## **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

## INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Carlos Roberto Koscky Paier** 

"Padronização da Expressão Heteróloga e de Modelo de Ensaio de

Atividade para a Proteína Quinase Humana S6K"

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
CARLOS ROMONTO K. PAIER

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Campinas, 2009

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P152p	Paier, Carlos Roberto Koscky Padronização da expressão heteróloga e de modelo de ensaio de atividade para a proteína quinase humana S6K / Carlos Roberto Koscky Paier. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.
	Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	<ol> <li>Expressão heteróloga.</li> <li>Proteínas recombinantes.</li> <li>Teste imunoenzimático.</li> <li>Proteína quinase humana.</li> <li>Proteína recombinante S6K.</li> <li>Zanchin, Nilson Ivo Tonin.</li> <li>Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.</li> <li>Título.</li> </ol>
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Standardization of the heterologous expression and of a model assay of activity for the human protein kinase S6K.

Palavras-chave em inglês: Heterologous expression; Recombinant proteins; Immunoenzyme technique; Human protein kinase, S6K recombinant protein.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Nilson Ivo Tonin Zanchin, Ana Paula Ulian de Araújo, João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa.

Data da defesa: 02/10/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 2 de Outubro de 2009

#### **BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (Orientador)

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo

Assinatura

Vaula Ilde Assinatura

Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa

Assinatura

Profa. Dra. Maricilda Palandi de Mello

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Assinatura

Assinatura

"Se és capaz de ter calma quando todos ao redor de ti já a perderam, e se te culparem de crerem em ti quando estão todos duvidando, e para estes, no entanto, achares uma resposta;

Se és capaz de esperar, sem te desesperares, ou sendo enganado, não mentir ao mentiroso, e sendo achado, sempre ao ódio te esquivares, e não pareceres bom demais ou pretencioso;

Se és capaz de sonhar, sem que a isso só te atires a sonhar, sem fazer dos sonhos teus senhores; se, encontrando a derrota e o triunfo, conseguires tratar da mesma forma esses dois impostores;

Se és capaz de sofrer a dor de ver mudadas em armadilha as verdades que disseste e as coisas porque destes a vida estraçalhadas, e refazê-las com o pouco que de ti restou;

Se és capaz de arriscares numa única parada tudo quanto ganhastes em toda tua vida, e ao perder, nunca dizer nada, resignado a tornar ao ponto de partida, dar força, nervos, músculos, restando a vontade em ti ordenando-te a persistir;

Se és capaz de entre a plebe não te corromperes, e entre os reis não perderes a simplicidade, e de amigos, quer bons, quer maus, te defenderes; se a todos podes ser de alguma utilidade;

Se és capaz de dar segundo por segundo do implacável minuto na corrida;

Tua é a terra, com tudo que nela existe!

- E o que ainda é muito mais: és um homem, meu filho."

Missionário e poeta Kipliny

"Desvia de mim a opressão que temo, pois a tua lei é boa." Salmos 119:39

> Dedico este trabalho à minha amada mãe, em cuja ternura espelho minha luta, ao meu querido pai, em cujo esforço me inspiro, e às minhas irmãzinhas Darina e Gabriela, cujas amizades me afagam a memória.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por não desistir quando eu pensei em desistir. Ele é a minha salvação!

Ao Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (orientador), pela oportunidade de realização deste trabalho e pela infra-estrutura oferecida.

Às técnicas e amigas M<sup>a</sup>. Tereza Cristina Lima Silva, Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Teixeira, M<sup>a</sup>. Adriana Cristina Alves Pinto, Givanil Leite Garrido e Carolina Bondarik pelos imensos galhos quebrados, pelas risadas e pela sabedoria.

Aos amigos e amigas do LBM, Diane Theo de Moraes, Dr<sup>a</sup>. Melissa Fessel, Deivid Lucas Migueleti, Gabriella Pitondo Reis, Karoline Mendonça, Juliana Smetana, Daniela Soares Razolli e a todos os demais que tornaram o ambiente de trabalho sempre agradável, estimulante e cheio de favores!

À M<sup>a</sup>. Renata Rocha de Oliveira, pelo auxílio nos experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular.

À Dr<sup>a</sup>. Adriana Franco Paes Leme, Dr<sup>a</sup>. Thaís Caroline Dallabona Dambroski, M<sup>a</sup>. Margareth Sugano e Dr<sup>a</sup>. Bianca Alves Pauletti pela grande paciência e pela realização dos experimentos de espectrometria de massas.

Aos amigos da inesquecível República dos Fodões, José Jadsom Sampaio de Figueiredo, Gustavo Costa Bressan, Daniel Carlos Ferreira Lanza e Luís Gustavo Morello, por serem a família que pude escolher em Campinas, pelo companheirismo, pelas dicas de trabalho e por me fazerem recuperar o referencial de ser humano (vocês me ajudaram mais do que sabem!).

Aos queridos irmãos da Igreja Presbiteriana de Barão Geraldo, pela acolhida imediata e agradável, pela paciência e pelo exemplo de homens e mulheres que crêem em Deus e vivem essa fé, sem se esconderem de um mundo cada vez mais desafiador.

Aos meus queridos avós maternos, vó Delma, pelos quitutes sempre deliciosos, e ao meu vô Roberto (*in memorian*) pelo exemplo que ecoa pelos anos.

Aos meus amados tio Carlos e tia Raquel, por serem meus segundos pai e mãe, e aos meus primos Eduardo e Emanuelle, por serem como irmãos para mim.

Aos meus avós paternos, vô Waldir e vó Loló, por propiciarem alguns dos melhores momentos da minha vida, e aos demais tios e tias.

Aos meus queridos tio Rubens, tia Sônia e meus priminhos João Vítor e Maria Cecília, por serem a família que sempre me acolheu e me apresentou valores que norteiam minha vida até hoje.

À amada tia Léia, tio Antenor e a meus primos Guilherme e Henrique, por sempre me acolherem alegremente.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Baracat Pereira, minha orientadora acadêmica na graduação, por plantar em mim o gosto pela excelência científica, à Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela excelente formação e à Unicamp, pela lapidação.

À ABTLuS/MCT/CNPq, por toda a infra-estrutura e apoio para o desenvolvimento deste trabalho, e à FAPESP, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO

RES	UMO.		1
ABS	TRAC	Т	
1 IN	ITROE	DUÇÃO	5
1.1 1.2 1.3 1.4	A V α4 e S6K Exp	ia de mTOR1 ou Via de Sinalização Sensível à Rapamicina (VSSR). Regulação de PP2A na Via de Sinalização Sensível à Rapamicina (V : Regulação por Fosforilação, Desfosforilação e suas Conseqüências. ressão Heteróloga de S6Ks	5 /SSR)6 9 16
	1.4.1	Expressão em <i>E. coli</i>	
	1.4.2	Expressao em Celulas de Inseto	1/
2 0	BJETI	VOS	19
2.1	Obje	etivos Gerais	19
2.2	Obje	etivos Específicos	19
3 M	ATER	IAIS E MÉTODOS	20
3.1	Mei	os de Cultura. Cepas e Clones de <i>E. coli</i>	
3.2	Trar	sformação de <i>E. coli</i>	
	3.2.1	Choque Térmico	
	3.2.2	Eletroporação	
3.3	Cult	ivo de Células Eucarióticas	25
	3.3.1	Células HeLa	25
	3.3.2	Células Sf9	
	3.3.3	Células HighFive	
3.4	Extr	ação de DNA Total de Baculovírus Recombinantes Suspensos em M	eio TC-
	100.	, I	25
3.5	Extr	ação de RNA Total de Células Eucarióticas e Síntese de cDNA	
36 Construção dos Vetores de Expressão 1		strução dos Vetores de Expressão Heteróloga de Proteínas Recombin	antes 26
	3.6.1	Extração ou Mini-preparação de DNA Plasmidial por Lise Alcalina (Mini	iprep)27
	3.6.2	Amplificação do cDNA por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação	em Cadeia da
		Polimerase)	
	3.6.3	Sequenciamento de DNA	
	3.6.4	Digestões de DNA com Endonucleases de Restrição	
	3.6.5	Ligação de DNA	
	3.6.6	PCR de Colônia	
	3.6.7	Eletroforese em Gel de Agarose	
	3.6.8	Estratégias de Construção dos Vetores de Expressão Heteróloga	
3.7	Nest	ed PCR (Nested Polymerase Chain Reaction) Empregado na Detecçã	ão de
	Nov	os mRNAs de S6K1.	
3.8	Elet	roforese Desnaturante de Proteínas	

3.8.1	SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de Dodecil Sulfato d
387	SDS Triging PACE (Eletroforese am Col de Poliogrilamide no Presence de Trigine a
3.0.2	Dodacil Sulfato da Sódio)
30 Was	tern blotting (Wastern Blot)
2.10 Eve	tern bioliting (western biol)
2.10 EXP	Essao de Proteinas Recombinantes em <i>E. cou</i> e Celulas de Inselo
5.10.1 2.10.2	Expressão em <i>E. coll</i>
2.10.2	Cumização Madiada por Deculovírus em Cálulas SP a <i>HighEi</i> us
5.10.5 2.11 Aná	Expressão Mediada por Baculovilus em Celulas 5/9 e High Five
5.11 Ana	nse <i>In vitro</i> da Interação entre Proteinas Recombinantes por Co-purnicação
em	cromatografia de Afinidade por Glutationa (GSI Pull-down)
3.12 Puri	ticação de Proteínas Recombinantes
3.12.1	Purificação de Proteínas Fusionadas a Polihistidina por Cromatografia de Afinidade
	por Cátion Níquel Imobilizado
3.12.2	Purificação de His <sub>6</sub> -S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His <sub>6</sub> -CDPDPK1 por Cromatografia de Troc
	Catiônica em Coluna de Heparina
3.12.3	Purificação Parcial de His <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6 e His <sub>6</sub> -Proteína D-CysCTRPS6 a
	partir de Corpos de Inclusão e Renaturação In Vitro
3.12.4	Purificação de CTRPS6 e CysCTRPS6 por Cromatografia de Troca Catiônica em
	Coluna HiTrap SP HP
3.12.5	Purificação de Proteínas Fusionadas a GST por Cromatografia de Afinidade por
	Glutationa
3.13 Dete	erminação da Concentração de Proteínas Solúveis Totais pelo Método do
Ácio	lo Bicinconínico (BCA)56
3.13.1	Construção da Curva Padrão
3.13.2	Preparo do Reagente de Trabalho
3.13.3	Procedimento
3.14 Aná	lise de CTRPS6, CysCTRPS6 e His <sub>6</sub> -CDPDPK1 por Espectroscopia de
Dici	oísmo Circular58
3.15 Ensa	aio em Micro-escala para Determinação das Condições Ótimas de Clivagem
de H	lis <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6 com a Protease TEV e Ensaio em Grande Volume 58
3.16 Trip	sinização de Proteínas em Gel de SDS-PAGE para Análise por
Esne	ectrometria de Massas (MS) 58
217 Aná	lise de CTPDS6 CysCTPDS6 His, CDDDDK1 e His, S6K1a2T380FACT
J.17 Alla	$\sum_{i=1}^{n} \sum_{j=1}^{n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{i=1}^{n} \sum_{i$
por	
3.18 Mic	ro-ensaio Colorimetrico de Atividade de His $_6$ -S6K1 $\alpha$ 21389E $\Delta$ C1
(Imi	inoensaio Enzimático)
3.18.1	Soluções Empregadas no Ensaio
3.18.2	Procedimento
A RESULT	TADOS
4.1 Clor	agem do cDNA da S6K1 e Análise das Variantes de mRNAs amplificados
das	Bibliotecas de cDNA e de Células HeLa69

4.2	.2 Expressão em <i>E. coli</i> e Purificação de Proteínas Heterólogas		
	4.2.1	Testes de Expressão de GST-S6K1α1-His <sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT	72
	4.2.2	Testes de Purificação de GST-S6K1α1-His <sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT	76
	4.2.3	Testes de Expressão de His <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6, His <sub>6</sub> -Proteína D-CysCT GST-CTRPS6	RPS6 e 79
	4.2.4	Testes de Purificação de His <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6. His <sub>6</sub> -Proteína D-CvsC	TRPS6 e
		GST-CTRPS6	
	4.2.5	Obtenção e Caracterização de CTRPS6 e CysCTRPS6	
4.3	Expr	essão Heteróloga em Células de Inseto, Purificação e Caracterização	das
	Prote	eínas Recombinantes His <sub>6</sub> -S6K1α2T389EΔCT e His <sub>6</sub> -CDPDPK1	97
4.4	Anál	ise In Vitro da Interação entre as Construções de S6K1 e TIPRL1, $\alpha$ 4	
	Isofo	ormas Maior e Menor de PP2A <sub>C</sub> $\alpha$ ( <i>GST Pull-down</i> )	
4.5	Micr	o-ensaio Colorimétrico de Atividade de His <sub>6</sub> -S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT	
	(Imu	noensaio Enzimático)	
<b>5</b> D		a i o	117
5 D.	ISCUS	SAO	11/
5.1	Pesq	uisa de mRNAs de novas Isoformas de S6K1em Células HeLa	117
5.2	Expr	ressão em E. coli e Purificação de Proteínas Heterólogas	119
	5.2.1	Testes de Expressão de GST-S6K1α1-His <sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT	119
	5.2.2	Testes de Purificação de GST-S6K1α1-His <sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT	
	5.2.3	Testes de Expressão de His <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6, His <sub>6</sub> -Proteína D-CysCT	RPS6 e
		GST-CTRPS6	
	5.2.4	Testes de Purificação de His <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6, His <sub>6</sub> -Proteína D-CysC	TRPS6 e
		GST-CTRPS6	
	5.2.5	Obtenção e Caracterização de CTRPS6 e CysCTRPS6	122
5.3	Expr	ressão Heteróloga em Células de Inseto, Purificação e Caracterização	das
	Prote	eínas Recombinantes His <sub>6</sub> -S6K1α2T389EΔCT e His <sub>6</sub> -CDPDPK1	
5.4	Anál	ise In Vitro da Interação entre as Construções de S6K1 e TIPRL1, α4	,
	Isofo	ormas Maior e Menor de PP2A <sub>C</sub> α (GST Pull-down)	
5.5	Micr	o-ensaio Colorimétrico de Atividade de His <sub>6</sub> -S6K1α2T389EΔCT	
	(Imu	noensaio Enzimático)	
CON	CLUS	ÃO	130
PERS	SPECT	IVAS	132
REFI	ERÊNC	CIAS	133

#### **RESUMO**

A quinase de 70 kDa da proteína ribossomal S6, isoforma 1 (S6K1), é uma fosfoproteína implicada na regulação de genes relacionados ao controle da tradução em mamíferos e possui uma forma nuclear ( $\alpha$ 1) e uma citoplasmática ( $\alpha$ 2). A fosforilação do seu principal alvo, a proteína RPS6, tem sido comumente associada ao recrutamento seletivo dos 5'-TOP (5' *tract of oligopyrimidine*) mRNAs pela maquinaria de tradução, embora haja estudos contrariando esta hipótese. Devido às funções de seus demais alvos, S6K1 tem sido implicada na sobrevivência celular e em diversos outros processos, como crescimento, câncer e resistência à insulina. S6K1 é ativada por um mecanismo que envolve fosforilação seqüencial através da ativação das vias mTORC1 (complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos) e PI3K (fosfoinositol-3 quinase). Como uma quinase da família AGC, S6K1 deve ser fosforilada por mTORC1 no resíduo Thr<sub>389</sub> do domínio hidrofóbico e, em seguida, por PDPK1 (proteína quinase 1 dependente de fosfoinositol) no resíduo Thr<sub>229</sub> da alça T do domínio catalítico. Estes eventos ocorrem somente após a fosforilação em diversos sítios do domínio auto-inibitório carboxiterminal, por mTORC1.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um ensaio modelo para análise da função da S6K1 *in vitro* e utilizá-lo como ferramenta na elucidação do papel de proteínas adaptadoras da via de mTOR em interações com a S6K1. Para isso foi necessário produzir as proteínas recombinantes para ensaios de interação e para realização de um ensaio de atividade para a S6K1. Foram testados vários sistemas de expressão para *Escherichia coli* para produção das construções GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub>, GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (forma  $\alpha$ 2 de S6K1 com a substituição T389E e o carboxiterminal truncado), GST-PDPK1 e GST-CDPDPK1 (domínio catalítico de PDPK1 fusionado a GST). A expressão das formas truncadas de S6K1 e PDPK1 foi mais eficiente em *E. coli*. Embora o rendimento tenha ficado muito aquém do esperado, foi suficiente para os ensaios de interação *in vitro*. Também foi feita a expressão em *E. coli* da região C-terminal da proteína RPS6, que é o substrato da S6K1, em fusão com a proteína D do fago  $\lambda$ . Posteriormente, foram montados sistemas de expressão das construções His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 em células de inseto, a partir de vetor de baculovírus. Constatou-se que essas construções são expressas na forma de fosfoproteínas em células de inseto.

Ensaios de GST *pull-down* com GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT contra as duas isoformas da subunidade catalítica da PP2A<sub>C</sub>, His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor), revelaram que His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) não interage com GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub>, embora interaja

fortemente com GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. Já a construção His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) interage fracamente com as construções GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. Tomados em conjunto, os resultados sugerem que a presença do C-terminal não fosforilado de S6K1 $\alpha$ 2 impede a interação com PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior). PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) comporta-se de forma completamente diferente da isoforma maior, pois a interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) e S6K1 $\alpha$ 2 parece ser independente do carboxiterminal da quinase, visto que as quantidades de S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e de S6K1 $\alpha$ 2 inteira que interagem com PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) são semelhantes. Esses resultados necessitam ainda serem confirmados *in vivo*. Outros experimentos de GST *pull-down* confirmaram que as construções de S6K1 não interagem com  $\alpha$ 4, embora interajam com TIPRL1. Se confirmado *in vivo*, esse resultado compõe um novo quadro na regulação coordenada entre mTOR1 e PP2A, do qual TIPRL1 parece participar.

As construções genéticas e os sistemas de expressão gerados neste trabalho possibilitaram a obtenção dos reagentes necessários para analisar o mecanismo de regulação da quinase S6K1, mediado por proteínas regulatórias. Permitem também desenvolver uma série de experimentos, como busca de inibidores específicos para a S6K1, que dependem da reconstituição de ensaios de atividade *in vitro* com a S6K1 ativada. Contudo, o ensaio de atividade realizado não apresentou resultados satisfatórios e precisa ser desenvolvido.

#### ABSTRACT

The 70kDa ribosomal S6 protein kinase 1 (S6K1) is a phosphoprotein involved in the regulation of genes related to translational control in mammals. S6K1 shows distinct nuclear ( $\alpha$ 1) and cytoplasmic ( $\alpha$ 2) forms. Phosphorylation of the S6K1 best characterized target, the protein of the small ribosomal subunit (RPS6), has been generally associated to the selective recruitment of the 5'-TOP mRNAs (5' tract of oligopyrimidine) by the translational machinery, although there is still some controversy on this issue. Due to the function of its targets, S6K1 has been implicated in several cellular processes including cell growth, cancer and insulin resistance. S6K1 is activated by a mechanism of sequential phosphorylation following activation of the mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) and PI3K (phosphoinositide-3-kinase) pathways. As a kinase of the AGC family, S6K1 activation requires mTORC1 phosphorylation of residue Thr389 of the hydrophobic domain followed by PDPK1 (phosphoinositide dependent protein kinase 1) phosphorylation of residue Thr229 at the T loop of the catalytic domain. These take place only after phosphorylation by mTORC1 of several residues of the autoinhibitory C-terminal domain.

The objective of this work was to develop an assay to analyze the function of S6K1 in vitro and use it as a tool in the discovering of the functions of regulators proteins of the mTOR cascade in interactions with S6K1. For these purposes, expression systems were constructed to produce the various recombinant proteins to be used in the interaction and activity assays. Several genetic constructions were tested in *Escherichia coli* for the production of GST-S6K1a1-His<sub>6</sub>, GST-S6K1a2-His<sub>6</sub> and GST-S6K1a2T389EACT (a2 form of S6K1 with the T389E substitution and truncated carboxiterminus), GST-PDPK1 and GST-CDPDPK1 (GST fusion protein of the catalytic domain of PDPK1). The truncated forms were expressed more efficiently in *E. coli*. Although the yield in *E. coli* was lower than expected, it was sufficient to perform interaction assays. The Cterminal domain of RPS6, a substrate for S6K1, was successfully expressed in *E. coli* as a fusion protein with the phage  $\lambda$  protein D. Subsequently, expression systems for production of His<sub>6</sub>-S6K1a2T389EACT and His<sub>6</sub>-CDPDPK1 in insect cells were constructed using baculovirus vectors. It was found that these constructs are expressed in the form of phosphoproteins in insect cells.

GST pull-down assays using GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT to test interaction with the PP2A<sub>C</sub> isoforms His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (major) and His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (minor) revealed that His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (major) does not interact with GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub>, although it interacts strongly with GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. On the other hand, His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (minor) interacts weakly with both GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. On the other hand, His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (minor) interacts weakly with both GST- S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> and GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. This finding suggests that the unphosphorylated Cterminal of S6K1 $\alpha$ 2 inhibits interaction with PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (major). His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (minor) behaves differently form His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (major). Its interaction with S6K1 $\alpha$ 2 seems to be independent of the C-terminal since the amounts of S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT and S6K1 $\alpha$ 2 that interact with His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (minor) are similar. Future work *in vivo* is required to confirm these results. GST pull-down assays confirmed that  $\alpha$ 4 does not interact with the constructions of S6K1, while TIPRL1 interacts with them. If confirmed in vivo, these results provides a new perspective for the coordinated regulation between mTOR1 and PP2A, which apparently involves also TIPRL1.

The genetic constructions and expression systems established in this work allow the production of the reagents required to study the mechanism of S6K1 regulation mediated by adaptor proteins. They will also allow the development of experiments such as screening for specific S6K1 inhibitors, which depend on reconstitution of S6K1 activity assays using activated S6K1. Nevertheless, the activity assay performed did not yield satisfactory outcomes and must be improved.

## 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 A Via de mTOR1 ou Via de Sinalização Sensível à Rapamicina (VSSR)

A rapamicina é uma lactona antifúngica produzida pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, isolada de uma amostra de solo proveniente da ilha de Rapa Nui. Descobriu-se que essa substância inibe o crescimento de células de mamíferos e possui atividade imunossupressiva (revisado em Wullschleger *et al.*, 2006). Em *S. cerevisae*, a referida lactona requer um cofator intracelular para exercer toxicidade, FKBP12 (*FK560-binding protein*). O complexo FKBP12-rapamicina liga-se à quinase TOR1 (*target of rapamycin 1*), inibindo-a (Heitman *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996). TOR1 é conservada entre todos os eucariontes e seu ortólogo mamífero é chamado de mTOR1 (*mammalian target of rapamycin 1*, ~280 kDa; Crespo & Hall, 2002; Lee *et al.*, 2005; Crespo *et al.*, 2005), pertencente à família das quinases relacionadas à família das fosfatidilinositol quinases (PIKK). Essas enzimas contêm o domínio de serina/treonina quinase no C-terminal. No N-terminal de mTOR1 encontra-se o domínio de ligação ao complexo FKBP12-rapamicina. Esta quinase somente é funcional *in vivo* quando complexada com outras duas proteínas, Raptor (*regulatory associated protein of TOR*) e mLST8 (*mammalian LST8*), constituindo o mTORC1 (*mammalian TOR complex 1*; Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Loewith *et al.*, 2002). A desorganização desse complexo mimetiza o tratamento com rapamicina (Loewith *et al.*, 2002).

