et al. Selenophosphate synthetase. enzyme properties and catalytic reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 14, p. 10597-10603, 1994.

VERES, Z.; STADTMAN, T. C. A purified selenophosphate-dependent enzyme from *Salmonella typhimurium* catalyzes the replacement of sulfur in 2-thiouridine residues in tRNAs with selenium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n. 17, p. 8092-8096, 1994.

WALCZAK, R. et al. A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. **RNA**, v. 2, n. 4, p. 367-379, 1996.

WALCZAK, R.; CARBON, P.; KROL, A. An essential non-Watson-Crick base pair motif in 3'UTR to mediate selenoprotein translation. **RNA**, v. 4, n. 1, p. 74-84, 1998.

WILTING, R. et al. Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. **Journal of Molecular Biology**, v. 266, n. 4, p. 637-641, 1997.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89-101, 1999.

WOLIN, S. L.; MATERA, A. G. The trials and travels of tRNA. **Genes & Development**, v. 13, p. 1-10, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).
Disponível em: <<http://www.who.int/en>>. Acesso em: 01/outubro/2007.

WU, X. Q.; GROSS, H. J. The long extra arms of human tRNA^{(Ser)Sec} and tRNA^{Ser} function as major identity elements for seryl-tRNA^{Ser} orientation-dependent, but not sequence-specific manner. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 24, p. 5589-5594, 1993.

XU, X. M. et al. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 50, p. 41568-41575, 2005.

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

YANT, L. J. et al. The selenoprotein GPx4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 4, p. 496-502, 2003.

YOUNG, P. A.; KAISER, I. I. Aminoacylation of *Escherichia coli* cysteine tRNA by selenocysteine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 171, n. 2, p. 483-489, 1975.

ZACHARA, B. A. et al. Tissue level, distribution, and total body selenium content in healthy and diseased humans in Poland. **Archives of Environmental Health**, v. 56, n. 5, p. 461-466, 2001.

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