A VSSR responde à presença de nutrientes e a fatores de crescimento semelhantes à insulina. A via de sinalização de mTOR1 compreende a via da PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*). mTOR1 é ligada à via da PI3K através das proteínas da esclerose tuberosa, TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina), que formam um dímero responsável por regular mTOR1 negativamente (revisado em Manning, 2004). Quando as condições de crescimento são favoráveis, mTOR1 está ativa e as células fomentam a iniciação da tradução (por meio da fosforilação e inativação do repressor 4E-BP1 e fosforilação de S6K1; Brunn *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998) e a biogênese de ribossomos – o anabolismo é favorecido em detrimento do catabolismo. mTOR1 também regula o crescimento celular (em volume) e está implicada no avanço do ciclo celular (revisado em Hay & Sonenberg, 2004). As moléculas sinalizadoras à jusante e à montante de mTORC1 estão frequentemente alteradas em número nos tumores humanos. Especificamente, a atividade aberrante de mTORC1 parece ser a causa maior de diversos tipos de cânceres e síndromes de hamartomas (Inoki *et al.*, 2005; Tee & Blenis, 2005).

#### 1.2 α4 e Regulação de PP2A na Via de Sinalização Sensível à Rapamicina (VSSR)

A família das proteínas fosfatases específicas de fosfo-serina e fosfo-treonina possui diversos membros, como as fosfatases 1, 2A, 2B (também chamada de calcineurina), 2C, 3, 4, 5, 6, 7 e, possivelmente, muitos outros membros ainda poderão ser descobertos (Cohen, 1997; Zolnierowicz & Bollen, 2000). Várias dessas enzimas estão relacionadas ao controle do ciclo celular e a mais bem estudada dentre elas é a PP2A (protein phosphatase 2A; Shönthal, 2001). Esta proteína fosfatase é um heterotrímero composto pelas subunidades C (PP2A<sub>C</sub>, catalítica), A (PP2A<sub>A</sub>, estrutural, auxilia na ancoragem das demais subunidades) e B (PP2A<sub>B</sub>, reguladora, confere especificidade pelo substrato e determina a localização intracelular do heteromultímero; Mumby & Walter, 1993; Wera & Hemmings, 1995; Virshup, 2000). As subunidades A e C existem em apenas duas isoformas (α e β), enquanto há quatro famílias não relacionadas de subunidades B (B, B', B'', B'''), cada uma com diversos membros mutuamente exclusivos na ligação à subunidade A (revisado por Janssens & Goris, 2001). São possíveis mais de 75 combinações diferentes entre essas subunidades, embora não se saiba quais efetivamente existam nas células. Enquanto as subunidades A e C estão presentes em todos os tipos celulares, algumas subunidades B são seletivamente expressas de acordo com o tecido e o estágio de desenvolvimento celular (McCright et al., 1996). As diferentes isoformas das muitas subunidades não realizam funções redundantes (Zhao et al., 1997; Götz et al., 1998).

A complexidade da composição de PP2A justifica a relação dessa enzima com tantas funções celulares diferentes, como o metabolismo, transcrição e tradução, processamento pós-transcricional de RNA (*splicing*), replicação do DNA, desenvolvimento e morfogênese, progressão do ciclo celular e transformação. Portanto, PP2A está submetida a uma complexa e precisa rede de regulação que integra e gerencia todas essas funções. Existem mecanismos covalentes e não-covalentes que contribuem para essa regulação, assim como para a especificidade por substrato, montagem de subunidades e localização subcelular (Shönthal, 2001). Por exemplo, fosforilação reversível e metilação da subunidade catalítica afetam a atividade da fosfatase, indicando que quinases, metil-transferases e metil-esterases fazem parte da rede regulatória de PP2A (Brautigan, 1995; Ogris *et al.*, 1997; Tolstikh, 2000; Wu, 2000). Inibidores termoestáveis (Oliver & Shenolikar, 1998), muitas outras proteínas (Milward *et al.*, 1999; Virshup, 2000), alguns mensageiros secundários lipídicos, a exemplo da ceramida (Dobrowsky *et al.*, 1993), também estão implicados no direcionamento das funções de PP2A. Porém, pouco se sabe sobre a regulação coordenada dessas funções (Shönthal, 2001).

Uma das proteínas capazes de regular a atividade enzimática de PP2A em mamíferos é a fosfoproteína  $\alpha 4$  (Inui *et al.*, 1998; Nanahoshi *et al.*, 1998), que se associa a PP2A<sub>C</sub> (Murata *et al.*, 1997; Inui *et al.*, 1998; Nanahoshi *et al.*, 1999), PP4 e PP6 (Chen *et al.*, 1998; Nanahoshi *et al.*, 1999). É também denominada de IgBP1 (*immunoglobulin binding protein 1*), pois foi descoberta como uma fosfoproteína de 52 kDa (p52) co-precipitada com a proteína Ig $\alpha$  (*immunoglobulin \alpha*) do complexo receptor de antígenos das células B (BCR, <u>*B* cell receptor</u>). Essa interação e o fato de  $\alpha 4$  ser fosforilada em resposta a um ativador da PKC (*protein kinase C*) tornaram-na candidata a componente da via de sinalização celular responsável pela ativação das células B (Kuwahara *et al.*, 1994; Inui, *et al.* 1995). Essa hipótese foi confirmada por Inui *et al.* (2002), que obteve camundongos condicionalmente nocauteados para o gene de  $\alpha 4$ , incapazes de promover a proliferação de células B sob a ação de estimulantes específicos, de realizar a mudança de isotipo, de formar os centros germinais e de promover a hipermutação somática da região varável da cadeia pesada dos anticorpos. O ortólogo humano de  $\alpha 4$  é expresso em diversos tecidos, com maior intensidade no coração, músculo esquelético, pâncreas e tecidos linfóides (Onda *et al.*, 1997).

Em *S. cerevisae* o ortólogo de  $\alpha$ 4 é a fosfoproteína TAP42 (*Two-A <u>associated protein of 42</u> kDa*). A fosforilação de TAP42 é sensível à rapamicina e é impedida em cepas mutantes que expressam TOR1 rapamicina-resistente. Portanto, além de fazer parte da cascata de sinalização de TOR1, TAP42 é diretamente fosforilada por esta quinase. Por conseguinte, TAP42 fosforilada compete com PP2A<sub>A</sub> e PP2A<sub>B</sub> pela ligação com PP2A<sub>C</sub>, mas a TAP42 desfosforilada não pode competir satisfatoriamente. A desfosforilação de TAP42, por sua vez, é mediada pelo próprio complexo heterotrimérico PP2A (Jiang & Broach, 1999). Essas observações são coerentes com o fato da carência nutricional e o tratamento com rapamicina bloquearem a interação entre TAP42 e PP2A<sub>C</sub>, muito provavelmente por meio da desfosforilação de TAP42 (Di Como & Arndt, 1996; Jiang & Broach, 1999).

Ou seja, a VSSR é responsável pela regulação de PP2A em leveduras, por meio de TOR e TAP42. O modelo gerado a partir das evidências citadas acima postula que, na presença de nutrientes, TOR fosforila TAP42, promovendo a sua associação com PP2A<sub>C</sub>. A associação de TAP42 fosforilada com PP2A<sub>C</sub> previne a ligação da subunidade catalítica com PP2A<sub>A</sub> e PP2A<sub>B</sub>, inibindo a desfosforilação dos alvos da fosfatase heterotrimérica. Na ausência de nutrientes ou em células tratadas com rapamicina, TOR1 é inibida, não fosforila TAP42 e ainda sinaliza a desfosforilação das moléculas ativas de TAP42, que perde a capacidade de ligação a PP2A<sub>C</sub>. A

subunidade catalítica fica livre para ligar-se às duas outras que compõem PP2A, reconstituindo o trímero ativo que desfosforilará seu(s) alvo(s) específico(s). Uma vez que a perda de atividade de TOR leva à ativação da fosfatase do tipo 2A, TOR provavelmente sinaliza constitutivamente na presença e é inativado na ausência de nutrientes (revisado por Gingras *et al.*, 2001). À semelhança do que ocorre em leveduras, a interação entre a fosfatase e  $\alpha$ 4 em mamíferos também é inibida por rapamicina (Murata *et al.*, 1997; Inui *et al.*, 1998), sugerindo que a regulação de PP2A também se dá pela VSSR, mais precisamente por mTOR1 e seu efetor  $\alpha$ 4. O modelo proposto para essa regulação em *S. cerevisae* foi, consequentemente, transferido para células de mamíferos (Di Como & Arndt, 1996; Schmidt *et al.*, 1998; Beck & Hall, 1999; Jiang & Broach, 1999) e pode ser visualizado na figura 3.

Além da TAP42, uma segunda proteína está envolvida na regulação de SIT4 (uma fosfatase do tipo 2A) por TOR em *S. cerevisae*, a TIP41 (*TAP42 Interacting Protrein of 41 kDa*). TIP41 inativa (fosforilada) não se liga a TAP42, que fica livre para interagir com SIT4. Essa cascata ocorre quando a célula está em condições ativadoras de TOR, que fosforila TIP41 diretamente. Em condições inibidoras de TOR, TIP41 permanece desfosforilada e ativa, pronta para ligar-se a TAP42. A interação entre TIP41 e TAP42 impede a ligação da última proteína com SIT4, cuja atividade de fosfatase não é prejudicada. Portanto, TIP41 regula SIT4 indiretamente, por meio de TAP42 (Jacinto *et. al*, 2001 e 2003). A ação de TIP41 em leveduras também está demonstrada na figura 3.

Em humanos, a homóloga da TIP41 é denominada de TIPRL (*TIP41, TOR Signaling Pathway Regulator-Like* (*S.cerevisae*)) e é encontrada em duas isoformas. A isoforma 1 possui 272 resíduos e foi identificada como possível ativadora das MAP quinases numa triagem em larga escala (Matsuda *et al.*, 2003). A isoforma 2 possui 178 resíduos e seu cDNA corresponde à sequência MGC3794 obtida pelo programa *Mammalian Gene Collection* (Collins *et al.*, 2002). Segundo Smetana & Zanchin (2007), TIPRL1 interage com PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ , sugerindo uma regulação direta da homóloga humana de TIP41 sobre a subunidade catalítica da fosfatase do tipo 2A (isoforma  $\alpha$ ), ao contrário do que ocorre com os respectivos homólogos em levedura. Além disso, a proteína  $\alpha$ 4 também interage com a PP2A<sub>C</sub> $\alpha$  e o complexo ternário  $\alpha$ 4/PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ /TIPRL1 foi identificado em células K562 tratadas ou não com rapamicina (figura 3), no qual TIPRL1 liga-se à região compreendida entre os resíduos 210 e 309 de PP2A<sub>C</sub>.

#### 1.3 S6K: Regulação por Fosforilação, Desfosforilação e suas Conseqüências.

A quinase S6K (<u>S6 kinase</u>), membro da família AGC de proteínas quinases (Wullschleger *et al.* 2006), é capaz de fosforilar vários substratos, dentre os quais o mais estudado é a proteína S6 da subunidade ribossomal 40S. De fato, a fosforilação de S6 geralmente é um meio eficaz para se verificar a atividade de S6K (Hay & Sonenberg, 2004). Em mamíferos, a atividade desta quinase é realizada por duas isoformas, S6K1 e S6K2, codificadas por dois genes diferentes (Shima *et al.* 1998). A tradução do mRNA de S6K1 pode iniciar-se no primeiro ou no segundo códon de metionina (Grove *et al.*, 1991). No primeiro caso origina-se a forma nuclear S6K1 $\alpha$ 1, que possui um sinal de localização nuclear no aminoterminal e 525 resíduos de aminoácidos. No segundo caso origina-se a forma citoplasmática S6K1 $\alpha$ 2, com 23 resíduos de aminoácidos a menos que  $\alpha$ 1 (Reinhard *et al.*, 1994). Detalhes estruturais de S6K1 podem ser vistos na figura 1.

A ativação de S6K1 é impedida em células com receptor PDGF (*platelet-derived growth factor*) mutante, incapaz de recrutar e ativar PI3K (Chung *et al.*, 1994). O mesmo ocorre em células tratadas com *wortmannin* e LY294002 (Cheatham, 1994; Chung *et al.*, 1994; Brunnn *et al.*, 1996), duas moléculas estruturalmente diversas, permeáveis à membrana plasmática e capazes de inibir PI3K com relativa especificidade (pois também são inibidoras de outras quinases da família PIKK, como mTOR1; Powis *et al.*, 1994; Vlahos *et al.* 1994; Ui *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem que a ativação de S6K1 seja uma conseqüência da cascata de sinalização celular de PI3K o que de fato foi confirmado por Pullen *et al.* (1998), ao demonstrar que a fosforilação e ativação de S6K1 é diretamente efetuada por PDK1 (*3'-phosphoinositide-dependent kinase-1*), que por sua vez é indiretamente ativada por PI3K. Posteriormente, a observação de que células deficientes em PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10*), enzima de ação antagônica a PI3K, apresentam altos níveis de fosforilação de S6K1 (Neshat *et al.*, 2001; Podsypanina *et al.*, 2001) forneceu maior consistência a essa conclusão; assim também a observação de que a superexpressão da forma dominante negativa de p85 (subunidade regulatória de PI3K) inibe a fosforilação de S6K1 induzida por insulina (Sharma *et al.*, 1998; Ucki *et al.*, 2000).



Figura 1 – Composição em domínios, predição de regiões ordenadas e intrinsicamente desordenadas em sua estrutura e estrutura primária de S6K1. (A) Aspectos estruturais da quinase, designados por algarismos romanos: I – sinal de localização nuclear (vermelho em C); II – domínio acídico aminoterminal (amarelo em C); III – domínio catalítico (verde em C); IV – domínio de ligação (azul em C); V – domínio carboxiterminal (cinza em C). Os resíduos evidenciados são os sítios de fosforilação de S6K1 descritos. A região I só está presente na forma nuclear da quinase (p85 ou  $\alpha$ 1), com 525 resíduos de aminoácidos. A forma citoplasmática (p70 ou  $\alpha$ 2) possui 502 resíduos (Jastrzebskik *et al.*, 2007). (B) Diagrama gerado pelo algoritmo *FoldIndex*, que revela as porções desestruturadas das regiões N- e C-terminal. (C) Seqüência aminoacídica de S6K1 com domínios preditos pelo algoritmo *SMART* (<u>http://smart.embl-heidelberg.de/</u>). Na região III (verde) encontra-se o resíduo de treonina fosforilado por PDPK1 (Thr<sub>252</sub> em S6K1 $\alpha$ 1 e Thr<sub>229</sub> em S6K1 $\alpha$ 2), no *loop* de ativação do domínio catalítico. Na região IV (azul) se encontra um resíduo de treonina fosforilado por mTOR1 (Thr<sub>412</sub> em S6K1 $\alpha$ 1 e Thr<sub>389</sub> em S6K1 $\alpha$ 2), no motivo hidrofóbico. Finalmente, o domínio auto-inibitório localiza-se na região V (cinza), onde muitos resíduos são fosforilados por mTOR1 (Ser<sub>434</sub>, Ser<sub>441</sub>, Thr<sub>444</sub>, Ser<sub>447</sub> em S6K1 $\alpha$ 1 e Ser<sub>414</sub>, Ser<sub>418</sub>, Thr<sub>421</sub>, Ser<sub>424</sub> em S6K1 $\alpha$ 2).

A rapamicina também é capaz de obstruir a ativação de S6K1, logo, a via de sinalização de mTOR1 também é requerida para a fosforilação dessa quinase (revisado por Thomas & Hall, 1997). De fato, sabe-se atualmente que Raptor, uma subunidade de mTORC1, serve como molécula adaptadora no recrutamento de substratos de mTOR1. Ela se liga a S6K1 e 4E-BP1 (*eIF4E binding protein 1*), ambos efetores de mTOR1, e é necessária para a fosforilação *in vitro* de 4E-BP1 por mTOR e à fosforilação eficiente de S6K1 (Beugnet *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003; Nojima *et al.*, 2003; Schalm *et al.*, 2003). A associação de Raptor com os efetores de mTOR1 ocorre através do motivo TOS (*TOR signaling*), que está presente na região aminoterminal de S6K1 (Phe-Asp-Ile-Asp-Leu) e carboxiterminal de 4E-BP1 (Phe-Glu-Met-Asp-Ile) e é necessário para a fosforilação *in vivo* dessas proteínas por mTORC1 (Schalm & Blenis, 2002). A rapamicina quebra a interação mTOR/Raptor (Kim *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2004), o que justifica sua ação inibidora sobre a fosforilação de S6K e 4E-BP. De fato, S6K1 é um dos efetores mais bem caracterizados de mTORC1.

Interessantemente, a deleção da região aminoterminal da quinase S6K1 confere resistência à desativação por rapamicina, sem afetar a sensibilidade a wortmannin. Por outro lado, a deleção de ambas as regiões amino e carboxiterminal confere resistência a rapamicina e wortmannin (Dennis et al., 1996; Mahalingam & Templeton, 1996). Portanto, a ativação de S6K1 compreende um mecanismo complexo com mais de uma etapa (Fumagalli & Thomas, 2000). S6K1 requer fosforilação em vários sítios para a sua completa ativação. Após ser fosforilada por mTOR em diversos resíduos de Ser e Thr carboxiterminais (no domínio auto-inibitório), S6K1 requer fosforilação em três sítios para a sua completa ativação. Os resíduos do domínio de ligação Ser<sub>371</sub> e Thr<sub>389</sub> (o último é localizado no motivo hidrofóbico característico de AGC quinases) são fosforilados por mTORC1, enquanto PDPK1 fosforila o sítio Thr229 na alça T do domínio de Ser/Thr quinase de S6K1 (revisado em Wullschleger et al. 2006; Jastrzebskik et al., 2007). A figura 2 mostra uma síntese das cascatas de sinalização que promovem a ativação de S6K1 e um esquema explicativo do mecanismo de ativação dessa quinase em etapas. A quinase S6K2 também é fosforilada e os sítios de fosforilação são conservados entre as duas isoenzimas (revisado por Hay & Sonenberg, 2004). Os resultados obtidos por Pende et al. (2004) em fibroblastos embrionários de camundongo e em vários tecidos adultos sugerem que S6K2 apresenta uma atividade de quinase superior à de S6K1, pois o nível de fosforilação de S6 é menor em camundongos S6K2<sup>-/-</sup> em relação aos S6K1<sup>-/-</sup>.



**Figura 2** – **Mecanismos de ativação de S6K1** *in vivo*. (A) Vias de sinalização envolvidas na regulação da atividade de S6K. As linhas sólidas indicam interações diretas, enquanto as linhas interrompidas indicam interações indiretas. A linha vermelha representa a alça de retroalimentação negativa em resposta à estimulação crônica da via de mTORC1, levando à resistência à insulina (Jastrzebskik *et al.*, 2007). InR, receptor de insulina; GFR, receptor de fator de crescimento. (**B**) Modelo da ativação de S6K1 por fosforilação seqüencial. Passo 1: o aumento da concentração de cálcio citosólico enfraquece a interação entre os domínios aminoterminal e auto-inibitório (carboxiterminal). Passo 2: a fosforilação dos resíduos carboxiterminais Ser<sub>411</sub>, Ser<sub>418</sub>, Thr<sub>421</sub> e Ser<sub>424</sub> por mTOR1 estabiliza a conformação aberta da quinase. Passo 3: Fosforilação do resíduo Thr389 (no motivo hidrofóbico das AGC quinases) por mTOR1. Passo 4: Fosforilação do resíduo Thr<sub>229</sub> (na alça de ativação do domínio catalítico de Ser/Thr quinase) por PDPK1 (modificado de Hannan *et al.*, 2003).

Não apenas a fosforilação tem papel crucial na regulação de S6K1, por meio da via de sinalização sensível à rapamicina (a via de mTOR1). A desfosforilação também é um mecanismo relevante na regulação dessa quinase, pois a inibição de mTOR1 também desencadeia a ativação de fosfatases que atuam sobre efetores a jusante de mTORC1 (revisado em Thomas & Hall, 1997; Gingras et al., 2001; Volarevic & Thomas, 2001; Thomas, 2002; Hay & Sonenberg, 2004). Proteínas fosfatases do tipo 2A participantes da via de sinalização sensível à rapamicina foram identificadas em S. cerevisae (Di Como & Arndt, 1996; Jiang & Broach, 1999) e possuem ortólogos em células de mamíferos. De fato, Ferrari et al. (1993) demonstraram que a PP2A de mamíferos é capaz de desfosforilar S6K1. Posteriormente, foi mostrado que essas duas proteínas interagem em mamíferos e o inibidor de fosfatases caliculina (calyculin) previne a desfosforilação de S6K1 e 4E-BP1 (Westphal et al., 1999; Peterson, 1999). Além disso, a rapamicina causa uma desfosforilação tão dramática em S6K1 (inclusive dos sítios que não são alvos de mTOR), que torna razoável a hipótese da ativação de uma fosfatase em detrimento da desativação de várias quinases. O fato de mTOR fosforilar PP2A diretamente *in vitro* sustenta o modelo em que a fosforilação de PP2A por mTOR previne a desfosforilação de S6K1 e 4E-BP1 (Peterson, 1999). Contudo, em S. cerevisae, TOR regula PP2A indiretamente, por meio de um outro efetor: TAP42. Portanto, é possível que  $\alpha 4$ , o ortólogo mamífero de TAP42, esteja envolvido na desfosforilação de 4E-BP1 e S6K1 (Jacinto & Hall, 2003). Esta hipótese foi reforçada pelo grupo de Yamashita (2005), que comprovou a formação do trímero α4/PP2A<sub>C</sub>/S6K1 em células B ativadas por LPS (lipopolissacarídeos), através de experimentos de co-imunoprecipitação. O mesmo grupo identificou os sítios de ligação de α4 e S6K1 em PP2A<sub>C</sub>, demonstrando que a subunidade catalítica interage com as duas proteínas por meio de diferentes regiões (as posições 19-22 e 150-164 são críticas para a interação com α4 e a região compreendida entre a posição 88 e o aminoterminal é o sítio de ligação de S6K1). Uma sumarização dos mecanismos de desfosforilação (desativação) de S6K1 por PP2A pode ser visualizada na figura 3.



**Figura 3** – **Mecanismos propostos para a desativação de S6K1 em mamíferos superiores.** (A) e (B) Mecanismos derivados da regulação da via de TOR em leveduras (Jacinto *et al.*, 2001) – os nomes entre parênteses correspondem às proteínas homólogas de *S. cerevisae*. Embora as S6 quinases não tenham sido encontradas em levedura, foram colocadas no esquema acima para compor a hipótese de regulação em mamíferos superiores (Gingras, Raught & Sonenberg, 2004). Em (A), a estimulação por nutrientes culmina com a ativação de mTOR1, que fosforila diretamente  $\alpha 4$  (TAP42) e TIPRL (TIP41). Fosforiladas, TIPRL (TIP41) é incapaz de interagir com  $\alpha 4$  (TAP42) e esta é capaz de interagir com a subunidade catalítica de PP2A (PP2A<sub>C</sub>). Isso impede a associação de PP2A<sub>C</sub> com as demais subunidades (PP2A<sub>A</sub> e PP2A<sub>B</sub>) da fosfatase heterotrimérica. O heterotrímero funcional não se forma e S6K1 permanece fosforilada, o que garante o aumento do nível de síntese protéica. Em (B), mTOR é inibida por diferentes causas (ausência de nutrientes, rapamicina ou deleção), culminando na desfosforilação de  $\alpha 4$  (TAP42) e TIPRL (TIP41) pela própria PP2A. Desfosforiladas, essas proteínas interagem entre si e a subunidade catalítica de PP2A fica livre para reconstituir a fosfatase heterotrimérica funcional, que desfosforila e desativa S6K1, provocando queda no nível de síntese protéica. (C) e (D) Complexos protéicos identificados em células de mamíferos por Smetana & Zanchin (2007) e Yamashita *et al.* (2005), respectivamente.

O entendimento dos mecanismos de ativação e desativação de S6K1 pode fornecer esclarecimentos a respeito da regulação dos eventos celulares em que esta quinase está implicada. Muitas evidências relacionam S6K1 ao controle do crescimento celular e ao aumento na taxa de tradução de mRNA (Montagne et al., 1999; Radimerski et al., 2002). O controle de mTORC1 sobre a tradução é efetuado via S6K1 e 4E-BP (Hay & Sonenberg, 2004; Tee & Blenis; 2005). Até o momento, acreditava-se que S6K1 ativada originava um aumento da tradução de um subconjunto de mRNAs denominados de 5'-TOP (terminal oligopyrimidine tract), que possuem um pequeno trecho de 4-14 nucleotídeos adjacente ao cap 5' e correspondem a 15-20% do mRNA celular total. Esses mRNAs codificam exclusivamente componentes da maquinaria de tradução (todas as proteínas ribossomais, fatores de elongação e outros; Meyuhuas & Hornstein, 2000). O recrutamento dos mRNAs 5'-TOP aos ribossomos seria efetuado pela proteína ribossomal S6 fosforilada por S6K1. Contudo, alguns experimentos colocaram em cheque o papel proposto para S6. Por exemplo, a tradução dos 5'-TOP mRNAs é aumentada em resposta a aminoácidos e fatores de crescimento em células tronco embrionárias S6K1<sup>-/-</sup> (Tang et al., 2001; Stolovich et al., 2002). Mesmo a ação de S6K1 na tradução dos mRNAS 5'-TOP também foi questionada após o experimento de Pende et al. (2004), que gerou células tronco e fibroblastos embrionários de camundongo deficientes em S6K1 e S6K2, mas que apresentavam o recrutamento de 5'-TOP mRNAs e eEF1A (eukaryotic translation elongation factor 1A) aos polissomos na mesma intensidade observada em células parentais, após estimulação por soro. Além disso, a tradução desses mRNAs foi sensível à rapamicina. O trabalho do grupo de Pende contrapõe-se ao de Jefferies et al. (1997) e Schwab et al. (1999), que obtiveram mutantes de S6K1 resistentes a rapamicina, nos quais a tradução de 5'-TOP mRNAs também era resistente a rapamicina. Portanto, o controle da tradução e do crescimento celular via S6K1 carece de maiores esclarecimentos.

Outros substratos e/ou proteínas relacionadas podem ser bastante proveitosos na elucidação do controle de S6K1 sobre a tradução. Por exemplo, ainda não se sabe se e como as S6Ks utilizam eEF2K (<u>eucayotic elongation factor 2 kinase</u>) na regulação da tradução (Wang *et al.*, 2001). Outro caso interessante é o de eIF3 (<u>eukaryotic translation initiation factor 3</u>), que atua como proteína de ancoragem para mTORC1 e S6K1 (Holz *et al.*, 2005). Também há o eIF4B (<u>eukaryotic translation initiation factor 4B</u>), uma proteína de ligação ao RNA que estimula as atividades de helicase e ATPase de eIF4A (<u>eukaryotic translation initiation factor 4A</u>; Rogers *et al.*, 2002). eIF4B é fosforilado em resposta a diversos estímulos extracelulares, como soro, insulina e ésteres de forbol

que promovem o crescimento e a proliferação celular (Duncan & Hershey, 1985), sendo requerido também para a ligação da subunidade menor do ribossomo a mRNAs que contém estrutura secundária proeminente (Dmitriev *et al.* 2003). O resíduo Ser422, um dos sítios de fosforilação de eIF4B, é especificamente fosforilado por S6K1 e S6K2 *in vitro* (Raught *et al.*, 2004). Portanto, este fator de iniciação da tradução pode ser o intermediário responsável pelo efeitos das S6Ks sobre a tradução. Devido à função de eIF4B (auxiliar eIF4A no desdobramento da estrutura secundária do mRNA), sugere-se que a fosforilação intensifica a atividade de eIF4B e permite a tradução seletiva de mRNAs com algum nível de estrutura secundária (Manzella *et al.*, 1991).

S6K também pode influenciar a tradução e outros eventos celulares por meio da atuação sobre substratos independentes da maquinaria ribossomal; mais precisamente os da via IRS-PI3K-PDK1-Akt, responsiva à insulina (Harrington et al., 2004; Shah et al., 2004; Um et al., 2004). A disponibilidade de aminoácidos pode inibir a sinalização através dessa via (Tremblay (a) et al., 2005), a não ser na presença de rapamicina, sugerindo que a inibição é mediada por mTOR e seus efetores. Essa conclusão foi apoiada pela descoberta de que a perda de TSC1 e TSC2 (reguladores negativos de mTOR) em fibroblastos embriônicos de rato (MEFs) ou Drosophila inibe fortemente a via de PI3K em resposta à insulina (Manning, 2004). De fato, S6K1 regula IRS (insulin receptor substrate) no nível transcricional e por fosforilação direta, inativando-a (Um et al., 2004). Assim, a ativação contínua de mTOR-S6K1 induz uma alça de retroalimentação negativa que atenua a via de PI3K, por meio da inibição de IRS. Ratos nocauteados para o gene de S6K1 são incapazes de inibir IRS, tornando-se hipersensíveis à insulina, ainda que não se tornem hipoglicêmicos (por terem poucas células β pancreáticas; Um et al., 2004). Portanto, a exposição continuada ao excesso de nutrientes pode levar as células à resistência à insulina. Dessa forma, o mecanismo molecular envolvido é importante para o entendimento de desordens metabólicas como diabetes e obesidade (Wullschleger, 2006), o que é mais uma justificativa para o estudo das funções de S6K1.

#### 1.4 Expressão Heteróloga de S6Ks

A expressão das duas isoformas de S6K humana em sistemas heterólogos é dificilmente encontrada na literatura, em que proliferam os exemplos de expressão em células de mamíferos. Quando encontrados, os exemplos de expressão heteróloga geralmente são realizados em *E. coli* ou linhagens eucarióticas derivadas de *Spodoptera frugiperda* (*Sf*) infectadas por baculovírus

recombinantes. Usualmente são expressas formas truncadas da proteína, que muitas vezes é uma ortóloga de rato (*Rattus novergicus*).

#### 1.4.1 Expressão em *E. coli*

Petritsch et al. (1995), ao estudar o efeito de altas concentrações de nucleotídeos cíclicos sobre a ativação de S6K1, conseguiram expressar uma forma truncada (ortóloga de rato) com os resíduos de aminoácidos 258-469 no vetor pETH-2a de E. coli. Valovka et al. (2003) expressaram as formas truncadas de S6K1 de rato (resíduos 453-525) e de S6K2 humana (resíduos 442-495) no vetor pET23d (a 22°C, com 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> de IPTG em 4 h de indução). Rebholz et al. (2006) citam a expressão da região N-terminal de S6K1 humana em E. coli BLR21 (DE3) com o vetor pET42a. Finalmente, Hou, He & Qi (2007) realizaram a expressão da S6K1 de rato inteira em E. coli BL21 (DE3), fusionada a GST ou a His<sub>6</sub>, no intuito de estudar a regulação dessa quinase pelo complexo Cdk5-p35 (Cyclin-dependent protein kinase 5 associated to p35) em neurônios. Esses exemplos referem-se à produção de formas inativas da quinase (não fosforiladas). Um meio alternativo para a obtenção da forma ativa seria pela co-expressão de S6K1 com uma das suas quinases, notadamente PDPK1, cuja ação sobre S6K1 é o último passo na ativação completa dessa quinase (após fosforilações por mTOR), segundo Leslie, Biondi & Alessi (2001) e Zhang, Shor & Yu (2006). O sistema de expressão poderia ser a *E. coli*, visto que Klein *et al.* (2005) co-expressaram PDPK1 e PKB (Akt) nessa bactéria, obtendo a última enzima fosforilada e ativa, embora com baixo rendimento. Além de ser uma AGC quinase como S6K1, PKB possui uma via de ativação semelhante à de S6K1 (Leslie, Biondi & Alessi, 2001).

#### 1.4.2 Expressão em Células de Inseto

Kozma *et al.* (1993) produziram S6K de rato inteira, ativa, em células *Sf*9. Os autores propuseram que a infecção viral ativou uma via de sinalização endógena de *Sf*9, culminando na fosforilação e ativação de S6K. Balendran *et al.* (1999), Biondi *et al.* (2001), e Keshwani *et al.* (2008) realizaram a expressão da mesma forma truncada de S6K1 $\alpha$ 2, sem o domínio auto-inibitório carboxiterminal (AID; resíduos 399-502). Todos os autores obtiveram níveis satisfatórios de expressão. Keshwani (2008) cita um rendimento de 5 ± 1 mg de proteína recombinante ativa a partir de 4,0x10<sup>8</sup> células *Sf*9. Para tanto, foi preciso transfectar as células *Sf*9 com um vetor bicistrônico portador dos cassetes de expressão das formas truncadas de S6K1 $\alpha$ 2 e PDPK1 (apenas o domínio catalítico). A PDPK1 truncada produzida foi fosforilada durante a co-expressão, o que sugere ativação em células de inseto. A simples expressão da forma truncada de S6K1 $\alpha$ 2 não possibilitou a produção da proteína ativa, embora se tenha obtido 15 ± 1 mg de proteína recombinante inativa a partir de 4x10<sup>8</sup> células *Sf*9. As construções co-expressas eram, exatamente: His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ II( $\Delta$ AID)-T389E (isoforma  $\alpha$ II sem os resíduos 399-502 e a Thr<sub>389</sub>, sítio de mTOR1, mutada para Glu para mimetizar o estado fosforilado) e His<sub>6</sub>-PDK1( $\Delta$ PH) (apenas os resíduos 51-359, isto é, a enzima sem o *pleckstrin homology domain*, PH, de interação com a membrana).

### **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 **Objetivos Gerais**

Os objetivos gerais deste trabalho foram: (1) desenvolver um modelo de ensaio de atividade da S6 quinase (isoforma 1) *in vitro* e (2) utilizá-lo como ferramenta na elucidação do papel de proteínas adaptadoras da via de mTOR em interações com a S6K1.

#### 2.2 **Objetivos Específicos**

Foram eles:

- i. Clonagem dos cDNAs da S6K1, PDPK1, região carboxiterminal da proteína ribossomal S6 (CTRPS6) e variantes;
- ii. Expressão Heteróloga das proteínas humanas S6K1, PDPK1, região carboxiterminal da proteína ribossomal S6 (CTRPS6) e variantes;
- iii. Detecção de interações entre variantes de S6K1 e variantes das seguintes proteínas:
  - isoforma  $\alpha$  da subunidade catalítica da proteína fosfatase 2A (PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ );
  - TIP41, TOR Signaling Pathway Regulator-Like (<u>S.cerevisae</u>) (TIPRL1);
  - α4 ou *immunoglobulin binding protein 1* (IgBP1).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Meios de Cultura, Cepas e Clones de E. coli

Os meios de cultura utilizados e suas composições estão explicitados na tabela 1 abaixo.

Meios de Cultura	Composição
Luria-Bertani (LB) líquido	Extrato de levedura 0,5% m/v; triptona 1% m/v; NaCl 200 mmol.L <sup>-1</sup> ; pH 7,4
Luria-Bertani-ágar solido (LB-ágar)	LB acrescido de bacto-ágar 1,5% m/v
PSI líquido	Extrato de levedura 1% m/v; peptona 1,6% m/v; NaCl 200 mmol.L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 mmol.L <sup>-1</sup> ; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mmol.L <sup>-1</sup> ; pH 7,6
Terrific Broth (TB) líquido	Triptona ou peptona 1,2% m/v; extrato de levedura 2,4% m/v; glicerol 0,4% v/v; $KH_2PO_4$ 0,17 mol.L <sup>-1</sup> e K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,72 mol.L <sup>-1</sup> ; pH 7,2
Super Optimal Broth (SOB) líquido	Triptona ou peptona 2% m/v; extrato de levedura $0,5\%$ m/v; NaCl 10 mmol.L <sup>-1</sup> e KCl 2,5 mmol.L <sup>-1</sup> ; pH 7,0
Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC) liquid	SOB adicionado de glicose 20 mmol.L <sup>-1</sup>

Tabela 1 – Meios de cultura de cepas de E. coli utilizados neste trabalho.

Quando necessário, utilizaram-se diferentes combinações dos antibióticos canamicina, ampicilina (ambos a 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), cloranfenicol e gentamicina (ambos a 20  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) em LB, LB-ágar e TB seletivos.

Para multiplicar os vetores de expressão empregados, utilizou-se a cepa *E. coli* DH5α. Os clones gerados para os testes de expressão heteróloga e purificação, derivados da cepa *E. coli* BL21 (DE3), foram:

- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pBUF5-CTRPS6;
- E. coli BL21 (DE3) pRARE + pBUF5-CysCTRPS6;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pBUF5;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pBUF5-PACT\_M3;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG-S6K1α1;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pGEX-4T1-PDPK1;

- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pGEX-4T1;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG-S6K1α1 + pGEX-4T1-PDPK1;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG + pGEX-4T1;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT;
- E. coli BL21 (DE3) pRARE + pGEX-4T1-CDPDPK1;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1.

Os clones derivados da cepa *E. coli* BL21 (DE3) Δ*sly*D foram:

- *E. coli* BL21 (DE3) Δ*sly*D pRARE + pBUF5-CTRPS6;
- *E. coli* BL21 (DE3) Δ*sly*D pRARE + pBUF5-CysCTRPS6;
- *E. coli* BL21 (DE3) Δ*sly*D pRARE + pBUF5;
- *E. coli* BL21 (DE3) Δ*sly*D pRARE + pBUF5-PACT\_M3;
- *E. coli* BL21 (DE3) Δ*sly*D pRARE + pETG-CTRPS6;
- *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pRARE + pETG.

Os clones derivados da cepa E. coli Arctic Express foram:

- *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α1;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pGEX-4T1-PDPK1;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pGEX-4T1;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α1 + pGEX-4T1-PDPK1;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG + pGEX-4T1;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT;
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pGEX-4T1-CDPDPK1.
- *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1;

Para os experimentos de GST pull-down os clones gerados foram:

- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(maior) + pETG;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(maior) + pETG-S6K1α2T389EΔCT;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(menor) + pETG;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(menor) + pETG-S6K1α2T389EΔCT;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(maior) + pETG-S6K1α2;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(menor) + pETG-S6K1α2;
- *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pPROEX-PP2A<sub>c</sub>α(menor) + pETG-TIPRL1.

Os clones com o vetor pBUF5-PACT\_M3 foram utilizados como controles positivos, pois a proteína recombinante induzida possui massa de 27,1 kDa, semelhante às massas previstas para as construções inseridas em pBUF5-CTRPS6 e pBUF5-CysCTRPS6. Todos os clones derivados da cepa Arctic Express foram produzidos por transformação por choque térmico, com baixo rendimento (2 a 3 colônias) e grande tempo de crescimento (até 36 h). Os clones de BL21 (DE3) e BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  foram obtidos por eletroporação, com rendimento usualmente grande e tempo de crescimento menor (16-24 h). Os clones que contêm vetor sem inserto foram usados como controles dos testes de indução (C.I.). Todos os clones foram estocados em glicerol 60% (v/v) a -80°C, inclusive os da cepa DH5α.

#### 3.2 Transformação de *E. coli*

Os clones produzidos por transformação de bactérias competentes foram triados por PCR de colônia para confirmação da presença do(s) vetor(es). Em seguida, foram inoculados em 5,0 mL de meio LB seletivo, com o antibiótico correspondente à marca de resistência do(s) vetor(es) usado(s) na transformação, a 37°C e 200 rpm por 16 h. A cultura produzida foi usada para isolamento de colônias por estrias compostas em placas de LB-ágar seletivo. Clones isolados dessa maneira foram inoculados em 5,0 ou 10,0 mL de meio LB ou TB líquido seletivo, como descrito acima. Posteriormente, tais culturas foram usadas como pré-inóculo em testes de expressão e purificação, ou centrifugadas a 16000xg por 5 min, à temperatura ambiente, para extração de DNA plasmidial. Os vetores assim obtidos foram submetidos à análise de restrição e seqüenciamento, visando à identificação de cDNAs com a seqüência correta.

#### 3.2.1 Choque Térmico

Preparo de bactérias competentes pelo método de Cloreto de Rubídio (RuCl<sub>2</sub>). Células de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram semeadas em meio LB-ágar e incubadas a 37°C por 16 h. Em seguida, uma colônia foi inoculada em 5,0 mL de meio PSI e incubada sob agitação de 200 rpm a 37°C. Subseqüentemente, esta cultura foi inoculada em 200 mL de meio PSI e incubada sob as mesmas condições, até atingir densidade ótica de aproximadamente 0,6 à 600 nm (DO<sub>600</sub> = 0,6). Em seguida a cultura foi transferida para frascos de centrífuga (previamente resfriados em gelo) e centrifugada a 2000xg, por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspendidas gentilmente em 25 mL do tampão de transformação I (KOH 30 mmol.L<sup>-1</sup>; ácido acético 30 mmol.L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>; RuCl<sub>2</sub> 100 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 15% v/v; pH 5,8), estéril e gelado. A suspensão foi incubada por 15 min no gelo e depois centrifugada a 2000xg, por 15 min a 4°C. As bactérias foram ressuspensas em 8 mL do tampão de transformação II (MOPS 10 mmol.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub> 75 mmol.L<sup>-1</sup>; RuCl<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 15% v/v; pH 7,0), estéril e gelado. Alíquotas de 150  $\mu$ L em tubos de 0,5 mL foram congeladas a -80°C para serem posteriormente utilizadas nas transformações.

**Transformação de bactérias por choque térmico.** Para cada transformação, adicionaram-se 70 μL de célula competente ao microtubo (1,5 mL), onde foi realizada a reação de ligação; a mistura resultante foi incubada em gelo por 30 min. Posteriormente, o microtubo foi incubado a 42°C por 1min30s e re-incubado no gelo por 1 min. Adicionou-se 1 mL de meio LB líquido às células, que foram imediatamente incubadas a 37°C, sob agitação de 200 rpm, por 1 h. A cultura resultante foi centrifugada a 1500xg por 10 min à temperatura ambiente. Após essa etapa, 900 μL do sobrenadante foram descartados e o precipitado plaqueado em meio LB-ágar com Canamicina 50 μg.mL<sup>-1</sup> e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) 40 μg.mL<sup>-1</sup>. A placa foi incubada a 37°C por aproximadamente 16h. As colônias brancas que cresceram foram selecionadas e destinadas à análise e confirmação dos clones. A seleção das colônias brancas deve-se ao fato do vetor de clonagem pCRII possuir, além das marcas de seleção por Canamicina e Ampicilina, o gene da β-galactosidase (*lacZα*) como controle da ligação do inserto. Se o cDNA é ligado ao plasmídio, o gene *lacZα* é interrompido pelo próprio inserto e inativado.

#### 3.2.2 Eletroporação

**Preparo de bactérias competentes para transformação por eletroporação.** Essas bactérias foram preparadas a partir de uma cultura líquida de 1,0 L de meio LB, inoculada com 10 mL de um pré-inóculo fresco. Este fora incubado por 16 h a 37°C, sob agitação de 200 rpm. A cultura foi submetida às mesmas condições de crescimento do pré-inóculo até que atingisse DO<sub>600</sub> de 0,6. Após o período de crescimento, a cultura foi resfriada em banho de gelo durante 15 a 30 min e centrifugada a 1500xg, por 10 min a 4°C, em frasco de centrífuga estéril. O sobrenadante foi descartado, as células sedimentadas foram ressuspendidas em 1,0 L de água deionizada, estéril, gelada e centrifugadas novamente, nas mesmas condições descritas anteriormente. As células foram recuperadas e lavadas com glicerol por duas vezes. Na primeira lavagem, as bactérias foram

ressuspendidas em 20 mL de glicerol 10% v/v gelado e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Na segunda, foram ressuspendidas em 2 a 3 mL de glicerol 10% v/v gelado, para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>. Esta suspensão de células foi dividida em alíquotas de 50 µL em microtubos de 0,5 mL, em banho de gelo, e estocadas a -80°C. Todas as etapas desse protocolo foram realizadas em ambiente estéril.

Transformação por eletroporação. Esse procedimento demanda o uso de equipamentos especiais, um eletroporador e cubetas de metal (Gene Pulser Xcell, da Bio-Rad - Hercules, Califórnia). As cubetas foram previamente preenchidas com etanol 70% v/v por 5 min. Depois, o etanol foi retirado em capela de fluxo laminar, onde as cubetas foram deixada para secar. Todo o procedimento a partir de então foi realizado em capela de fluxo laminar. Posteriormente, as cubetas foram colocadas em banho de gelo até resfriar. De modo semelhante, a alíquota de células competentes foi retirada do estoque a -80°C e incubada em banho de gelo, por 1 min. Rapidamente, 40 µL de suspensão de células foram misturados a 0,3 - 2,0 µL de DNA, de acordo com a concentração do vetor, em microtubo estéril resfriado. Foram realizadas transformações únicas, com apenas um tipo de vetor, além de duplas e triplas. A mistura de DNA e células foi transferida para a cubeta, com cuidado para evitar a formação de bolhas, e a cubeta carregada foi levada em banho de gelo até o eletroporador, onde foi acoplada. O aparelho foi ajsutado para o protocolo de amostras bacterianas, com um pulso de 2500 V. Dado o pulso, o material foi levado em banho de gelo à capela de fluxo laminar, onde foi misturado a 1,0 ml de meio LB, em microtubo estéril. Essa cultura foi incubada a 37°C e 200 rpm por, no mínimo, 1 h. Após o crescimento, 100 – 200 µL de cultura foram plaqueados em LB-ágar seletivo com auxílio de uma alca de Drigalski. Para a cepa Arctic Express, o meio seletivo continha os antibióticos referentes a cada vetor (tabela 5) e gentamicina 20 µg.mL<sup>-1</sup>. Esse antibiótico é necessário à seleção das células de Arctic Express que contêm o plasmídeo responsável pela expressão da chaperonina Cpn60 (Type 1 Chaperonin of 60 kDa) de Oleispira antarctica, bactéria marinha isolada na costa da Antártica (Yakimov, 2003). A placa foi incubada a 37°C por 16h.

#### 3.3 Cultivo de Células Eucarióticas

#### 3.3.1 Células HeLa

As células humanas da linhagem permanente HeLa foram cultivadas em meio mínimo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), obtido da Invitrogen / Gibco (Carlsbad, Califórnia), suplementado com soro fetal bovino 10% v/v, penicilina (100 U.mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), a 37°C em atmosfera úmida com CO<sub>2</sub> 5% v/v.

#### 3.3.2 Células Sf9

As células da linhagem permanente *Sf*9, obtidas do tecido ovariano da pupa de *Spodoptera frugiperda*, foram cultivadas em meios IPL-41 (Invitrogen / Gibco – Carlsbad, Califórnia) ou TC-100 (Cultilab – Campinas, São Paulo) suplementados com soro fetal bovino 10% v/v, penicilina (100 U.mL<sup>-1</sup>), estreptomicina (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), triptose 10% v/v e L-Glutamina 1% v/v, os dois últimos componentes adicionados apenas ao meio IPL-41. O cultivo foi realizado em atmosfera úmida a 27°C.

#### 3.3.3 Células *HighFive*

As células de inseto da linhagem permanente *HighFive* (obtida da Invitrogen – Carlsbad, Califórnia), derivadas de homogenatos de ovócitos de *Trichoplusia ni*, foram cultivadas em meio *Express Five* (Invitrogen / Gibco – Carlsbad, Califórnia) suplementado com L-Glutamina 10% v/v, penicilina (100 U.mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (100 U.mL<sup>-1</sup>). O cultivo em garrafas era realizado em câmaras a 37°C, em atmosfera úmida. O cultivo em suspensão era realizado em erlenmeyers, sob agitação de 135 rpm, nas mesmas condições de temperatura e umidade.

#### 3.4 Extração de DNA Total de Baculovírus Recombinantes Suspensos em Meio TC-100

Uma alíquota de 100  $\mu$ L de suspensão de baculovírus em meio TC-100 foi gentilmente misturada a 1,0 mL de *DNAzol Reagent* (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia) à temperatura ambiente. Em seguida, essa mistura foi adicionada de 0,5 mL de etanol absoluto gelado e estocada a -20°C por, no mínimo, 20 min. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 12000xg por 10 min, a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e 1,0 mL de etanol 70% gelado foi adicionado ao tubo (o precipitado não era visível a olho nu), que foi homogenizado por inversão de 3 a 6 vezes e centrifugado a  $12000_x$ g e 4°C por 5 min. O sobrenandante foi novamente descartado e o precipitado final seco sobre a bancada, à temperatura ambiente, por 20 a 30 min no máximo, para evitar secagem excessiva. Por fim, o precipitado (dsDNA circular do baculovírus) foi ressuspenso em 20 µL de água deionizada, filtrada e autoclavada.

#### 3.5 Extração de RNA Total de Células Eucarióticas e Síntese de cDNA

Aproximadamente,  $3_x 10^6$  células foram coletadas a partir de culturas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> com ~80% de confluência, 24 h após a troca de meio. As células foram sedimentadas a 500xg por 5 min à temperatura ambiente e a massa celular foi ressupendida em 1,0 mL de *TRIzol Reagent* (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia). Realizou-se a extração de RNA total de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e o grau de pureza do RNA extraído foram determinados por análise espectrofotométrica a 260 e 280 nm (Sambrook *et al.*, 1989). O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total com a enzima M-MLV RT e demais suprimentos obtidos da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia). As reações foram feitas em 20 µL, contendo 0,5 µL de dNTPs (10 mmol.L<sup>-1</sup>), 2,0 µL de oligo dT (5 pmol.L<sup>-1</sup>), 2,0 µL de RNA total (500 ng.µL<sup>-1</sup>), 4,0 µL de tampão (5x), 2,0 µL de DTT (0,1 mmol.L<sup>-1</sup>), 1,0 µL de *RNase OUT*, 1,0 µL de M-MLV RT e 7,5 µL de água deionizada autoclavada. Inicialmente foram misturados dNTPs, oligo dT, água e RNA, e a mistura foi incubada a 65°C por 10 min. Em seguida as reações foram transferidas para o gelo por 1 min. Depois foram adicionados os demais reagentes, homogeneizados na mistura a cada adição. As reações foram incubadas a 37°C por 1 h e inativadas por 15 min a 70°C.

# **3.6** Construção dos Vetores de Expressão Heteróloga de Proteínas Recombinantes

Foram construídos os clones de S6K1 $\alpha$ 1, S6K1 $\alpha$ 2, PDPK1, S6K1 $\alpha$ 2 com o carboxiterminal truncado e a substituição T389E (S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT), domínio catalítico de PDPK1 (CDPDPK1), C-terminal da proteína ribossomal S6 ou RPS6 (CTRPS6) e C-terminal de RPS6 acrescido de um resíduo de cisteína aminoterminal (CysCTRPS6). As etapas da construção e os métodos efetuados estão descritos abaixo (maiores detalhes de cada construção podem ser vistos na tabela 5). Os vetores pPROEX-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior), pPROEX-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) e os *primers* que flanqueiam os

cDNAs das duas isoformas de PP2A<sub>C</sub> foram gentilmente cedidos pela Dra. Juliana Helena Costa Smetana, do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CeBiME), associado à Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS).

#### **3.6.1** Extração ou Mini-preparação de DNA Plasmidial por Lise Alcalina (*Miniprep*)

As culturas de 3-5 mL de LB foram centrifugadas e ressuspendidas em 100  $\mu$ L da solução GET (Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>; EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup>; Glicose 50 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) e adicionadas de 200  $\mu$ L de solução de lise alcalina (SDS 1% m/v; NaOH 0,2 mol.L<sup>-1</sup>), preparada no momento. O homogenato foi misturado por inversão do microtubo, mantido à temperatura ambiente por no máximo 5 min. Imediatamente foram adicionados 150  $\mu$ L de acetato de amônio 7,5 mol.L<sup>-1</sup> ao lisado celular, o conteúdo do microtubo foi vigorosamente misturado por inversão e centrifugado a 16000<sub>x</sub>g por 10 min. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL), ao qual foi adicionado 400  $\mu$ L de isopropanol, e incubado a -20°C para precipitação do DNA. Após 30 min, no mínimo, a solução foi novamente centrifugada a 16000<sub>x</sub>g e 4°C, por 10 min. O precipitado resultante foi lavado com etanol 70% v/v gelado e seco em *SpeedVac Savant* SC 110A (Global Medical Instrumentation – Ramsey, Minnesota) por 5 min. O DNA foi ressuspendido em 50  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>; EDTA 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0); no caso de um vetor de baixo número de cópias seriam apenas 30  $\mu$ L. Os plasmídeos destinados ao seqüenciamento foram purificados com o sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN – Valencia, Califórnia), seguindo as instruções do fornecedor.

# **3.6.2** Amplificação do cDNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase)

Os *primers* desenhados para a amplificação dos cDNAs citados anteriormente e os *primers* utilizados nas reações de sequenciamento estão descritos na tabela 4. Todos foram obtidos da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia). Os *primers* utilizados para isolar os cDNAs de S6K1 $\alpha$ 1, S6K1 $\alpha$ 2 e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foram desenhados a partir da seqüência codificadora de S6K1 humana depositada no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), sob o número de entrada BC053365. Da mesma forma, os *primers* utilizados para isolar os cDNAs de PDPK1 e CDPDPK1 foram desenhados a partir da seqüência codificadora de PDPK1 humana
depositada sob o número BC012103, enquanto os utilizados para amplificar CTRPS6 e CysCTRPS6 foram baseados na seqüência codificadora de RPS6 humana, sob o número BC000524. É importante enfatizar que CysCTRPS6 possui um resíduo de cisteína adicional no N-terminal que não se encontra na seqüência de origem, adicionado pelo *primer* direto ONZ578. Essas seqüências correspondem a clones obtidos no programa *Mammalian Gene Collection* (MGC; Strausberg *et al.*, 2002).

A forma  $\alpha 2$  mutante e truncada de S6K1 (resíduos 1-398) foram primeiramente desenvolvida por Keshwani *et al.* (2008). A mutação T389E, que mimetiza o estado fosforilado por mTOR, foi adicionada pelo *primer* reverso (ONZ 669) empregado na amplificação do fragmento de S6K1 $\alpha 2$ T389E $\Delta$ CT. A região carboxiterminal retirada por truncamento corresponde a um trecho majoritariamente desestruturado da proteína, conforme predição do algoritmo *FoldIndex* (figura 1) e resultados obtidos por Ragan *et al.* (2007). CDPDPK1, por sua vez, corresponde à região compreendida entre os resíduos 51-359 e também foi descrito por Keshwani *et al.* (2008). Já os *primers* para a amplificação de CTRPS6 e CysCTRPS6 foram desenhados para flanquear a maior região de RPS6 com probabilidade satisfatória de apresentar uma estrutura secundária estável, do tipo  $\alpha$ -hélice, de acordo com previsões estruturais realizadas com o algoritmo PSIPRED (Jones, 1999) (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/), visualizadas na figura 4. Essa região se estende do resíduo Leu<sup>185</sup> até o resíduo carboxiterminal Lys<sup>249</sup>, compreendendo 65 resíduos de aminoácidos, e possui os dois sítios de fosforilação por S6K1 (Ser<sup>235</sup> e Ser<sup>236</sup>).

No desenvolvimento dos protocolos de amplificação de cada cDNA foram testadas várias temperaturas de anelamento dos ciclos de PCR e diferentes DNAs molde. A maioria das demais características dos protocolos foi idêntica para todas as amplificações e pode ser vista na tabela 2. Os aspectos específicos de cada protocolo podem ser vistos na tabela 3.

Α



**Figura 4** – **Previsões Estruturais de RPS6.** (A) Previsão de estrutura secundária pelo algoritmo *PSIPRED*. As barras azuis indicam a confiabilidade da previsão para cada resíduo de aminoácido. As setas amarelas indicam folhas- $\beta$  e os cilindros verdes representam  $\alpha$ -hélices. O cilindro mais extenso, da região carboxiterminal, corresponde ao cDNA amplificado. As setas vermelhas delimitam a região clonada. (B) Previsão de regiões estruturadas e desestruturadas pelo algoritmo *FoldIndex*. Note que o carboxiterminal supostamente estruturado, de acordo com a previsão do *PSIPRED*, é eminentemente desestruturado pelo *FoldIndex*.

	Mistura Reacional do PCR	Ciclo Ajustado no Termociclador
Protocolos Gerais de Amplificação	5,0 $\mu$ L de Tampão sem MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup> 1,0 $\mu$ L de dNTPs 10 mmol.L <sup>-12</sup> 1,5 $\mu$ L de MgCl <sub>2</sub> <sup>3</sup> 1,0 $\mu$ L de <i>Platinum Taq</i> <sup>4</sup> 5,0 $\mu$ L <i>primer</i> direto (5 pmol. $\mu$ L <sup>-1</sup> ) 5,0 $\mu$ L <i>primer</i> reverso (5 pmol. $\mu$ L <sup>-1</sup> ) (alíquota de DNA molde) H <sub>2</sub> O deionizada em q.s.p. 50 $\mu$ L	<ul> <li>Temperatura de desnaturação: 95°C, por 1 min;</li> <li>(Temperatura de Anelamento);</li> <li>Temperatura de Extensão: 72°C, por 2 min (1 min no caso de CTRPS6 e CysCTRPS6).</li> </ul>

Tabela 2 – Protocolos gerais aplicados às amplificações de todos os cDNAs.

 <sup>1</sup> 10x PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>), *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.
 <sup>2</sup> Mistura preparada a partir de 100 mM dGTP Solution, 100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP solution, 100 mM dTTP Solution; Invitrogen (Carlsbad, Califórnia).

<sup>3</sup> 50 mM MgCl<sub>2</sub>, *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.

<sup>4</sup> Platinum ® Taq DNA Polymerase, Invitrogen (Carlsbad, Califórnia).

	Temperatura de Anelamento e Tempo de Duração	DNA molde e Volume da Alíquota
S6K1a1	61°C por 2 min	Biblioteca de HeLa <sup>1</sup> , 0,5 μL
S6K1a2	60°C por 2 min	pETG-S6K1α1, 1,0 μl
S6K1α1T389EΔCT	60°C por 2 min	pETG-S6K1α1, 1,0 μl
PDPK1	69°C por 2 min	Biblioteca de Cérebro Fetal Humano <sup>2</sup> 0,5 μL
CDPDPK1	64°C por 2 min	pGEX-4T1-PDPK1 1,0 µL
CTRPS6 e CysCTRPS6	52°C por 2 min	Biblioteca de Cérebro Fetal Humano <sup>2</sup> , 1,0 μL

Tabela 3 – Características específicas dos protocolos de amplificação de cada um dos cDNAs.

<sup>1</sup>Human HeLa Matchmaker cDNA Library, Clontech (Mountain View, Califórnia).

<sup>2</sup> Human Fetal Brain Matchmaker cDNA Library, Clontech (Mountain View, Califórnia).

Após a amplificação, os produtos de PCR desejados foram separados de fragmentos de DNA de outros tamanhos por eletroforese em gel de agarose. A banda de interesse foi purificada com uso do QIAquick Gel Extraction Kit, obtido da QIAGEN (Valencia, Califórnia).

### 3.6.3 Seqüenciamento de DNA

As reações do seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador automático 3130*xl Genectic Analyzer*, gerenciado pelo programa *Foundation data Collection 3.0*, com o uso dos quatro didesoxinucleotídeos terminadores marcados por fluorescência (*Kit Big Dye 3.1*), de acordo com especificações do fabricante. O equipamento, o programa de gerenciamento e o kit com didesoxinucleotídeos terminadores foram obtidos da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia).

**Tabela 4** – *Primers* utilizados nas clonagens, sequenciamento e quantificação dos cDNAs de S6K1α1, S6K1α2, S6K1α2T389EΔCT, PDPK1, CDPDPK1, CTRPS6 e CysCTRPS6. As bases sublinhadas correspondem aos sítios de clivagem das endonucleases de restrição.

Primer	Alvo	Enzima de Restrição	Seqüência
ONZ 379 (direto)	cDNA de PP2A <sub>C</sub> α	EcoRI	5'- <u>GAATTC</u> CATATGGACGAGAAGGTGTTCAC-3'
ONZ 380 (reverso)	cDNA de PP2A <sub>C</sub> α	BamHI	5'- <u>GGATCC</u> TTACAGGAAGTAGTCTGGGGTAC-3'
ONZ 577 (direto)	cDNA de S6K1α1	BamHI	5'- <u>GGATCC</u> ATGAGGCGACGAAGGAGGCGG-3'
ONZ 531 (reverso)	cDNA de S6K1α1	XhoI	5'-CTCGAGTAGATTCATACGCAGGTGCTCTG-3'
ONZ 668 (direto)	cDNA de S6K1α2 e S6K1α2T389EΔCT	BamHI	5'- <u>GGATCC</u> ATGGCAGGAGTGTTTGACATAGA-3'
ONZ 669 (reverso) <sup>1</sup>	cDNA de S6K1α2T389EΔCT	XhoI	5'- <u>CTCGAG</u> TCAACTTTCAAGTACAGATGGAGCCAC ATAT <mark>TC</mark> AAAACCCAGAAAGAC-3'
ONZ 532 (direto)	cDNA de PDPK1	<i>Eco</i> RI	5'-GAATTCATGGCCAGGACCACCAGCCAG-3'
ONZ 533 (reverso)	cDNA de PDPK1	NotI	5'- <u>GCGGCCGC</u> TCACTGCACAGCGGCGTCCG-3'
ONZ 666 (direto)	cDNA de CDPDPK1	EcoRI	5'- <u>GAATTC</u> ATGGACGGCACTGCAGCCGAG-3'
ONZ 667 (reverso)	cDNA de CDPDPK1	NotI	5'- <u>GCGGCCGC</u> TCAGGTGAGCTTCGGAGGCGTCTG-3'
ONZ 538 (direto)	cDNA de CTRPS6	BamHI	5'-CA <u>GGATCC</u> CTGCAGCACAAACGGCGGCGT-3'

<sup>1</sup> As mutações pontuais inseridas por ONZ669 estão indicadas em vermelho na seqüência do primer.Elas promovem a substituição do resíduo de Treonina 389 por um resíduo de Glutamato.

**Tabela 4 (Continuação)** – Primers utilizados nas clonagens, sequenciamento e quantificação dos cDNAs de S6K1α1, S6K1α2, S6K1α2T389EΔCT, PDPK1, CDPDPK1, CTRPS6 e CysCTRPS6. As bases sublinhadas correspondem aos sítios de clivagem das endonucleases de restrição.

Primer	Alvo	Enzima de Restrição	Seqüência
ONZ 539 (reverso)	cDNA de CTRPS6 e CysCTRPS6	XhoI	5'-GACCTCGAGTCATTTCTGACTGGATTCAGACTTAG-3'
ONZ 578 (direto)	cDNA de CysCTRPS6	BamHI	5'- <u>GGATCC</u> TGTCTGCAGCACAAACGGCGGCGT-3'
ONZ 579 (direto)	cDNA de S6K1a1/a2	(primer interno para sequenciamento)	5'-GCAGTTAGAAAGAGAGGGAATAT-3'
ONZ 580 (reverso)	cDNA de S6K1a1/a2	(primer interno para sequenciamento)	5'-AGAGTTGAGTCATCTGGGCTGT-3'
ONZ 581 (direto)	cDNA de PDPK1	(primer interno para sequenciamento)	5'-CTGGCAACCTCCAGAGAATATG -3'
ONZ 582 (reverso)	cDNA de PDPK1	(primer interno para sequenciamento)	5'-TGCATGCAGCCAAACTGGCTCA-3'
M13F (direto)	pCRII	(primer externo para sequenciamento)	5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13R (reverso)	pCRII	(primer externo para sequenciamento)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
GST1 (direto)	pETG pGEX-4T1	(primer externo para sequenciamento)	5'-ATCCTCCAAAATCGGATCTGG-3'
T7 Promotor (direto)	pETG	(primer externo para sequenciamento)	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 Terminal (reverso)	pETG	(primer externo para sequenciamento)	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
Sp6 (reverso)	pGEM-T	(primer externo para sequenciamento)	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
pFast Sense (direto)	pFastBacHT- A/B/C pFastBac Dual	(primer externo para sequenciamento)	5'-TTATTCATACCGTCCCAC-3'
pFast Anti (reverso)	pFastBacHT- A/B/C pFastBac Dual	(primer externo para sequenciamento)	5'-GTGGTATGGCTGATTATG-3'

**Tabela 4 (Continuação)** – Primers utilizados nas clonagens, sequenciamento e quantificação dos cDNAs de S6K1 $\alpha$ 1, S6K1 $\alpha$ 2, S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, PDPK1, CDPDPK1, CTRPS6 e CysCTRPS6. As bases sublinhadas correspondem aos sítios de clivagem das endonucleases de restrição.

Primer	Alvo	Enzima de Restrição	Seqüência
ONZ 749 (direto)	cDNA de EGFP	(primer para qPCR)	5'- TCCGCCCTGAGCAAAGAC-3'
ONZ 750 (reverso)	cDNA de EGFP	(primer para qPCR)	5'-GAACTCCAGCAGGACCATGTG-3'

Os *primers* utilizados no seqüenciamento eram externos, específicos do vetor. Quando o seqüenciamento com *primers* externos não cobria toda a extensão dos clones, eram usados *primers* internos, desenhados especialmente para o seqüenciamento. Dessa forma, o seqüenciamento completo possibilitava a comparação do clone isolado com as seqüências de referência depositadas no banco de dados do NCBI, permitindo a identificação de mutações deletérias e a exclusão desses mutantes.

### 3.6.4 Digestões de DNA com Endonucleases de Restrição

Foram utilizadas até três endonucleases por análise de restrição. As digestões foram analisadas em gel de agarose para verificação do tamanho dos fragmentos produzidos. Todas as digestões, tanto para a análise de restrição quanto para a subclonagem, foram realizadas em conformidade com as especificações dos fabricantes Invitrogen (Carlsbad, Califórnia), Promega (Madison, Wisconsin), New England (Ipswich, Massachusetts) e Fermentas (Burlington, Ontário). Nas análises de restrição, utilizou-se o volume de enzima correspondente a 1 unidade de atividade para 1 µg de DNA, juntamente com 1 µL do tampão 10x específico das enzimas e água deionizada autoclavada em q.s.p. 10 µL. Para linearização de vetores de expressão, utilizou-se a mesma proporção de 1 unidade de enzima:1 µg de DNA, mas com 4,0 µL do tampão 10x específico das enzimas e água deionizada autoclavada em q.s.p. 40 µL.

#### 3.6.5 Ligação de DNA

Para clonar os produtos de PCR foram empregados o *TA Cloning Kit*, da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia), e o *pGEM-T Vector System I*, da Promega (Madison, Wisconsin). As ligações foram

feitas nas proporções vetor:inserto de 1:2 para insertos grandes (superiores a 700 pb) e 1:3 para insertos pequenos (inferiores a 700 pb). As reações de ligação contêm 25 ng de vetor pCRII, 1  $\mu$ L de tampão de ligação 10x (Tris-HCl 60 mmol.L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub> 60 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>; BSA 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>;  $\beta$ -mercaptoetanol 70 mmol.L<sup>-1</sup>; ATP 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; DTT 20 mmol.L<sup>-1</sup> e espermidina 10 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,5), 4,0 unidades Weiss de T4 DNA ligase, inserto e água deionizada autoclavada em q.s.p. 10  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 16°C por 16 a 24 h. Todo o volume das reações de ligação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  por choque térmico.

### 3.6.6 PCR de Colônia

As colônias foram ressuspensas em 20 µL de água deionizada estéril e aquecidas a 95°C por 3 min. A suspensão resultante foi utilizada como DNA molde na reação de PCR (25 µL de volume total). As concentrações dos componentes da mistura e os ciclos do termociclador seguiam as mesmas proporções estabelecidas na tabela 2. Os *primers* utilizados, contudo, podiam ser flanqueadores do cDNA (específicos), externos (do vetor) ou ambos. Os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Quando as bandas obtidas tinham tamanho compatível com o esperado para o cDNA amplificado, os respectivos clones eram seqüenciados e/ou submetidos à análise de restrição.

### 3.6.7 Eletroforese em Gel de Agarose

Foram utilizados géis de agarose em TAE (tampão Tris-HCl 40 mmol.L<sup>-1</sup>, ácido acético 20 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 1,0 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0), em concentração de 0,8 a 2% m/v, com brometo de etídeo 0,005% v/v. Géis de agarose 0,8% foram usados para fragmentos acima e 2% para fragmentos abaixo de 500 pb. As amostras de DNA foram preparadas em tampão de amostra (Ficoll tipo 400 2,5%, azul de bromofenol 0,017% e *Xylene Cyanol* 0,017%). O padrão de massa molecular utilizado foi o *1kb DNA Extension Ladder*, obtido da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia). A voltagem usada na eletroforese era constante e de 2-3 V por centímetro de gel. O sistema de foto-documentação EDAS (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*), da Kodak (Rochester, Nova Iorque), foi utilizado para fotografia e análise de imagens.

### 3.6.8 Estratégias de Construção dos Vetores de Expressão Heteróloga

Os cDNAs de S6K1 $\alpha$ 1, S6K1 $\alpha$ 2, S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, CTRPS6 e CysCTRPS6 foram liberados dos vetores de clonagem pCRII-S6K1 $\alpha$ 1, pCRII-S6K1 $\alpha$ 2, pGEM-T-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, pCRII-CTRPS6 e pCRII-CysCTRPS6 por digestão dupla com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Vetores pETG de expressão em *E. coli* foram digeridos com as mesmas enzimas e ligados aos cDNAs de S6K1 $\alpha$ 1, S6K1 $\alpha$ 2, S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, CTRPS6 e CysCTRPS6. Este vetor possui o cDNA da Glutationa S-transferase (GST) sob o promotor da T7 RNA polimerase, seguido por um sítio da protease TEV e pelo sítio múltiplo de clonagem. É derivado do pET28a(+) da Novagen (San Diego, Califórnia). Os vetores assim construídos codificam proteínas de fusão de GST (aminoterminal) com os polipeptídeos e peptídeos citados, separados pelo sítio de clivagem da protease TEV. Embora tanto o cDNA da isoforma nuclear (S6K1 $\alpha$ 1) quanto o da citoplasmática (S6K1 $\alpha$ 2 e sua construção derivada, S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT) da S6 quinase tenham sido clonados em vetores de expressão, somente os vetores com cDNAs da isoforma citoplasmática foram empregados no decorrer dos experimentos. Essa preferência deveu-se ao escopo do trabalho, que se limita ao estudo da isoforma citoplasmática e de suas interações.

Os cDNAs de CTRPS6 e CysCTRPS6, liberados por digestão dupla com *Bam*HI e *Xho*I, também foram inseridos em vetores pBUF5 previamente digeridos com o mesmo par de enzimas. Este vetor possui o cDNA da Proteína D do fago  $\lambda$  com polihistidina aminoterminal, sob o promotor da T7 RNA polimerase, seguido por um sítio da protease TEV e pelo sítio múltiplo de clonagem. É derivado do pET21a(+) da Novagen. Os vetores assim construídos codificam proteínas de fusão de His<sub>6</sub>-Proteína D (aminoterminal) com os peptídeos citados, separados pelo sítio de clivagem da protease TEV.

Os cDNAs de S6K1 $\alpha$ 1, S6K1 $\alpha$ 2 e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, liberados por digestão dupla com BamHI e XhoI, também foram inseridos em vetores pFastBacHT-B (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia) previamente digeridos com as mesmas enzimas. Os vetores resultantes codificam construções de polihistidina aminoterminal fusionada às proteínas correspondentes (separadas por um sítio de clivagem da protease TEV), para expressão mediada por baculovírus em células de inseto, sob o promotor da poliedrina. Em virtude da estratégia de expressão planejada (subtópico 3.10.3), o vetor pFastBacHT-B-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foi digerido com as enzimas *Rsr*II e *Xho*I para liberação do inserto His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, inserido no vetor pFastBacDual(EGFP) previamente digerido com as enzimas *Rsr*II e *Sal*I. O vetor originado é bicistrônico, com o cDNA de E-GFP

35

(<u>Enhanced Green Fluorescent Protein</u>) sob o promotor da proteína p10 e a construção His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT sob o promotor da poliedrina. O vetor pFastBacDual(EGFP) foi obtido do grupo do pesquisador Dr. Jörg Kobarg, do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CeBiME), associado à ABTLuS (Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron).

Os cDNAs de PDPK1 e CDPDPK1 foram liberados dos vetores de clonagem pCRII-PDPK1 e pGEM-T-CDPDPK1 por digestão dupla com as enzimas *Eco*RI e *Not*I. Vetores pGEX-4T1 (GE Healthcare Life Sciences – Little Chalfont, Buckinghamshire) de expressão em *E. coli* foram digeridos com as mesmas enzimas e ligados aos cDNAs de PDPK1 e CDPDPK1. Este vetor possui o cDNA da GST sob o promotor *tac*, seguido por um sítio da protease trombina e pelo sítio múltiplo de clonagem. Os vetores assim construídos codificam proteínas de fusão de GST (aminoterminal) com os polipeptídios citados, separados pelo sítio de clivagem da trombina.

O cDNA de CDPDPK1, liberado por digestão dupla com *Eco*RI e *Not*I, foi ligado ao vetor pFastBacHT-A (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia) previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando o vetor pFastBacHT-A-CDPDPK1. O cassete de expressão desse vetor codifica a proteína de fusão His<sub>6</sub>-CDPDPK1. O inserto correspondente a essa construção foi retirado do vetor pFastBacHT-A-CDPDPK1 por digestão seqüencial com as enzimas *Rsr*II e *Not*I, e inserido no vetor pFastBacDual(EGFP), sob o promotor da poliedrina.

Os vetores que foram construídos e utilizados para expressão heteróloga neste trabalho estão sumarizados na tabela 5.

**Tabela 5** – Detalhes dos vetores de expressão heteróloga utilizados. Nas construções do vetor pETG há um sítio da protease TEV (-) entre a GST e o cDNA inserido. Nas do vetor pGEX-4T1 há um sítio de trombina (-) entre a GST e o cDNA inserido. Nas do pBUF5 o sítio de TEV (-) fica entre a seqüência da Proteína D e o inserto. Finalmente, nas construções de pFastBacDual(EGFP) o sítio da protease TEV (-) fica entre a polihistidina e o cDNA do inserto.

Vetor de Expressão	Marca de Resistência	cDNA Inserido	Construção	Massa da Construção (kDa)
		S6K1a1	GST-S6K1a1-His <sub>6</sub>	87,1
pETG	Canamicina	S6K1α2	GST-S6K1α2-His <sub>6</sub>	83,0
1		S6K1α2T389EΔCT	<b>GST-</b> S6K1α2T389EΔCT	71,6
		CTRPS6	GST-CTRPS6	34,7
pGEX-4T1	Ampicilina	PDPK1	GST-PDPK1	89,8
		CDPDPK1	GST-CDPDPK1	62,3
pBUF5	Ampicilina	CTRPS6	His <sub>6</sub> -Proteína D-CTRPS6	21,9
		CysCTRPS6	His <sub>6</sub> -Proteína D-CysCTRPS6	22,0
pFastBacDual(EGFP)	Ampicilina Gentamicina	S6K1α2T389EΔCT	His <sub>6</sub> -S6K1α2T389EΔCT	48,0
		CDPDPK1	His <sub>6</sub> -CDPDPK1	41,0

### **3.7** *Nested* PCR (*Nested Polymerase Chain Reaction*) Empregado na Detecção de Novos mRNAs de S6K1.

Este experimento consistiu na realização de duas amplificações sucessivas, de forma que o produto da primeira reação fosse empregado como DNA molde na segunda reação. Na primeira etapa amplificou-se o cDNA de S6K1 com os *primers* ONZ 531 e ONZ 577, conforme protocolo descrito no subtópico 3.6.2. A única exceção a esse protocolo foi o DNA molde utilizado, neste caso, o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de células HeLa (subtópico 3.5). Na segunda etapa foram utilizados os *primers* ONZ579 e ONZ580, também descritos no subtópico 3.6.2, para amplificar um fragmento de DNA contido no cDNA de S6K1. O protocolo geral empregado na realização da segunda etapa está descrito na tabela 6. Em ambas as etapas foram realizados controles negativos (reações destituídas de DNA molde). Na segunda etapa, três controles positivos também foram realizados, a saber:

- amplificação a partir de pETG-S6K1α1, para produção de um *amplicon* de 654 pb. O cDNA contido neste vetor de expressão corresponde à seqüência de mRNA depositada no NCBI sob o número de entrada BC053365;

- amplificação a partir de pCRII-S6K1\_H5, para produção de um *amplicon* de 729 pb. O cDNA contido neste vetor de clonagem corresponde ao cDNA com inserção de 75 pb amplificado a partir da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano obtida da Clontech (Mountain View, Califórnia);

- amplificação a partir de pGEM-T-S6K1\_L, para produção de um *amplicon* de 840 pb. O cDNA contido neste vetor de clonagem corresponde ao cDNA com inserção de 185 pb amplificado a partir da biblioteca de cDNA de células HeLa obtida da Clontech (Mountain View, Califórnia).

	Mistura Reacional do PCR	Ciclo Ajustado no Termociclador
Protocolos Gerais de Amplificação	<ul> <li>5,0 μL de Tampão sem MgCl<sub>2</sub><sup>1</sup></li> <li>1,0 μL de dNTPs 10 mmol.L<sup>-12</sup></li> <li>1,5 μL de MgCl<sub>2</sub><sup>3</sup></li> <li>0,5 μL de Taq polimerase caseira<sup>4</sup></li> <li>2,5 μL ONZ 579 (5 pmol.μL<sup>-1</sup>)</li> <li>2,5 μL ONZ 580 (5 pmol.μL<sup>-1</sup>)</li> <li>0,1 / 0,5 / 1,0 / 2,0 / 3,0 μL de DNA molde<sup>5</sup></li> <li>H<sub>2</sub>O deionizada e autoclavada em q.s.p. 50 μL</li> </ul>	<ul> <li>Temperatura de desnaturação: 95°C, por 1 min;</li> <li>Temperatura de Anelamento: 55°C, por 1 min;</li> <li>Temperatura de Extensão: 72°C, por 1 min 30 s.</li> </ul>

Tabela 6 – Protocolo geral aplicado à amplificação de segunda etapa do Nested PCR.

<sup>1</sup>10x PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>), *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.

<sup>2</sup> *Mistura preparada a partir de* 100 mM dGTP Solution, 100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP solution, 100 mM dTTP Solution; *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.

<sup>3</sup> 50 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen (Carlsbad, Califórnia).

<sup>4</sup> Taq polimerase produzida no próprio Centro de Biologia Molecular Estrutural – CeBiME.

<sup>5</sup> Nos controles positivos utilizaram-se  $0,5 \mu L$  de DNA molde.

### **3.8** Eletroforese Desnaturante de Proteínas

Amostras protéicas eram preparadas pela adição de uma alíquota do tampão de amostra 2x ou 6x (Tris-HCl 300 mmol.L<sup>-1</sup>; SDS 12%; Azul de bromofenol 0,3%; glicerol 60% e 2-mercaptoetanol 6%; pH 6,8) para uma concentração relativa final de 1x em 20 – 30  $\mu$ L (tampão 2x) e em 10 – 18  $\mu$ L

de volume total (tampão 6x). As amostras com tampão eram incubadas por cinco minutos a  $95^{\circ}$ C em aquecedor de microtubos a seco. Após aquecimento, eram submetidas a SDS-Tricine-PAGE (baseada no protocolo descrito por Schägger, 2006) ou SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Era utilizado um padrão de massa molecular preparado no próprio laboratório, formado de IRP-1B (93 kDa), BSA (66 kDa), Tif34 (42 kDa), GST (26 kDa) e SM14 (14 kDa). Também se utilizavam o BenchMark Protein Ladder, o BenchMark Prestained (ambos da Invitrogen - Carlsbad, Califórnia), e o PageRuler (Fermentas – Burlington, Ontário) constituídos de 15 (Invitrogen) e 10 (Fermentas) proteínas recombinantes. Os mini-géis empregados possuíam 10x9x0,05cm e eram constituídos de uma fase de empilhamento (~1,75 mL) e uma de separação (~3,75 mL). Na revelação, os géis eram corados com Coomassie Blue R-250 2% (Sigma - Salt Lake City, Utah) em solução de metanol e água 1:1 e descorados em solução de ácido acético 5% (v/v) e metanol 12,5% (v/v). Alternativamente, eram fixados em solução de metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) e glicerol 2,5% (v/v) por 20 - 60 min, sob agitação, e posteriormente corados com Colloidal Coomassie Blue G-250 0,006% (em solução de etanol 10% (v/v) e ácido fosfórico 8,5% (v/v)) até o aparecimento das bandas. As imagens dos géis eram capturadas em scanner 3800 TWAIN, da Hewlett-Packard (Palo Alto, Califórnia). Para identificar seletivamente bandas de fosfoproteínas, os géis eram corados com Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain (Invitrogen - Carlsbad, Califórnia), conforme instruções do fabricante, e fotografados sobre luz UV em transluminador (sistema EDAS - subtópico 3.6.7). Posteriormente, os mesmos géis eram corados com o corante inespecífico SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen - Carlsbad, Califórnia), conforme instruções do fabricante, e fotografados em transluminador. A comparação entre as fotos do mesmo gel corado com esses dois tampões permite identificar as bandas de fosfoproteína e as de proteína não fosforilada.

# **3.8.1** SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de Dodecil Sulfato de Sódio )

Utilizavam-se mini-géis com uma fase de empilhamento de 5% e uma de separação de 8, 10, 12 ou 15% de poliacrilamida. Na eletroforese era utilizado o tampão de eletrodo (Tris 25 mmol.L<sup>-1</sup>; glicina 250 mmol.L<sup>-1</sup> e SDS 0,1%) e a voltagem fixada em 120 V até o final da corrida. Em seguida, os géis eram corados.

### **3.8.2** SDS-Tricine-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de Tricina e Dodecil Sulfato de Sódio)

Ambas as fases do mini-gel eram preparadas em tampão de gel Tris 1,0 mol.L<sup>-1</sup>; HCl 0,3 mol.L<sup>-1</sup>; SDS 0,1%; pH 8,45. A fase de empilhamento possuía 10% T (a % T corresponde à concentração somatória de acrilamida e bisacrilamida, em massa, em relação ao volume do gel, em porcentagem), glicerol 8% v/v e persulfato de amônio 0,05% m/v. A fase de separação possuía 16% T, uréia 6,0 mol.L<sup>-1</sup> e persulfato de amônio 0,03% m/v. Para a corrida eram utilizados dois tampões de eletrodo, o catodo (Tris-HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; tricina 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; SDS 0,1% m/v; pH 8,25) e o anodo (Tris 0,1 mol.L<sup>-1</sup>; HCl 22,5 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,9). A amperagem era fixada em 50 mA até que o indicador azul de bromofenol ultrapassasse toda a fase de separação (~2 h 30 min). Durante toda a eletroforese a voltagem máxima era limitada a 200 V. Os géis eram colocados em solução fixadora (metanol 50% v/v; ácido acético 10% v/v; 100 mmol.L<sup>-1</sup>) por 1h, sob agitação. Posteriormente, eram corados com *Coomassie Blue* R-250 ou *Colloidal Coomassie Blue* G-250.

### **3.9** Western blotting (Western Blot)

Os géis resultantes de *SDS-PAGE* ou *SDS-Tricine-PAGE*, ao invés de serem fixados e/ou corados, eram montados sobre um aparelho de transferência, o *Trans Blot SD* (célula de transferência semi-seca da Bio-Rad – Hercules, Califórnia). A transferência era feita em tampão Tris-HCl 50,0 mmol.L<sup>-1</sup>; Glicina 40,0 mmol.L<sup>-1</sup>; SDS 0,037% m/v; metanol 20% v/v, com membrana de PVDF (Difluoreto polivinilideno; membrana Immobilon-P da Millipore – Billerica, Massachusetts) previamente ativada em metanol (5 min), a uma corrente fixa de 80 mA por 1 h. O tampão de transferência era embebido em 4 – 5 papéis de filtro Whatman, com as dimensões de um mini-gel, que eram empilhados sobre o anodo do *Trans Blot SD*. Sobre a primeira pilha de papéis de filtro era colocada a membrana de PVDF pré-ativada em metanol, sobre a qual era colocado o gel e sobre este a segunda pilha de papéis de filtro embebidos. Em seguida, a cuba era fechada com o catodo, de forma a pressionar o "sanduíche" do gel sobre o anodo, e a transferência era iniciada nas condições descritas anteriormente. Após essa etapa, a membrana era submetida à coloração com corante de Ponceau (Ponceau S 0,1% m/v em ácido acético 5% v/v) para confirmação da transferência, descorada e incubada em solução bloqueadora (TBS com caseína 3% m/v e Tween 20 0,03% v/v) por 1 h, sob agitação branda, à temperatura ambiente. Em seguida era incubada com a

solução do anticorpo primário (TBS com caseína 3% m/v, Tween 20 0,03% v/v e anticorpo na proporção estabelecida pelo fabricante) por 2 h, sob as mesmas condições ou a 4°C por 16 h. A membrana era lavada com tampão TBS (Tris 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,5) por 10 min, três vezes, nas mesmas condições do bloqueio. Posteriormente, era incubada com a solução do anticorpo secundário anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina (Sigma – Salt Lake City, Utah), nas mesmas condições do bloqueio (a solução do anticorpo secundário é idêntica à do anticorpo primário). Em seguida, era novamente lavada com tampão TBS (3x, 10 min) e incubada em solução reveladora (NBT 0,66% v/v e BCIP 0,33% v/v em tampão de fosfatase alcalina, Tris-HCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub> 5,0 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 9,5) até o aparecimento das bandas, quando era transferida para a solução de parada de reação da fosfatase alcalina (EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup> em TBS). A solução estoque de NBT (*Nitro-Blue Tetrazolium Chloride*) utilizada possuía uma concentração de 5% m/v em dimetilformamida 70% v/v, tal qual a solução de BCIP (*Sal 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolilfosfato p-Toluidina*). A membrana era fotografada com o sistema de foto documentação *Gel Logic 100 Imaging System* da Kodak (Rochester, Nova Iorque) ou sua imagem era capturada em *scanner 3800 TWAIN*, da Hewlett-Packard (Palo Alto, Califórnia).

### 3.10 Expressão de Proteínas Recombinantes em *E. coli* e Células de Inseto

### 3.10.1 Expressão em E. coli

Bactérias competentes foram transformadas por eletroporação ou choque térmico com os vetores de expressão e submetidas a testes de otimização de expressão em pequena escala. Dentre todas as variáveis que podiam ser testadas, basicamente variaram-se a temperatura, o tempo de indução, as cepas de *E. coli*, o meio de cultura, o indutor e as construções de proteínas recombinantes. Uma análise preliminar dos clones obtidos com o algoritmo *Rare Codon Calculator* (http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/) revelou que todos possuíam considerável número de códons raros em *E. coli*. Por essa razão, todas as cepas escolhidas também foram transformadas com o plasmídeo pRARE (com marca de seleção por cloranfenicol), que codifica a maioria dos tRNAs pouco expressos na referida espécie bacteriana.

#### 3.10.2 Otimização da Expressão de Proteínas Recombinantes em E.coli

**Testes de expressão.** Culturas líquidas de 20 a 50 mL (em meio LB ou TB seletivos) eram inoculadas com uma alíquota de pré-inóculo numa proporção pré-inóculo:cultura de 2 a 3% v/v. Logo em seguida a cultura era incubada a 37°C e 200 rpm até atingir uma DO<sub>600</sub> entre 0,6 e 0,8. Neste momento, caso a temperatura de indução testada fosse diferente de 37°C, a cultura era incubada por 15 min a 200 rpm na temperatura de teste. Uma alíquota de 1,5 mL da cultura era coletada, centrifugada (18000xg / 10 min / 4°C) e o precipitado correspondente guardado a -20°C (instante zero da indução). Finalmente, a expressão das proteínas recombinantes era induzida pela adição de IPTG ou lactose à cultura, para uma concentração final de 0,8 mmol.L<sup>-1</sup> e 10,0 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Daí por diante, novas alíquotas de 1,5 mL eram coletadas, centrifugadas e estocadas, em intervalos regulares predeterminados, conforme os tempos de indução testados. O procedimento de preparo e indução das culturas para os testes de expressão é idêntico ao realizado nos testes de purificação, mas com volumes maiores (subtópico 3.12).

**Preparo dos extratos protéicos.** Todo procedimento era realizado em banho de gelo para minimizar perdas por degradação proteolítica e/ou espontânea. As células eram ressuspendidas em 1,0 mL de tampão A (Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup>; EDTA 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; PMSF 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,4) e adicionadas de lisozima para uma concentração final de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>. A suspensão era deixada em banho de gelo por 30 min para garantir a ação da lisozima. As células enzimaticamente tratadas eram mecanicamente lisadas por sonicação a 20 kHz, em sonicador Sonifier 450 (Branson – Danbury, Connecticut), durante 15 s, três vezes (sempre em banho de gelo, para evitar superaquecimento). O lisado celular era centrifugado a 18000xg, 4°C por 10 min e o sobrenadante obtido era o extrato de proteínas solúveis (fração solúvel). O precipitado, por sua vez, era ressuspendido em 0,5 mL de tampão B (tampão A acrescido de Triton X-100 2% v/v) e sonicado por 15 s duas vezes. A solução era centrifugada (idem condições anteriores), o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 50  $\mu$ L de tampão A, originando o extrato de proteínas insolúvei). Esses extratos eram analisados por eletroforese desnaturante e *western blotting*.

### 3.10.3 Expressão Mediada por Baculovírus em Células Sf9 e HighFive

Os métodos utilizados para a expressão de proteínas recombinantes mediada por baculovírus basearam-se no manual do *Bac-to-Bac*® *Baculovirus Expression System* (obtido da Invitrogen – Carlsbad, Califórnia) e são detalhados abaixo.

**Produção do cromossomo artificial de bactéria com o baculovírus recombinante** (*baculovirus shuttle vector* ou bacmídeo). Bactérias da cepa *E. coli* DH10Bac foram transformadas com os vetores pFastBacDual(EGFP)-CDPDPK1 e pFastBacDual(EGFP)-S6K1α2T389EΔCT por choque térmico. Essa cepa de *E. coli* contém o genoma modificado do baculovírus clonado em um cromossomo artificial de bactéria, o bMON14272 (136 kb), que confere resistência à canamicina e complementa a deleção do *lacZ* no cromossomo bacteriano. A cepa também contém o plasmídeo *helper* pMON7124 (13,2 kb), que confere resistência à tetraciclina e codifica uma transposição sítio-específica *in trans* de uma região flanqueada por elementos mini Tn7 (Barry, 1988). O bacmídeo recombinante é gerado pela transposição do cassete de expressão bicistrônico flanqueado pelos elementos Tn7R e Tn7L do vetor doador (pFastBacDual(EGFP)-S6K1α2T389EΔCT e pFastBacDual(EGFP)-CDPDPK1) para o sítio de reconhecimento, mini*att*Tn7, no bacmídeo.

Em uma variação do protocolo de transformação pelo método de choque térmico, essas bactérias foram transformadas em meio SOC e incubadas por 4 h a 37°C após o choque térmico. Em seguida, a cultura foi diluída seriadamente e 100  $\mu$ L das diluições 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> foram semeadas em meio LB sólido contendo canamicina (50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), gentamicina (7  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), tetraciclina (10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), Bluo-gal (100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e IPTG (40  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias brancas foram re-estriadas em novas placas do mesmo meio seletivo e novamente incubadas a 37°C por 24 h, para confirmação dos clones. Os clones positivos foram então cultivados em meio LB líquido com canamicina (50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), gentamicina (7  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e tetraciclina (10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), e submetidos a *miniprep* do sistema *QIAprep Spin Kit*, obtido da QIAGEN (Valencia, Califórnia). Em seguida, o DNA purificado dos clones selecionados foi analisado por PCR (tabela 7) com o *primer* direto M13(-40) (referente ao bacmídeo) e os *primers* reversos ONZ667 (referente a CDPDPK1), ONZ669 (referente a S6K1α2T389EΔCT) ou M13 reverso.

	Mistura Reacional do PCR	Ciclo Ajustado no Termociclador
Protocolos Gerais de Amplificação	2,5 $\mu$ L de Tampão sem MgCl <sub>2</sub> <sup>1</sup> 0,5 $\mu$ L de dNTPs 10 mmol.L <sup>-12</sup> 0,75 $\mu$ L de MgCl <sub>2</sub> <sup>3</sup> 0,25 $\mu$ L de Taq polimerase caseira <sup>4</sup> ou <i>Platinum Taq</i> <sup>5</sup> 1,25 $\mu$ L M13(-40) (5 pmol. $\mu$ L <sup>-1</sup> ) 1,25 $\mu$ L ONZ 667, ONZ 669 ou M13 reverso (5 pmol. $\mu$ L <sup>-1</sup> ) 0,5 $\mu$ L de DNA molde (bacmídeo) H <sub>2</sub> O deionizada e autoclavada em q.s.p. 25 $\mu$ L	<ul> <li>Temperatura de desnaturação: 94°C por 45 s;</li> <li>Temperatura de Anelamento: 55°C por 45 s;</li> <li>Temperatura de Extensão: 72°C por 4 min (CDPDPK1) ou 5 min (S6K1α2T389EΔCT).</li> </ul>

Tabela 7 – Protocolo geral de PCR para identificação de clones positivos de E. coli DH10bac.

<sup>1</sup>10x PCR Rxn Buffer (-MgCl<sub>2</sub>), *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.

<sup>2</sup> Mistura preparada a partir de 100 mM dGTP Solution, 100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP solution, 100 mM dTTP Solution; *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.

<sup>3</sup> 50 mM MgCl<sub>2</sub>, *Invitrogen (Carlsbad, Califórnia)*.

<sup>4</sup> Taq polimerase produzida no próprio Centro de Biologia Molecular Estrutural – CeBiME.

<sup>5</sup> Platinum ® Taq DNA Polymerase, Invitrogen (Carlsbad, Califórnia).

Transfecção de células Sf9 com o vetor do baculovírus recombinante e produção de partículas infectivas portadoras do dsDNA recombinante. Os DNAs do bacmídeo- CDPDPK1 e bacmídeo-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT obtidos por *miniprep* foram utilizados para transfecção de células Sf9. Placas de 6 poços foram semeadas com  $9.0 \times 10^5$  células Sf9/poço em 2,0 mL de meio TC-100 ou IPL-41 e incubadas por 1 hora a 27°C para fixação. Em seguida, foi preparada a mistura do DNA com o Cellfectin Reagent, obtido da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia). Para tal, 1,0 µg do DNA foi diluído em 100 µL de meio sem Soro Fetal Bovino (SFB). Seis microlitros do Cellfectin também foram diluídos em 100 µL de meio sem SFB. As duas misturas foram combinadas, gentilmente homogeneizadas e incubadas à temperatura ambiente por 45 min. Após o período de fixação na placa, as células foram lavadas com 2 mL de meio sem SFB. Posteriormente as células receberam a mistura DNA/Cellfectin (200 µL) e 800 µL de meio sem SFB. As células foram incubadas a 27°C por 5 h. Após este período, a mistura foi removida e as células receberam 2 mL de meio com antibióticos e SFB. A cultura foi incubada por 96 h a 27°C até que a primeira geração de vírus recombinante fosse liberada no meio. Neste ponto, o meio contendo os vírus recombinantes foi coletado e centrifugado a 500xg para eliminar células e "debris". O sobrenadante (~ 2 mL) foi filtrado em membrana Millipore (Billerica, Massachusetts) de 0.22 µm e estocado como geração 1

(P1) do vírus recombinante. Em seguida, P1 foi utilizado para infectar uma nova cultura de células *Sf*9 em garrafa de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> com ~80 % de confluência. A cultura foi incubada a 27°C por 72 h. O meio de cultura foi processado como anteriormente, obtendo-se o P2 (~5 mL), ou seja, a segunda geração de vírus recombinante. Para aumentar o título viral, ainda foi produzido o P3 (3<sup>a</sup> geração), inoculando-se uma alíquota de 50 µL de P2 em uma garrafa de 75 cm<sup>2</sup>. Após 72 h de cultivo, o meio de cultura foi filtrado para estocar o P3 obtido (~12 mL). As gerações virais foram estocadas ao abrigo da luz a 4°C. A partir de então, outras gerações virais podiam ser obtidas a partir de P3, até P10, no máximo. O sucesso da transfecção era verificado pela fluorescência com emissão de luz verde pelas células infectadas, que expressavam a proteína recombinante de interesse e o repórter E-GFP. A fluorescência era visualizada em microscópio *Nikon Eclipse TS 100* obtido da Nikon (Tóquio, Japão).

**Titulação de baculovírus recombinante por PCR quantitativo (qPCR).** As gerações virais produzidas eram tituladas por quantificação absoluta do cDNA de EGFP por qPCR. Utilizava-se o par de *primers* ONZ 749 e ONZ 750 como sonda, desenhado no programa *Primer Express*<sup>®</sup>, versão 3.0. O *SyBrGreen* era empregado como fluoróforo nas reações e o termociclador utilizado era o 7500 *Real Time PCR*. Todos, à exceção dos *primers*, foram obtidos da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia). Uma vez que cada partícula viral possui um único genoma recombinante, no qual está presente uma única cópia do cDNA de EGFP, o número de cópias desse cDNA corresponde ao número de partículas virais em suspensão.

A curva padrão para o método de quantificação absoluta foi preparada a partir da regressão linear simples entre o Ct (*Cycle threshold*, variável dependente) da reação e o número de cópias por reação (variável independente) do vetor pFastBacDual(EGFP). Para tanto, este vetor foi obtido por miniprep do sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN – Valencia, Califórnia) a partir de culturas de 3 a 5 mL (meio LB), na metade da fase log de crescimento (~12 h de crescimento). A concentração ( $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) e a qualidade do vetor foram determinadas por espectrofotometria a 260 e 280 nm, conforme descrito por Sambrook, Fritsch & Maniatis (1989). Somente amostras de boa qualidade (sem contaminação excessiva por fenóis ou proteínas) foram utilizadas. A concentração do vetor foi convertida para número de cópias por meio da fórmula de Morello *et al.* (2007), em que *Cn* é o número de cópias (em número de cópias. $\mu$ L<sup>-1</sup>), *C* é a concentração do vetor (em  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), *bp* é o número de pares de base do vetor e 1,004.10<sup>15</sup> é uma constante derivada do número de Avogadro:

$$Cn = \frac{C}{bp} \times 1,004.\,10^{15}$$

Os pontos da curva padrão foram obtidos por diluição seriada do vetor pFastBacDual(EGFP), a saber:  $1,0_x10^8$ ,  $1,0_x10^7$ ,  $1,0_x10^6$ ,  $1,0_x10^5$  e  $1,0_x10^4$  cópias por reação. Cada ponto foi executado em triplicata. As médias dos valores de Ct para tais pontos foram empregadas na regressão linear e plotadas contra os log(números de cópias) respectivos, como pode ser visualizado na figura 5. A equação de regressão assim obtida foi utilizada para determinar os números de genomas virais em cada reação executada, também em triplicata. Esses números eram corrigidos por fatores de diluição apropriados para obtenção do título viral das suspensões correspondentes.



**Figura 5** – **Regressão linear simples da quantificação absoluta do número de cópias de cDNA de EGFP por qPCR, para titulação de baculovírus recombinante.** Esta curva padrão foi obtida a partir de ensaios em triplicata com as diluições de pFastBacDual(EGFP) descritas no texto.

As reações executadas, seja para a curva padrão ou determinação do título de determinada suspensão de baculovírus, foram preparadas de acordo com o mesmo protocolo, como pode ser observado na tabela 8. O ciclo de amplificação para o método de quantificação absoluta do termociclador 7500 *Real Time PCR* é pré-ajustado de fábrica para todas as reações. Para as titulações, o DNA molde utilizado era obtido conforme descrito no subtópico 3.4.

	Mistura Reacional do qPCR	
Protocolos Gerais de Amplificação	<ul> <li>12,5 μL de SYBR Green PCR Master Mix<sup>1</sup></li> <li>2,0 μL ONZ 749 (5 pmol.μL<sup>-1</sup>)</li> <li>2,0 μL ONZ 750 (5 pmol.μL<sup>-1</sup>)</li> <li>2,0 μL de DNA molde (diluição de pFastBacDual(EGFP) ou genoma de baculovírus recombinante)</li> <li>H<sub>2</sub>O deionizada e autoclavada em q.s.p. 25 μL</li> </ul>	

Tabela 8 – Protocolo geral de qPCR para titulação de baculovírus recombinante.

<sup>1</sup>Obtido da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia).

Otimização da expressão de proteínas recombinantes em células HighFive. Estes experimentos tinham como objetivo a determinação das melhores condições de expressão das proteínas recombinantes em células de inseto. As variáveis testadas foram: a multiplicidade de infecção das células (MDI), ou seja, o número de partículas virais/célula e o tempo de incubação (h). Células HighFive foram semeadas em erlenmeyers contendo 20 mL de meio Express Five (vide subtópico 3.3.3) na densidade de 1,0 x  $10^6$  células.mL<sup>-1</sup> e infectadas com as MDIs de 1, 2, 5 e 10. Cada cultura era independente, pois possuía uma MDI específica e era incubada por um determinado período de tempo (24, 48, 72, 96 h para expressão de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e 24, 48, 60, 72, 84 e 96 h para expressão de His<sub>6</sub>-CDPDPK1). Um grupo dessas culturas não foi infectado (MDI 0) e serviu como controle negativo. Ao fim de cada período de crescimento, as culturas de todas as MDIs foram coletadas e tiveram sua densidade celular determinada. Em seguida,  $1.0 \times 10^7$  células dessas culturas foram submetidas à extração de proteínas. As células foram lavadas em PBS 1X e lisadas com 4 mL de tampão de lise pH 8,0 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 300 mM NaCl; 1% Igepal; 5% glicerol) em banho de gelo, adicionado do coquetel de inibidores de proteases Complete, EDTA-free, obtido da Roche (Basiléia, Suíça). Em seguida as amostras foram submetidas à análise por SDS-PAGE e western blot com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub> produzido em camundongos e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado à fosfatase alcalina (ambos na proporção 1:7000). Esses testes também foram realizados em volumes maiores (culturas de 0,5 L) para ambas as proteínas recombinantes, com MDIs de 2, 3 e 10 e tempos de incubação de 24 e 48 h, seguidos de purificação em coluna de níquel imobilizado. A expressão em grandes volumes está descrita abaixo.

**Expressão de proteínas recombinantes em grandes volumes, mediada por baculovírus em células de inseto.** Células *HighFive* de 3 a 5 garrafas confluentes grandes (25 mL de meio) foram

ressuspensas em meio *Express Five* novo e semeadas em erlenmeyers para um volume final de 100 mL de cultura. Essas culturas foram incubadas por 72 h, sob agitação, conforme descrito no subtópico 3.3.3 (pré-cultura). Ao fim desse período, alíquotas de  $5,0_x10^8$  células foram coletadas da pré-cultura, ressuspensas em ~50 mL de meio novo e adicionadas a erlenmeyers de 2,0 L para um volume final de 0,5 L de cultura (densidade de  $1,0x10^6$  células.mL<sup>-1</sup>). A essas culturas foi adicionada a alíquota de vírus titulado para alcançar a MDI desejada. Saliente-se que os vírus empregados não podiam estar estocados há mais de dois meses a 4°C, devido à acentuada queda do título de partículas infectivas observada durante o armazenamento (e não detectada na titulação por qPCR). Após a inoculação do baculovírus recombinante, a cultura era incubada nas condições ótimas pelo período desejado.

**Preparo dos extratos protéicos de células de inseto.** As células das culturas de 0,5 L foram centrifugadas a 500xg e ~27°C por 15 a 20 min, recuperadas e gentilmente ressuspensas em 500 mL de tampão PBS pH 7,0, para serem novamente centrifugadas nas mesmas condições. As células recuperadas podiam ser estocadas a -80°C ou submetidas diretamente à extração. Se estivessem congeladas, realizava-se o degelo prévio em banho de gelo, por aproximadamente 30 min. Finalmente, as células foram ressuspensas em 100 mL de tampão de extração gelado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>, NaCl 300 mmol.L<sup>-1</sup>, imidazol 10 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 8,0) suplementado na hora do uso com Igepal 1% (v/v). A proporção de volume de tampão de extração para número de células foi de 1,0 mL :  $5,0x10^6$  células. O extrato obtido foi mantido em gelo e homogeneizado periodicamente durante 30 a 50 min, com seringa de 50 mL. O lisado resultante foi centrifugado a 50000xg e 4°C por 30 min. O sobrenadante obtido foi centrifugado novamente, nas mesmas condições. O sobrenadante final, por sua vez, foi filtrado em membrana de 0,45 µm para só então ser aplicado à purificação por cromatografia de afinidade por íon imobilizado (subtópico 3.12.1).

### 3.11 Análise *In Vitro* da Interação entre Proteínas Recombinantes por Copurificação em Cromatografia de Afinidade por Glutationa (*GST Pull-down*)

Os clones destinados ao experimento de GST *pull-down* foram obtidos por transformação simples, dupla ou tripla via eletroporação, crescidos em meio LB-ágar seletivo com cloranfenicol (marca de seleção do plasmídeo pRARE), ampicilina (marca de seleção do plasmídeo pPROEX e derivados) e canamicina (marca de seleção do plasmídeo pETG e derivados) e testados por PCR de colônia com *primers* dos vetores e dos insertos. Os clones positivos foram utilizados no preparo de

pré-inóculos a 37°C e 200 rpm por 16 h, a partir dos quais eram inoculadas culturas de 150 mL de meio LB líquido seletivo, induzidas com IPTG 0,8 mmol.L<sup>-1</sup> (quando  $DO_{600} = 0,8$ ) a 20°C e 200 rpm por 16 h.

Ao fim do período de indução, as culturas foram centrifugadas a 18000xg e 4°C por 5 min. Ouando as proteínas a serem testadas estavam em clones diferentes, suas respectivas culturas eram unidas antes da centrifugação, em diferentes proporções. As células recuperadas foram ressuspendidas em 1,0 mL de tampão de extrato e tratadas com lisozima. Em seguida, foram sonicadas em banho de gelo de 15 s em 15 s, com intervalos mínimos de 30 s, até adquirirem um aspecto clarificado. O tampão de extrato era o PBS (phosphate buffered saline; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mmol.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>; KCl 2,7 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 140 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,3) com DTT 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; Igepal 0,5% v/v e coquetel de inibidores Complete, EDTA-free, obtido da Roche (Basiléia, Suíça), em concentração especificada pelo fabricante. O lisado celular foi centrifugado a 18000xg, 4°C por 10 min e o sobrenadante obtido foi o extrato de proteínas solúveis (fração solúvel), do qual foi retirada e estocada a -20°C uma alíquota de 30 µL para análise posterior em SDS-PAGE. A fração solúvel restante foi incubada com 30 µL da resina Glutathione Sepharose, obtida da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire), por 30 min a 4°C. A resina fora previamente equilibrada com tampão PBS com DTT 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; Igepal 0,5% v/v; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup> e benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Após período de incubação, o extrato solúvel com a resina foi centrifugado a 550xg por 1 min a 4°C, a resina recuperada e lavada três vezes com 1,0 mL de tampão de equilíbrio. Finalmente, a resina foi ressuspendida em 30 µL de tampão de amostra 2x e fervida por 5 min em aquecedor de microtubos a seco. A amostra final foi estocada a -20°C para análise posterior em SDS-PAGE e western-blotting.

#### 3.12 Purificação de Proteínas Recombinantes

A indução dos clones de *E. coli* produtores das proteínas de fusão citadas foi realizada de forma idêntica à descrita no subtópico 3.10.2, nas condições descritas no subtópico 4.2.2 (tabela 14, indução das construções de S6K1) e no subtópico 4.2.4 (tabela 16, indução das construções de CTRPS6). Após o período de indução as culturas eram centrifugadas a 6000×g, as células recuperadas e congeladas ou destinadas ao preparo dos extratos protéicos solúveis. O procedimento adotado também está descrito no subtópico 3.10.2, exceto por variações no método de lise mecânica, no tampão de extrato e nas proporções volume:volume ou volume:massa entre tampões de extrato e

culturas, descritas abaixo. Para as proteínas recombinantes expressas em células de inseto, o método de obtenção e preparo da amostra antes da purificação cromatográfica está descrito no subtópico 3.10.3.

# 3.12.1 Purificação de Proteínas Fusionadas a Polihistidina por Cromatografia de Afinidade por Cátion Níquel Imobilizado

Quando a purificação foi realizada em banho com a resina NiNTA *Superflow*, as células obtidas das culturas de *E. coli* foram ressuspendidas em tampão de extrato (fosfato de sódio 50 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% v/v, NaCl 100 mmol.L<sup>-1</sup> e PMSF 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,2) numa proporção volume de tampão (mL):volume de cultura (mL) igual 1:100. Essa suspensão foi tratada com lisozima, sonicada e centrifugada como descrito anteriormente, para obtenção do extrato protéico solúvel. Quando a purificação foi realizada em coluna, as células obtidas foram ressuspendidas em tampão de extrato (Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 10% v/v; PMSF 1,0 mmol.L<sup>-</sup> benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; pH 8,0) numa proporção volume (mL):massa (g) igual a 2:1. Essa suspensão foi tratada com lisozima, submetida à homogeneização líqüida em *French Pressure Cell Press* (GlenMills Incorporation – Clifton, New Jersey) e centrifugada duas vezes a 18000xg e 4°C por 20 min. O sobrenadante (extrato protéico solúvel) foi recuperado e mantido em banho de gelo até ser injetado na coluna cromatográfica.

Na purificação em cromatógrafo *Äkta FPLC* foi utilizada coluna HisTrap HP (0,7x2,5 cm; 1,0 mL), ambos da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire). A coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão (Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 10% v/v; PMSF 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; pH 7,8), a amostra foi injetada e a coluna lavada com 30 mL do mesmo tampão. Neste ponto iniciou-se um gradiente linear de 0-100% de tampão de eluição (Tris-HCl 25 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 10% v/v; imidazol 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; PMSF 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>; pH 7,8) por 20 volumes da coluna (20 mL). Todo o procedimento foi realizado sob um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e um limite máximo de pressão de 0,3 MPa. Os tampões cromatográficos eram filtrados em membrana de 0,45  $\mu$ m e desaerados em sonicador de banho (20 min) antes de ser iniciada a purificação. Foram aliquotados 10  $\mu$ L de algumas frações (1,0 mL) coletadas durante a eluição e aplicados em *SDS-PAGE* para análise da purificação.

Na purificação em banho, a fração protéica solúvel foi incubada com resina *NiNTA Superflow* (QIAGEN – Valencia, Califórnia; proporção de 0,4 mL de resina para 1000 mL de cultura), previamente equilibrada, a 4°C por 3 h, sob agitação branda. Após incubação, ainda a 4°C, permitiuse à resina decantar e o extrato com proteínas não ligadas foi retirado. A resina foi ressuspensa em 3,0 mL do primeiro tampão de eluição (tampão de extrato acrescido de imidazol 10 mmol.L<sup>-1</sup>) e aplicada em coluna, para coleta de três frações de 1,0 mL. Demais tampões de eluição com concentrações crescentes de imidazol foram aplicados, na seguinte ordem:

-3x1,0 mL de tampão de extrato com imidazol 20 mmol.L<sup>-1</sup>;

-3x0,5 mL de tampão de extrato com imidazol 50 mmol.L<sup>-1</sup>;

-3x0,5 mL de tampão de extrato com imidazol 100 mmol.L<sup>-1</sup>;

-2x0,5 mL de tampão de extrato com imidazol 200 mmol.L<sup>-1</sup>;

-1x0,5 mL de tampão de extrato com imidazol 500 mmol.L<sup>-1</sup>.

Foram aliquotados 10 µL de cada fração coletada durante a eluição e aplicados em *SDS-PAGE* para análise da cromatografia de afinidade.

Os procedimentos descritos acima se referem à purificação a partir de extratos solúveis provenientes de culturas bacterianas. Quando o extrato provinha de células de inseto (purificação de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1), o procedimento adotado era parcialmente diferente. Nesse caso, a coluna HiTrap *Chelating* (0,7x2,5 cm; 1,0 mL) da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire), previamente ligada ao cátion níquel (Ni<sup>2+</sup>), era equilibrada com 10 mL de tampão de equilíbrio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 250 mmol.L<sup>-1</sup>; imidazol 10 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0), a amostra era injetada e a coluna lavada com 30 mL do mesmo tampão. Neste ponto iniciava-se um gradiente linear de 0-100% de tampão de eluição (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 250 mmol.L<sup>-1</sup>; imidazol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; PMSF 1 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 5% (v/v); β-mercaptoetanol 5 mmol.L<sup>-1</sup>; imidazol 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) por 40 volumes da coluna (40 mL). Esse procedimento também era realizado em cromatógrafo *Äkta FPLC* e as demais especificações da purificação eram idênticas ao descrito anteriormente.

# 3.12.2 Purificação de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 por Cromatografia de Troca Catiônica em Coluna de Heparina

As amostras provenientes da purificação parcial a partir de células de inseto (subtópico 3.12.1) foram aplicadas à cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap Heparin HP (0,7x2,5 cm; 1 mL), em cromatógrafo *Äkta FPLC*, ambos da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire). A coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 30 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,0), a amostra injetada e a coluna lavada com 10 mL do mesmo tampão. Neste ponto iniciou-se um gradiente linear de 0-100% de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup>; pH 7,0) por 25 volumes da coluna (25 mL). Todo o procedimento foi realizado sob um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e um limite máximo de pressão de 0,3 MPa. Os tampões cromatográficos foram filtrados em membrana de 0,45 µm e desaerados em sonicador de banho (20 min) antes de ser iniciada a purificação. Foram aliquotados 10 µL de algumas frações (1,0 mL) coletadas durante a eluição e aplicadas em *SDS-PAGE* para análise da purificação.

# 3.12.3 Purificação Parcial de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 e His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 a partir de Corpos de Inclusão e Renaturação *In Vitro*

As culturas foram centrifugadas a  $6000 \times g e 4^{\circ}C$  por 30 min e ressuspendidas em 40 mL de tampão A (Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 200 mmol.L<sup>-1</sup>; imidazol 5,0 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas. O extrato foi adicionado de coquetel de inibidores de proteases *Complete, EDTA-free* (Roche – Basiléia, Suíça), DNase 0,65 mg.mL<sup>-1</sup> e lisozima 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>, para um volume final de 50 mL, e deixado em banho de gelo por 30 min. Posteriormente, o extrato foi lisado por sonicação ou homogeneização líquida em *French Pressure Cell Press* (GlenMills Incorporation – Clifton, New Jersey) e centrifugado a 17000 $\times g e 4^{\circ}C$  por 20 min. O sobrenadante (SN1) foi descartado e o precipitado (CI), novamente ressuspendido em tampão A e centrifugado como na etapa anterior. O novo sobrenadante (SN2) foi descartado e o precipitado novamente lavado em tampão A, caso não estivesse suficientemente limpo. Em seguida, CI foi ressuspendido em 15 mL de tampão B (Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mmol.L<sup>-1</sup>; uréia 8,0 mol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas, e agitado brandamente à temperatura ambiente, por 1 h. Em seguida, o extrato foi sonicado gentilmente (50% de intensidade por 10 s, duas vezes, a 20 kHz) e centrifugado a 20000 $\times g e 4^{\circ}C$  por 30 min. O precipitado resultante foi descartado e o sobrenadante final (SN3) incubado com 4,0 mL de resina *NiNTA SuperFlow* 

(QIAGEN – Valencia, Califórnia) previamente equilibrada com tampão B, por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação branda. Ao fim da incubação, a suspensão de resina foi centrifugada a 500xg e 4°C por 2 min; o sobrenadante foi retirado e a resina lavada com 30 mL de tampão B em coluna aberta. Finalmente, 15 mL do tampão E (Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup>; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mmol.L<sup>-1</sup>; uréia 8,0 mol.L<sup>-1</sup>; imidazol 1,0 mol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) foi adicionado à resina na mesma coluna onde fora lavada, para eluição das proteínas complexadas ao Ni<sup>2+</sup> imobilizado nos *beads*.

O eluato obtido foi dialisado sob agitação branda contra 1,0 L de tampão C (Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup>; uréia 6,0 mol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) por 16 h a 4°C, em membrana com limite de exclusão de 8,0 kDa obtida da Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, Califórnia). Desde então, o eluato foi dialisado contra vários tampões de formulação idêntica ao tampão C, exceto pela concentração de uréia, que foi gradativamente reduzida até ser anulada (processo de renaturação gradual das proteínas recombinantes). Cada diálise foi feita por 2 h, sempre a 4°C e sob agitação branda. A partir do tampão C com 8,0 mol.L<sup>-1</sup> de uréia, as concentrações decrescentes de uréia empregadas foram: 4,0 mol.L<sup>-1</sup>; 2,0 mol.L<sup>-1</sup>; 1,0 mol.L<sup>-1</sup>; 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; 0,25 mol.L<sup>-1</sup> e, finalmente, tampão C sem uréia (tampão  $C_{s.u.}$ ). Observou-se formação de precipitado branco na passagem entre os tampões com 0,5 mol.L<sup>-1</sup> e 0,25 mol.L<sup>-1</sup> de uréia. A diálise direta contra tampão  $C_{s.u.}$  também foi realizada (processo de renaturação direto) e também apresentou precipitação. A amostra final foi centrifugada a 18000xg e 4°C por 15 min para retirada do precipitado branco e estocada em tubo Falcon de 50 mL a 4°C. Foram aliquotados 10–15  $\mu$ L de alguns sobrenadantes coletados durante todo o procedimento e aplicados em *SDS-PAGE* para análise da purificação parcial e da renaturação.

# 3.12.4 Purificação de CTRPS6 e CysCTRPS6 por Cromatografia de Troca Catiônica em Coluna HiTrap SP HP

As amostras provenientes da purificação parcial a partir de corpos de inclusão e renaturação foram aplicadas à cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP HP (0,7x2,5 cm; 1 mL), em cromatógrafo *Äkta FPLC*, ambos da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire). A coluna foi equilibrada com 10 mL de tampão de equilíbrio (Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 7,5), a amostra injetada e a coluna lavada com 10 mL do mesmo tampão. Neste ponto iniciou-se um gradiente linear de 0-100% de tampão de eluição (Tris-HCl 20 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 1,0 mol.L<sup>-1</sup>; pH 7,5) por 50 volumes da coluna (50 mL). Todo o procedimento foi realizado sob um fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> e um limite máximo de pressão de 0,3 MPa. Os tampões

cromatográficos foram filtrados em membrana de 0,45  $\mu$ m e desaerados em sonicador de banho (20 min) antes de ser iniciada a purificação. Foram aliquotados 50  $\mu$ L de algumas frações (1,0 mL) coletadas durante a eluição, concentradas em *SpeedVac Savant* SC 110A (Global Medical Instrumentation – Ramsey, Minnesota) para 15  $\mu$ L e aplicadas em *SDS-Tricine-PAGE* para análise da purificação.

# 3.12.5 Purificação de Proteínas Fusionadas a GST por Cromatografia de Afinidade por Glutationa

Quando a purificação de GST-CTRPS6 foi realizada em banho com resina de glutationa, a massa celular obtida das culturas induzidas foi ressuspendida em tampão de extrato PBS (pH 7,3) adicionado de DTT 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; Igepal 0,1% v/v; glicerol 10% v/v e coquetel de inibidores de proteases Complete, EDTA-free, da Roche (Basiléia, Suíça). A proporção volume (mL):massa (g) empregada foi de 2:1. A suspensão resultante foi tratada com lisozima, sonicada e o extrato protéico centrifugado duas vezes a 18000xg e 4°C, primeiramente por 20 min e depois por 10 min. A fração solúvel assim originada era incubada por 1 h com resina Glutathione Sepharose da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire), previamente equilibrada com tampão PBS (pH 7.3) adicionado de DTT 1.0 mmol.L<sup>-1</sup>; Igepal 0.1% v/v; glicerol 10% v/v; PMSF 1.0 mmol.L<sup>-1</sup> e benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>. O volume de resina empregado obedecia à proporção de 200 µL de suspensão de resina em etanol 20% v/v para 5 g de massa celular inicial. Após a incubação, a mistura da resina com a fração protéica solúvel era centrifugada a 500xg (4°C) por 5 min e os sobrenadantes (*flow-throughs*) estocados a -20°C. A resina, por sua vez, era lavada três vezes com tampão de equilíbrio em volumes iguais a 10x o volume de suspensão de resina empregada. Após a lavagem, adicionava-se tampão de eluição (Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>; DTT 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; glicerol 10% v/v; PMSF 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; Glutationa reduzida 40 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0) à resina e a suspensão era incubada a 4°C por 10 min, sob rotação branda. O volume de tampão de eluição utilizado era igual ao de suspensão de resina empregada. Após a incubação, a suspensão era centrifugada a 500xg (4°C) por 5 min e o sobrenadante (primeira eluição) estocado a -20°C. Mais duas eluições foram realizadas. Foram aliguotados 15  $\mu$ L de cada uma das eluições e aplicados em SDS-PAGE para análise da purificação.

Para as construções derivadas de S6K1, dois tipos de tampão de extrato e equilíbrio foram utilizados, os iniciais e os modificados, tanto em purificações com resina em banho quanto em

coluna. Com GST-CTRPS6 purificada em coluna, somente tampões iniciais foram utilizados. Os tampões modificados foram idealizados para promover a quebra de interação entre a chaperonina *Cpn60* de *Oleispira antarctica* e as proteínas de fusão recombinantes, no caso do emprego de clones derivados de *E. coli* Arctic Express (vide Joseph & Andreotti, 2008). A composição dos tampões iniciais e modificados pode ser vista na tabela 9.

	Iniciais	Modificados
Tampão de Extrato	Tris-HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; Igepal 0,1% v/v; NaCl 300 mmol.L <sup>-1</sup> ; EDTA 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; pH 7,5 e coquetel de inibidores de proteases <i>Complete</i> , <i>EDTA-free</i> , da Roche (Basiléia, Suíça)	Tris-HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> , Igepal 0,1% v/v, KCl 300 mmol.L <sup>-1</sup> , MgCl <sub>2</sub> 10 mmol.L <sup>-1</sup> , ATP 5,0 mmol.L <sup>-1</sup> , pH 7,5 e coquetel de inibidores de proteases <i>Complete</i> , <i>EDTA-free</i> , da Roche (Basiléia, Suíça).
Tampão de Equilíbrio	Tris-HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> ; NaCl 300 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; Igepal 0,1% (v/v); PMSF 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; benzamidina 100 μg.mL <sup>-1</sup> ; pH 7,5	Tris-HCl 50 mmol.L <sup>-1</sup> ; DTT 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; Igepal 0,1% (v/v); PMSF 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; benzamidina 100 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> , KCl 150 mmol.L <sup>-1</sup> ; MgCl <sub>2</sub> 10 mmol.L <sup>-1</sup> ; ATP 5,0 mmol.L <sup>-1</sup> ; pH 7,5

Tabela 9 – Composições dos tampões de extrato e equilíbrio dos tipos inicial e modificado.

Quando a purificação de GST-CTRPS6 e das construções de S6K1 foi realizada em coluna, os tampões de extrato inicial ou modificado foram utilizados para ressuspender a massa celular obtida das culturas induzidas, numa proporção de 5,0 mL de tampão para cada 1,0 g de células. As suspensões foram tratadas com lisozima, sonicadas e centrifugadas. Então, as frações solúveis foram purificadas em coluna GST-Trap 4B (0,7x2,5 cm; 1 mL) acoplada ao cromatógrafo *Äkta FPLC*, ambos da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire). A coluna foi equilibrada com 5,0 mL de tampão de equilíbrio inicial ou modificado, a amostra foi injetada e a coluna lavada com 30 mL do mesmo tampão. Neste ponto iniciou-se a injeção súbita de 100% do tampão de eluição (Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>; glutationa reduzida 40 mmol.L<sup>-1</sup>; DTT 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; PMSF 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; benzamidina 100 µg.mL<sup>-1</sup>; pH 8,0) por 10 mL. O equilíbrio foi realizado sob um fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, a injeção da amostra sob 0,2 mL.min<sup>-1</sup> e a eluição sob 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Todo o procedimento foi realizado com um limite máximo de pressão de 0,3 MPa. As frações coletadas eram de 1,0 mL. Os tampões cromatográficos eram filtrados em membrana de 0,45 µm e desaerados em sonicador de banho (20 min) antes de ser iniciada a purificação.

Quando a purificação das construções de S6K1 foi realizada com resina em banho, 1,0 mL de tampão de extrato modificado foi empregado na ressuspensão de 1,0 g de massa celular. As suspensões foram tratadas com lisozima, sonicadas e centrigufadas duas vezes a  $18000xg e 4^{\circ}C$  por 30 min. Os extratos protéicos solúveis foram recuperados e destinados à purificação em banho, conforme descrito anteriormente para GST-CTRPS6, com algumas variações (uso de tampão de equilíbrio modificado e quatro etapas de lavagem e eluição). Por fim, a purificação foi analisada em *SDS-PAGE* a partir de alíquotas de 15  $\mu$ L de cada uma das eluições.

### 3.13 Determinação da Concentração de Proteínas Solúveis Totais pelo Método do Ácido Bicinconínico (BCA)

Na realização deste ensaio foi empregado o *BCA Protein Assay Kit*, obtido da Pierce Biotechnology (Rockford, Illinois). Algumas adaptações ao protocolo do fabricante foram feitas e estão descritas abaixo. Optou-se por realizar o teste em micro-escala, em placa de 96 poços de fundo chato.

#### 3.13.1 Construção da Curva Padrão

Entre os reagentes providos pela Pierce está um padrão de proteína de concentração exata, a solução aquosa de BSA 2,0x10<sup>3</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Esta solução foi utilizada para preparar soluções padrão em concentração decrescente para a construção da curva padrão do teste, a saber: 2,0x10<sup>3</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (A); 1,5x10<sup>3</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (B); 1,0x10<sup>3</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (C); 7,5x10<sup>2</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (D); 5,0x10<sup>2</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (E); 2,5x10<sup>2</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (F); 1,25x10<sup>2</sup>  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (G); 2,5x10  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> (H). Foram preparadas soluções de 95  $\mu$ L para ensaios em triplicata e de 70  $\mu$ L para ensaios em duplicata. A curva padrão deve relacionar a média aritmética das absorbâncias (a 570 nm) das replicatas de cada solução padrão com os valores de concentração dessas soluções. Os diluentes empregados no preparo das soluções eram idênticos aos diluentes das amostras. Um exemplo de regressão linear simples com essas soluções padrão pode ser visto na figura 6.

#### 3.13.2 Preparo do Reagente de Trabalho

O volume total (V) de reagente de trabalho (RT) necessário ao teste, em  $\mu$ L, é dado pela fórmula V = 200(a+b)n, onde a é número de soluções padrão empregadas na construção da regressão

linear simples (a = 8, neste caso), b é o número de ensaios e n é o número de replicatas dos ensaios e soluções padrão (em geral, n = 3 ou 2). Uma vez calculado o volume total necessário, prepara-se o RT pela mistura dos reagentes A (BCA) e B (CuSO<sub>4</sub>) na proporção 50 partes de A / 1 parte de B.



**Figura 6** – **Regressão linear simples do método do ácido bicinconínico (BCA) para determinação da concentração de proteínas solúveis totais.** Esta curva padrão foi obtida a partir das soluções padrões descritas no texto (A a H) em ensaios em duplicata.

### 3.13.3 Procedimento

O procedimento para realização do teste pode ser descrito nas seguintes etapas:

- a) A microplaca de 96 poços foi colocada sobre o gelo para mantê-la resfriada até o início da reação do teste;
- **b**) O RT foi preparado e mantido em gelo;
- c) As soluções padrão foram preparadas e também mantidas em gelo;
- d) 200 µL de RT foram pipetados em cada poço da placa para receber amostras e soluções padrão, de acordo com um mapa previamente preparado. Durante a montagem dos ensaios a placa permaneceu sobre o gelo;
- e) 25 μL de soluções padrão e amostras foram adicionadas aos poços que receberam RT, de acordo com o mapa. Os meios reacionais foram homogeneizados e a placa tampada;
- f) A placa foi retirada do gelo e incubada imediatamente sobre um suporte em banhomaria a 37°C, de forma que a água do banho tocasse o fundo dos poços. Permitiu-se que a reação ocorresse por 30 min;

- g) A placa foi retirada do banho-maria, seca sobre papel toalha e submetida à leitura da absorbância dos ensaios a 570 nm, imediatamente;
- h) As concentrações de cada amostra foram calculadas por meio da aplicação da média aritmética das absorbâncias das replicatas na equação da curva padrão.

## **3.14** Análise de CTRPS6, CysCTRPS6 e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 por Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Amostras de CTRPS6, CysCTRPS6 e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5; NaCl 30 mmol.L<sup>-1</sup> foram analisadas em espectropolarímetro Jasco J-810 (obtido da Jasco Corporation – Tóquio, Japão), em cubeta de 1,0 mm de caminho ótico. Os parâmetros ajustados para a análise foram: modo contínuo com intervalo de dados de 0,5 nm, velocidade de variação de comprimento de onda de 50 nm.s<sup>-1</sup>, tempo de resposta de 4 s e ajuste médio de sensibilidade. Cada espectro foi obtido por média de 20 varreduras.

### 3.15 Ensaio em Micro-escala para Determinação das Condições Ótimas de Clivagem de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 com a Protease TEV e Ensaio em Grande Volume

Nos micro-ensaios, o volume final do meio reacional era de 50  $\mu$ L e a proporção entre substrato e enzima era de 100  $\mu$ g de proteína recombinante para 5  $\mu$ g de TEV, em tampão Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup>; EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> e DTT 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; pH 8,0. As reações foram incubadas a 4°C, 30°C e à temperatura ambiente por 2 h, 4 h, 6 h e 16 h, sem agitação. Para finalizar a reação, adicionou-se tampão de amostra 6x ao meio reacional, que foi analisado por *SDS-Tricine-PAGE*. O ensaio em volume superior era preparado com o mesmo tampão e proporção substrato/TEV, embora os volumes reacionais fossem de 15 - 20 mL. Submetia-se o produto de renaturação diretamente à clivagem, sem concentração prévia. As reações eram incubadas a 4°C por 16 h, sob agitação branda, pois nessas condições evitava-se a precipitação excessiva de substrato.

### **3.16** Tripsinização de Proteínas em Gel de SDS-PAGE para Análise por Espectrometria de Massas (MS)

Amostras de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 foram aplicadas em SDS-PAGE e tripsinizadas para análise de MS/MS (espectrometria de massas em tandem) dos peptídeos trípticos,

realizada em aparelho ESI-Q-Tof (subtópico 3.17). Para a tripsinização, as bandas de interesse foram excisadas dos géis de SDS-PAGE com uma lâmina limpa, em capela, para evitar contaminação com queratina do operador. As bandas excisadas foram fragmentadas e transferidas para microtubos previamente lavados com 500  $\mu$ L de metanol (2x) e 500  $\mu$ L de água deionizada microfiltrada (1x). Uma alíquota de 400  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0; acetonitrila 50% (v/v) foi adicionada aos microtubos, onde os fragmentos de gel ficaram em repouso por 15 min. Após esse período a solução foi retirada e os fragmentos foram novamente embebidos nessa solução por 15 min, mais duas vezes (3 lavagens ao todo). Após a última lavagem, os fragmentos foram imersos em acetonitrila e deixados em repouso por 5 min. Por conseguinte, a mistura dos fragmentos com acetonitrila foi submetida à secagem em SPP 1010 SpeedVac Savant (Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts) por 20 a 30 min. Os géis secos foram re-hidratados com o mínimo volume possível de uma solução de tripsina 10 µg.mL<sup>-1</sup> em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0 (~15 µL para um pequeno pedaço de gel). Os géis em solução de tripsina foram, então, incubados a 37°C por 16 a 24 h. Se, ao fim do período de digestão, ainda houvesse solução de tripsina no tubo, esta remanescente era transferida para um segundo microtubo previamente lavado com metanol e água (tal qual no início do procedimento). No primeiro microtubo foram adicionados 25 - 50 µL de solução de acetonitrila 50% (v/v); ácido trifluoroacético 5% (v/v) por fragmento de gel, seguido de repouso por 30 a 60 min. Após esse intervalo, a solução de acetonitrila e ácido trifluoroacético foi transferida do primeiro para o segundo microtubo. A extração com acetonitrila 50% (v/v); ácido trifluoroacético 5% (v/v) foi repetida. O extrato foi submetido à secagem em SpeedVac, ressuspenso em 10  $\mu$ L de ácido fórmico 0,1% (v/v) e aplicado ao espectrômetro de massas.

## **3.17** Análise de CTRPS6, CysCTRPS6, His<sub>6</sub>-CDPDPK1 e His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT por Espectrometria de Massas

As amostras de CTRPS6 e CysCTRPS6 provenientes da cromatografia de troca catiônica possuíam alta concentração de NaCl, portanto, antes da análise por espectrometria de massas (MS), foram submetidas à dessalinização em *Oasis MCX* (Waters Corporation – Milford, Massachusetts). Para tanto, 1,0 mL de solução de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) foi aplicado ao *Oasis* para ativação da resina da coluna, seguido da aplicação de 0,5 mL de amostra. Em seqüência, a resina carregada foi lavada com 1,0 mL de TFA 0,1% (v/v) e a amostra eluída com 0,5 mL de metanol. Posteriormente, o solvente do eluato foi eliminado em SPP 1010 *SpeedVac Savant* (Thermo Fisher

Scientific – Waltham, Massachusetts) e o soluto ressuspendido em 10  $\mu$ L de ácido fórmico 0,1% (v/v). As amostras assim preparadas foram analisadas no espectrômetro de massa Q-Tof *Ultima* (Waters Corporation – Milford, Massachusetts) pelo método de ionização ESI (*electrospray ionization*), num único tempo de vôo (MS). As análises foram realizadas em duplicata.

Antes da ionização por ESI, um volume de 4,5  $\mu$ L das amostras foi previamente injetado no UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) nanoAcquity da Waters (Milford, Massachusetts) acoplado ao espectrômetro de massas. A separação prévia foi realizada em coluna capilar analítica BEH 130 C18 (Waters – Milford, Massachusetts) de 75  $\mu$ m de diâmetro e 100 mm de comprimento, sob fluxo de 0,6  $\mu$ l.min<sup>-1</sup>. A solução de equilíbrio utilizada foi a de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água (A) e a de eluição, a de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (B). O gradiente de eluição empregado foi linear, de 0 a 50% da solução B, durante 45 min. Vale ressaltar que, antes da separação na coluna analítica, a amostra foi submetida à lavagem com solução A numa coluna Symmetry C18 (180  $\mu$ m de diâmetro e 20 mm de comprimento) da Waters (Milford, Massachusetts), denominada *trap*, a 20  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> por 30 s. Quando lavada pelo período padrão de 10 min, a amostra era inteiramente perdida, pois interagia fracamente com os grupos C18 e fortemente com a fase móvel aquosa.

As amostras de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 e His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, por sua vez, foram tripsinizadas em gel (conforme detalhado no subtópico anterior) e ressuspensas em 10 µL de ácido fórmico 0,1% (v/v), dos quais 4,5 µL foram aplicados no UPLC acoplado ao espectrômetro Q-Tof *Ultima*. Saliente-se que o procedimento foi idêntico ao adotado para as amostras de CTRPS6 e CysCTRPS6, à exceção do tempo de lavagem na coluna *trap*, 10 min, e a ao tipo de análise, MS/MS. As análises foram realizadas em duplicata.

# **3.18** Micro-ensaio Colorimétrico de Atividade de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT (Imunoensaio Enzimático)

Este ensaio foi realizado em microplacas de ELISA especiais, cujas superfícies dos poços são quimicamente ativadas para reagir especificamente com grupos sulfidrila (-SH), como o presente no resíduo de cisteína aminoterminal do peptídeo CysCTRPS6, substrato de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. Tais placas são as Microplacas *Sulfhydryl-BIND* de poliestireno e fundo chato, obtidas da Corning Life Sciences (Corning, Nova Iorque). Embora represente um novo protocolo, este ensaio baseou-se em testes enzimáticos de S6K1 e variantes realizados por Flotow & Thomas (1992), Tremblay *et al.* 

(2005), Zhang *et al.* (2005), Keshwani & Harris (2008), assim como nas instruções da série *ELISA Technical Bulletin*, disponível no site da Corning (www.corning.com). As soluções empregadas no ensaio, as amostras testadas e o procedimento adotado estão descritos abaixo.

### 3.18.1 Soluções Empregadas no Ensaio

As soluções-estoque utilizadas foram:

- a) Estoque do tampão de imobilização: PBS concentrado (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9,0 mmol.L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mmol.L<sup>-1</sup>; KCl 13,5 mmol.L<sup>-1</sup>; NaCl 0,7 mol.L<sup>-1</sup>; pH 6,5); EDTA 5,0 mM (5<sub>x</sub>);
- **b**) Estoque do tampão de reação: MOPS 400 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0; MgCl<sub>2</sub> 100 mmol.L<sup>-1</sup> ( $10_x$ );
- c) Estoque do tampão de parada de reação: Tris-HCl 200 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5; EDTA 160 mmol.L<sup>-1</sup> (4x);
- d) Estoque do tampão de ligação dos anticorpos: TBS pH 7,5 (10x).

Os estoques acima são mantidos à temperatura ambiente. Abaixo estão listados os estoques que devem permanecer a -80°C:

- e) ATP 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 (ajustado com NaOH);
- **f**) AMP-PNP (adenilil-imidodifosfato, análogo do AMP) 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0;
- **g**)  $\beta$ -glicerofosfato 1,0 mol.L<sup>-1</sup>.

Finalmente, estes são os estoques que devem permanecer a -20°C:

- h) Coquetel de inibidores de fosfatases *PhosStop* (Roche Basiléia, Suíça) 20x;
- i) DTT 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, 10  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup> e 100  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>.

Essas soluções concentradas foram utilizadas para o preparo das soluções do ensaio no momento do uso. Uma vez descongelados, os estoques permaneceram em gelo. Os tampões do ensaio foram:

- **a**) Tampão de imobilização: PBS pH 6,5; EDTA 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>; DTT 0,1 μmol.L<sup>-1</sup>; CysCTRPS6 50 μg.mL<sup>-1</sup>;
- **b**) Tampão da 1<sup>a</sup> lavagem: MOPS 40 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>; DTT 0,1 μmol.L<sup>-1</sup>;

- c) Tampão de reação: MOPS 40 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0; MgCl<sub>2</sub> 10 mmol.L<sup>-1</sup>; DTT 0,1 μmol.L<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>; β-glicerofosfato 25 mmol.L<sup>-1</sup>; *PhosStop* 1<sub>x</sub>; ATP 50 μmol.L<sup>-1</sup>;
- **d**) Tampão de parada de reação: Tris-HCl 50 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5; EDTA 40 mmol.L<sup>-1</sup>; AMP-PNP 3 mmol.L<sup>-1</sup>;
- e) Tampão das demais lavagens: TBS pH 7,5;
- f) Solução de TMB (3',3',5',5'-tetrametilbenzidina): TMB 0,001% (m/v); DMSO (dimetilsulfóxido) 1% (v/v); CH<sub>2</sub>COONa 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 6,0; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,01% (v/v);
- g) Solução de parada de reação da peroxidase:  $H_3PO_4$  1,0 mol.L<sup>-1</sup>.

Antes do preparo do tampão de imobilização, as frações de CysCTRPS6 (provenientes de troca catiônica, subtópico 3.12.4) que apresentavam menor quantidade de contaminante foram reunidas num mesmo *pool* e submetidas à concentração e troca de tampão em Amicon (limite de exclusão molecular de 5,0 kDa; obtido da Millipore – Billerica, Massachusetts). O novo tampão era o Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5; NaCl 30 mmol.L<sup>-1</sup>. O mesmo procedimento foi utilizado para as quinases recombinantes His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1, provenientes de cromatografia em coluna de heparina.

Acima está citado o tampão de reação 1x, contudo, ele não foi preparado nessa concentração para ser aplicado nas placas. Antes, preparou-se uma mistura concentrada desse tampão (mistura do tampão de reação) para aplicação nos poços. Dessa forma, com a adição dos demais componentes do ensaio aos poços, o tampão atingiu a concentração final 1x. A composição da mistura do tampão de reação, por poço da placa, foi:

Estoque do tampão de reação: 10 µL

DTT 10  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>: 1  $\mu$ L

 $\beta$ -glicerofosfato: 2,5  $\mu$ L

PhosStop 20x: 5 µL

ATP 10 mmol.L<sup>-1</sup>:  $0,5 \,\mu$ L

Água deionizada microfiltrada: 1,0 µL

### **TOTAL**: 20 μL

Essa mistura permaneceu em gelo até o momento do uso.

Outra solução do ensaio que mereceu cuidado especial foi a de TMB. Para prepará-la, foram dissolvidos 0,1 mg de TMB em 100  $\mu$ L de DMSO. Essa mistura foi adicionada a 9,9 mL de CH<sub>2</sub>COONa 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 6,0 e filtrada em filtro de 0,45  $\mu$ m. Por fim, adicionou-se peróxido de hidrogênio à solução, para uma concentração final de 0,01%. Esse volume de solução é suficiente para aplicação nos 96 poços da microplaca.

Finalmente, o mapa do ensaio pode ser visto na figura 5 e a composição dos ensaios da curva padrão pode ser observada na tabela 10. A composição dos testes, por sua vez, pode ser visualizada na tabela 11. Os significados dos nomes dos testes e sua finalidade também estão descritos na figura 7.


#### LEGENDA

- · Ensaios em preto: curva padrão
- · Ensaios em vermelho (controles negativos por ausência do substrato CysCTRPS6):
  - SS+S: Sem substrato, com His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT
  - SS+SC: Sem substrato, com His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1
  - SS+T: Sem substrato, com His<sub>6</sub>-TIPRL
  - SS+ST: Sem substrato, com His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-TIPRL
  - SS+C: Sem substrato, com His<sub>6</sub>-CDPDPK1

• Ensaios em verde (controles negativos por ausência das proteínas em teste ou controles dos diluentes):

- S-SC: Sem His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1
- S-T: Sem His<sub>6</sub>-TIPRL
- S-ST: Sem His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-TIPRL
- Ensaios em azul (testes):
  - SC: His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1
  - T: His<sub>6</sub>-TIPRL apenas
  - ST: His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-TIPRL
  - C: His<sub>6</sub>-CDPDPK1 apenas

Figura 7 – Mapa do micro-ensaio colorimétrico de atividade de  $His_6$ -S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (imunoensaio enzimático).

	His <sub>6</sub> -S6K1α2T38	89ЕАСТ	Volume de Estoque de Tampão	TOTAL
Ponto	Concentração (mol.L <sup>-1</sup> )	Volume <sup>1</sup> (µL)	de Reação 10x (µL)	(mistura de enzima) (µL)
1	7,7.10 <sup>-7</sup>	20	0	20
2	5,8.10 <sup>-7</sup>	15	5	20
3	3,8.10 <sup>-7</sup>	10	10	20
4	2,0.10 <sup>-7</sup>	5	15	20
5	7,7.10 <sup>-8</sup>	2	18	20
6	3,8.10 <sup>-8</sup>	1	19	20

Tabela 10 – Composição dos pontos da curva padrão do ensaio imunoenzimático.

<sup>1</sup>Volume da solução 3,8.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT.

	Proteínas						D	iluente	es	Volume de	TOTAL
<b>T</b> = =4 =	S		С		Т		S	С	Т	Estoque de Tampão de	(mistura de
Ieste	Conc.	Vol. <sup>1</sup>	Conc.	Vol. <sup>2</sup>	Conc.	Vol. <sup>3</sup>	Vol. <sup>4</sup>	Vol. <sup>4</sup>	Vol. <sup>5</sup>	Reação 10x (µL)	enzima) (µL)
SS+S	2,0.10-7	5	-	-	-	-	-	-	-	15	20
SS+SC	2,0.10-7	5	1,4.10-7	5	-	-	-	-	-	10	20
SS+T	-	-	-	-	2,0.10-7	1	-	-	-	19	20
SS+ST	2,0.10-7	5	-	-	2,0.10-7	1	-	-	-	14	20
SS+C	-	-	1,4.10-7	5	-	-	-	-	-	15	20
S-SC	-	-	-	-	-	-	2,5	2,5	-	15	20
S-T	-	-	-	-	-	-	-	-	1	19	20
S-ST	-	-	-	-	-	-	5	-	1	14	20
SC	2,0.10-7	5	1,4.10 <sup>-7</sup>	5	-	-	-	-	-	10	20
Т	-	-	-	-	2,0.10 <sup>-7</sup>	1	-	-	-	19	20
ST	2,0.10 <sup>-7</sup>	5	-	-	2,0.10 <sup>-7</sup>	1	-	-	-	14	20
С	-	-	1,4.10 <sup>-7</sup>	5	-	-	-	-	-	15	20

Tabela 11 – Composição dos testes e controles do ensaio imunoenzimático. S, His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT; C, His<sub>6</sub>-CDPDPK1; T, His<sub>6</sub>-TIPRL1. As concentrações (Conc.) estão em mol.L<sup>-1</sup> e os volumes (Vol.) em µL.

<sup>1</sup> Volume da solução 3,8.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT. <sup>2</sup> Volume da solução 2,8.10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup> de His<sub>6</sub>-CDPDPK1. <sup>3</sup> Volume da solução 2,0.10<sup>-5</sup> mol.L<sup>-1</sup> de His<sub>6</sub>-TIPRL1. <sup>4</sup> Diluente de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1: Tris-HCl 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5 ; NaCl 30 mmol.L<sup>-1</sup>. <sup>4</sup> Diluente de His<sub>6</sub>-TIPRL1: Hepes 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,5; NaCl 0,5 mol.L<sup>-1</sup>; β-mercaptoetanol 10 mmol.L<sup>-1</sup>.

#### 3.18.2 Procedimento

O procedimento para realização dos ensaios pode ser descrito nas etapas abaixo. Todo o protocolo deve ser realizado à temperatura ambiente, exceto quando o contrário for citado. Todos os ensaios são realizados em triplicata, tal qual observado na figura 5.

#### A. Imobilização de CysCTRPS6

- a) Foi adicionado 100 µL de tampão de imobilização em cada poço da microplaca a ser utilizado no ensaio. Nos controles negativos foi adicionado tampão de imobilização sem CysCTRPS6;
- **b**) A placa foi selada e incubada por 1 h;
- c) O tampão de imobilização foi decantado, isto é, a microplaca foi virada de cabeça para baixo a fim de que o líquido escorresse e, em seguida, foi pressionada por alguns instantes contra uma pequena pilha de papéis absorventes. Todos os poços foram lavados três vezes com 200 µL de tampão da 1ª lavagem. Aos mesmos poços foi adicionado o tampão da 1ª lavagem uma quarta vez e, antes do decantamento, esperouse por 5 min (passo de embebição);

#### B. Reação de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT

- a) 60 µL de água deionizada microfiltrada foi adicionada a cada poço a ser utilizado no ensaio. Logo em seguida, 20 µL da mistura do tampão de reação foi adicionado a esses poços;
- b) A reação foi iniciada pela adição de 20 µL da mistura de enzima apropriada para cada poço, conforme mapa do ensaio previamente elaborado;
- c) Deixou-se a reação ocorrer por 20 a 25 min. Ao fim desse período, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão de parada de reação e agitada brandamente;
- d) O líquido dos poços foi decantado. Os poços foram lavados três vezes com 200 μL de TBS pH 7,5. O passo de embebição foi realizado com esse tampão e, em seguida, o líquido foi decantado da placa.
- C. Ligação de anticorpo primário IgG anti-fosfo-RPS6 (S235/S236) desenvolvido em coelho

- a) Uma solução de anticorpo primário 1:1000 em tampão TBS pH 7,5 foi preparada. 100 μL dessa solução foi adicionada a cada poço, a palca foi selada e deixada por 3 h à temperatura ambiente ou 16 h a 4°C (se possível, sob agitação branda);
- b) A solução do anticorpo primário foi decantada de todos os poços. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de TBS pH 7,5. O passo de embebição foi realizado e o líquido da placa decantado.

### D. <u>Ligação de anticorpo secundário conjugado à peroxidase, desenvolvido em asno</u> contra IgG de coelho

- a) Uma solução de anticorpo secundário na proporção 1:1000 em tampão TBS pH 7,5 foi preparada. 100 μL dessa solução foi adicionada a cada poço, a placa foi selada e deixada por 1 h à temperatura ambiente ou 16 h a 4°C (se possível, sob agitação branda);
- b) A solução do anticorpo primário foi decantada de todos os poços. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de TBS pH 7,5. O passo de embebição foi realizado e o líquido da placa decantado.
- E. <u>Reação da Peroxidase</u>
  - a) 100 µL da solução de TMB (substrato da peroxidase) foi adicionada a cada poço do ensaio;
  - b) A placa foi incubada por 20 a 25 min à temperatura ambiente. A leitura da absorbância dos poços foi realizada a 630 nm, logo antes do término do tempo de reação (os ensaios estavam com coloração azul);
  - c) 100 μL da solução de parada (ácido fosfórico 1,0 mol.L<sup>-1</sup>) foi adicionada a cada poço.
    A absorbância dos poços foi então determinada a 490 nm.

### **4 RESULTADOS**

# 4.1 Clonagem do cDNA da S6K1 e Análise das Variantes de mRNAs amplificados das Bibliotecas de cDNA e de Células HeLa

Durante a clonagem de S6K1 foram isoladas duas formas incomuns de cDNA das bibliotecas de cérebro fetal humano e HeLa (tabela 9), obtidas da Clontech (Mountain View, Califórnia). Também foram testadas as bibliotecas de leucócitos e de medula óssea humanos, que não apresentaram amplificação. As duas formas incomuns eram idênticas à seqüência codificadora do mRNA de S6K1, a não ser pela presença de inserções de 75 pb (forma isolada da biblioteca de cérebro fetal humano) e 185 pb (forma isolada da biblioteca de HeLa). Vale ressaltar que a amplificação a partir da biblioteca de cérebro fetal apresentava apenas a forma com inserção de 75 pb, mesmo após extensiva otimização das condições de reação e de inúmeras repetições realizadas. O mesmo ocorria para a biblioteca de HeLa, embora duas formas persistissem nesse caso, a consensual (número de entrada BC053365 no NCBI) e a incomum (dotada da inserção de 185 pb), conforme demonstrado por análise de restrição seguida de seqüenciamento (vide figura 8). De fato, a seqüência da inserção de 75 pb pode ser encontrada no íntron 6 (bases 37094 a 38540) do gene de S6K1 humana, enquanto a inserção de 185 pb pode ser encontrada no íntron 11 (bases 43197 a 43382). Enquanto o íntron 6 possui 1447 pb e apresenta a sequência da inserção de 75 pb apenas em seu início (bases 37277 a 37351), o íntron 11 possui 186 pb e é praticamente todo constituído pela seqüência da inserção de 185 pb (bases 43198 a 43382), a não ser pela sua primeira base.

**Tabela 12** – Seqüências das inserções encontradas em cDNAs de S6K1 isolados das bibliotecas de cérebro fetal humano (75 pb) e de HeLa (185 pb). Os nucleotídeos em negrito representam aqueles compartilhados pelo cDNA isolado e pela seqüência BC053365, com os aminoácidos correspondentes também em negrito. O símbolo "–" significa códon de término da tradução.

	Seqüência Nucleotídica (cDNA)	Seqüência Traduzida
Inserção de 75 pb	<b>5'GCC TG</b> G CTT GAG TGG AAC GCT CTT CAC ACC AGT TGT TCC TAA CAG AAC CAT TCT CAT TGC GGC TTT CTT TCC TTG AAT TGC <b>TTT3'</b>	AminoterminalA W L E W N A L H T S C S - Q N H S H C G F L S L N CCarboxiterminal
Inserção de 195 pb	<b>5'CAA G</b> TA GGG ATT GGC ATC TTT GGT GTT TTG TGG GGA AGA TAA TGC TAG TTT TAT GTA TTT CTG AGG GTT ATA TGT AGT TGC TTA TAA GTT TAG CTT ATT TTG TGA CTT GTA ACT TCA AAA AGG TGA TTA ATT TAT CAA TCC AGC AAA GTC TAG TCC CCT CAA CTT TTC TTC CTG CTT TTT TTT TCC TAG GCT CAT3'	AminoterminalQ V G I G I F G V L W G R - C - F Y V FL R V I C S C L - V - L I L - L V T S K R - L I Y Q S S K V - S P Q L F F L L F F S - A HCarboxiterminal



**Figura 8 – Clonagem do cDNA de S6K1. (A)** Teste de temperaturas de anelamento dos *primers* usados na amplificação a partir de bibliotecas de linhagens celulares humanas (neste caso, cérebro fetal). **(B)** Análise das amplificações do cDNA a partir das bibliotecas de cDNA de HeLa e cérebro fetal humano (C.F.). **(C)** Análise de restrição dos clones derivados das bandas I e II, amplificadas a partir da biblioteca de cDNA de HeLa. Digestões realizadas com *Bam*HI, *XhoI* (para liberação do inserto) e *SaII* (para clivagem do inserto), que cliva a seqüência BC053365 (1578 pb) na posição 1174. O plasmídeo pCRII-S6K1 $\alpha$ 1, quando continha inserto igual à seqüência de referência, originava três fragmentos em caso de digestão completa: ~4000 pb (vetor), 1174 pb e 404 pb (fragmentos do inserto). Os clones isolados que mais se aproximaram do perfil esperado foram os derivados da banda II. De fato, o seqüenciamento desses clones revelou que eram idênticos à seqüência BC053365. Os clones do outro grupo continham uma inserção de 185 pb. O controle positivo (C+) corresponde à análise de um clone de S6K1 $\alpha$ 1 amplificado a partir da biblioteca de cérebro fetal, que possuía uma inserção de 75 pb. P; padrão de massa molecular. Géis de agarose 0,8%.

O cDNA com inserção de 75 pb traduz-se num polipeptídio hipotético de 207 resíduos de aminoácidos, pois a inserção causa a adição da seqüência WLEWNALHTSCS (12 resíduos de aminoácidos) após o resíduo Ala<sub>195</sub> de S6K1 $\alpha$ 1 (Ala<sub>172</sub> em S6K1 $\alpha$ 2), seguida de um códon de término da tradução. Portanto, essa inserção provocaria o fim prematuro da cadeia de S6K1, aproximadamente no meio do domínio catalítico de Ser/Thr quinase, que compreende os resíduos Phe<sub>91</sub> a Phe<sub>352</sub> em S6K1 $\alpha$ 1 (Phe<sub>68</sub> a Phe<sub>392</sub> em S6K1 $\alpha$ 2).

Por sua vez, o cDNA com inserção de 185 pb traduz-se num polipeptídio hipotético de 359 resíduos de aminoácidos, pois a inserção causa a adição da seqüência VGIGIFGVLWGR (12

resíduos de aminoácidos) após o resíduo  $Gln_{347}$  de S6K1 $\alpha$ 1 (Gln<sub>324</sub> em S6K1 $\alpha$ 2), seguida de um códon de término da tradução. Ao contrário da inserção menor, a inserção de 185 pb causaria a interrupção da cadeia de S6K1 logo após o domínio catalítico de Ser/Thr quinase de S6K1.

5 **ATG**AG <mark>JCGACGAAGGAGGCGGGAC</mark>GGCTTTTACCCAGCCCCGGACTTCCGAGACAGGGAAGCTGAGGAC ATGGCAGGAGTGTTTGACATAGACCTGGACCAGCCAGAGGACGCGGGCTCTGAGGATGAGCTGGAGGAGGG GGGTCAGTTAAATGAAAGCATGGACCATGGGGGGAGTTGGACCATATGAACTTGGCATGGAACATTGTGAGA AATTTGAAATCTCAGAAACTAGTGTGAACAGAGGGCCCAGAAAAAATCAGACCAGAATGTTTTGAGCTACTT CGGGTACTTGGTAAAGGGGGGCTATGGAAAGGTTTTTCAAGTACGAAAAGTAACAGGAGCAAATACTGGGAA AATATTTGCCATGAAGGTGCTTAAAAAGGCAATGATAGTAAGAAATGCTAAAGATACAGCTCATACAAAAG CAGAACGGAATATTCTGGAGGAAGTAAAGCATCCCTTCATCGTGGATTTAATTTATGCCTTTCAGACTGGT GGAAAACTCTACCTCATCCTTGAGTATCTCAGTGGAGGAGAACTATTTAT<mark>GCAGTTAGAAAG</mark>AGAGGGAAT **AT**TTATGGAAGACACTGCCTGCTTTTACTTGGCAGAAATCTCCATGGCTTTGGGGCATTTACATCAAAAGG GGATCATCTACAGAGACCTGAAGCCGGAGAATATCATGCTTAATCACCAAGGTCATGTGAAACTAACAGAC GGCCCCTGAAATCTTGATGAGAAGTGGCCACAATCGTGCTGTGGATTGGTGGAGTTTGGGAGCATTAATGT TGTAAACTCAATTTGCCTCCCTACCTCACAAGAAGCCAGAGATCTGCTTAAAAAGCTGCTGAAAAGAAA TGCTGCTTCTCGTCTGGGAGCTGGTCCTGGGGACGCTGGAGAAGTTCAAGTAGGGATTGGCATCTTTGGTG **TTTTGTGGGGAAGATAATGCTAGTTTTATGTATTTCTGAGGGTTATATGTAGTTGCTTATAAGTTTAGCTT** ATTTTGTGACTTGTAACTTCAAAAAAGGTGATTAATTTATCAATCCAGCAAAGTCTAGTCCCCTCAACTTTT **CTTCCTGCTTTTTTTTTCCTAGG**CTCATCCATTCTTTAGACACATTAACTGGGAAGAACTTCTGGCTCGAA AGGTGGAGCCCCCCTTTAAACCTCTGTTGCAATCTGAAGAGGATGTAAGTCAGTTTGATTCCAAGTTTACA CGTCAGACACCTGTCG<mark>ACAGCCCAGATGACTCAACTCT</mark>CAGTGAAAGTGCCAATCAGGTCTTTCTGGGTTT  ${\tt CTCGAAGATTTATTGGCAGCCCACGAACACCTGTCAGCCCAGTCAAATTTTCTCCTGGGGATTTCTGGGGA$ AGAGGTGCTTCGGCCAGCACAGCAAATCCTCAGACACCTGTGGAATACCCAATGGAAACAAGTGGCATAGA GCAGATGGATGTGACAATGAGTGGGGAAGCATCGGCACCACTTCCAATACGACAGCCGAACTCTGGGCCAT ACAAAAAAACAAGCTTTTCCCATGATCTCCAAACGGCCAGAGCACCTGCGTATGAATCTATGA 3'

**Figura 9** – **Estratégia de** *Nested* **PCR para identificação do cDNA incomum isolado da biblioteca de cDNA de células HeLa, obtida da empresa Clontech (Mountain View, Califórnia).** A seqüência acima corresponde ao clone incomum com inserção de 185 pb, evidenciada pelas letras em azul ciano. O resto da seqüência é idêntica à seqüência codificadora do mRNA de S6K1. As regiões hachuradas em vermelho e cinza correspondem respectivamente aos *primers* ONZ577 (direto) e ONZ531 (reverso), que flanqueiam ambos os cDNAs e permitiriam a amplificação do incomum (1761 pb) e do consensual (1575 pb) na primeira etapa do *Nested* PCR. As regiões hachuradas em rosa e verde correspondem respectivamente aos *primers* ONZ580 (reverso), que flanqueiam o centro da seqüência e permitiriam a amplificação de fragmentos de 840 pb (com a inserção) e de 654 pb (sem a inserção) na etapa final do *Nested* PCR.

Tentou-se provar a existência do mRNA incomum com inserção de 185 pb em células HeLa (o mesmo não foi feito com células de cérebro fetal humano devido à impossibilidade de acesso a esse tipo de amostra). A estratégia utilizada para isso foi o *Nested* PCR com o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de células HeLa cultivadas no próprio laboratório. O primeiro par de *primers*, utilizado na primeira etapa de amplificação, flanqueava a seqüência codificadora de S6K1, amplificando um fragmento de 1575 pb. O segundo par flanqueava a região central da seqüência codificadora, onde foram encontradas as inserções dos cDNAs incomuns (figura 9). Não houve

produção de *amplicons* do tamanho esperado no caso da existência dos cDNAs incomuns, mas apenas de *amplicons* do tamanho esperado do cDNA consensual. As reações da segunda etapa foram preparadas com diferentes volumes de DNA molde provenientes da primeira amplificação (figura 10).



**Figura 10** – *Nested* **PCR para detecção do cDNA incomum da linhagem** *HeLa.* (**A**) Primeira etapa; amplificação dos fragmentos inteiros de S6K1 a partir do *pool* de cDNA de células HeLa cultivadas em laboratório. Apenas um *amplicon* foi produzido, ao contrário do que ocorria no PCR com a biblioteca de cDNA de HeLa adquirida da Clontech (ver figura 6B). (**B**) Segunda etapa; amplificação do fragmento central do cDNA de S6K1 a partir do produto da primeira etapa. Os volumes (em  $\mu$ L) de DNA molde empregado em cada reação estão indicados no topo da figura. Observe que nenhuma das reações de HeLa apresentou bandas diferentes do esperado para o cDNA normal (N) de S6K1 (~650 pb). A amplificação a partir dos clones com os cDNAs incomuns de HeLa (H) e cérebro fetal humano (C.F.) apresentou as bandas esperadas (~850 pb). Géis de agarose 0,8%. P, padrão de massa molecular; C-, controle negativo; C+, controle positivo.

#### 4.2 Expressão em *E. coli* e Purificação de Proteínas Heterólogas

#### 4.2.1 Testes de Expressão de GST-S6K1α1-His<sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT

Procurou-se expressar em *E. coli* as formas ativa (fosforilada) e inativa (não fosforilada) das construções de S6K1, para utilização nos ensaios bioquímicos. Para isso foram adotadas duas estratégias: (I) simples expressão da construção de S6K1, para obtenção da forma inativa, e (II) co-expressão das construções de S6K1 e de PDPK1. Esperava-se que a construção de PDPK1 fosforilasse a construção de S6K1 nas células bacterianas, gerando a forma ativa da proteína recombinante. Para tanto, testes de expressão em *E. coli* foram realizados para triagem de meio de

cultura, temperatura de indução, cepa de *E. coli*, período de expressão, construções empregadas, indutores utilizados e suas concentrações. Todos os testes estão sumarizados na tabela 10 e alguns dos seus resultados são mostrados em figuras a seguir. As alíquotas de culturas coletadas durante os testes foram analisadas por *SDS-PAGE* e *western-blotting*.

Teste	Fig.	Temperatura	Meio de Cultura	Indutor e Concentração	Intervalos de Tempo	Clones	
I	7	37°C	LB	IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup>	2h, 4h	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETG-S6K1α1 + pGEX-4T1-PDPK1 + pRARE / <i>E. coli</i>	
II	-	15°C	LB	IPTG 0,8 mmol. $L^{-1}$	9h, 18h	bL21 (DE3) pE1G-S6K101 + pRARE / E. coli BL21 (DE3) pGEX-4T1-PDPK1 + pRARE	
Ш	7	13°C	LB	IPTG 0,8 mmol. $L^{-1}$	12h	<i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α1 + pGEX-4T1-PDPK1 + pRARE / <i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α1 + pRARE	
IV	-	13°C	TB	Lactose 10,0 mmol.L <sup>-1</sup>	12h		
V	8	13°C	LB	IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup>	12h, 18h, 24h	<i>E. coli</i> Arctic Express pETG- S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1- CDPDPK1 + pRARE / <i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α2T389EΔCT + pRARE / <i>E. coli</i> Arctic Express pGEX- 4T1-CDPDPK1 + pRARE / <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX- 4T1-CDPDPK1 + pRARE	
VI	-	13°C	TB	Lactose 10,0 mmol.L <sup>-1</sup>	12h, 18h, 24h		

**Tabela 13** – Detalhes do testes de expressão de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub>, GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, GST-PDPK1 e GST-CDPDPK1 realizados.

Os testes I a IV, realizados para verificar os níveis de expressão e solubilidade das construções GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> e GST-PDPK1, demonstraram que ocorre ganho de solubilidade com a queda da temperatura de indução, embora o nível da expressão caia. Contudo, o ganho de solubilidade foi observado apenas para a estratégia de simples expressão e foi maior quando empregada a cepa Arctic Express. A estratégia de co-expressão não apresentou proteínas recombinantes solúveis detectáveis por *western-blotting*, qualquer que fosse a temperatura de indução ajustada (figura 11). Além disso, no teste IV, a mudança do meio de cultura de LB para TB e do indutor de IPTG para lactose não possibilitou aumento de rendimento e solubilidade de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub>.



Figura 11 – Testes de Expressão de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> (87,1 kDa) e de Co-expressão dessa construção com GST-PDPK1 (89,8 kDa). Em C e D foram analisadas somente as frações solúveis dos extratos protéicos totais, a não ser quando o contrário tiver sido indicado (canaletas "INS."). (A) Expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pETG-S6K1 $\alpha$ 1 + pRARE (teste I). (B) Co-expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pETG-S6K1 $\alpha$ 1 + pGEX-4T1-PDPK1 + pRARE (teste I). (C) Simples expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e Arctic Express, ambas com os vetores pETG-S6K1 $\alpha$ 1 e pRARE. No detalhe, bandas de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> identificadas por *western blot* com anticorpo primário anti-GST (teste III). (D) Co-expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e Arctic Express, ambas com vetores pETG-S6K1 $\alpha$ 1, pGEX-4T1-PDPK1 e pRARE. No detalhe inferior, bandas de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> e GST-PDPK1 identificadas por *western blot* com anticorpo primário anti-GST (teste III). (D) co-expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e Arctic Express, ambas com vetores pETG-S6K1 $\alpha$ 1, pGEX-4T1-PDPK1 e pRARE. No detalhe inferior, bandas de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> e GST-PDPK1 identificadas por *western blot* com anticorpo primário anti-GST (teste III). (D) co-expressão em *E. coli* BL21 (DE3) e Arctic Express, ambas com vetores pETG-S6K1 $\alpha$ 1, pGEX-4T1-PDPK1 e pRARE. No detalhe inferior, bandas de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> e GST-PDPK1 identificadas por *western blot* com anticorpo primário anti-GST (teste III). *SDS-PAGE*, géis de acrilamida 8%. C.I., controle de indução; INS., fração insolúvel; P, padrão de massa molecular; 1, GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub>, 2, GST-PDPK1.



**Figura 12 – Testes de expressão V e VI de GST-S6K1α2T389EΔCT (71,6 kDa) e GST-CDPDPK1 (62,3 kDa).** (**A e B**) Expressão em *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT. (**C e D**) Expressão em *E. coli* Arctic Express pRARE + pGEX-4T1-CDPDPK1. (**E e F**) Expressão em *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1. (**G e H**) Expressão em *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1. *SDS-PAGE*, géis de acrilamida 10%. *western blots* realizados com anticorpo primário anti-GST. P, padrão de massa molecular; C.I.; controle de indução; 1, GST-S6K1α2T389EΔCT; 2, GST; 3, GST-CDPDPK1; 4, *Cpn60*.

As construções GST-CDPDPK1 e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (Keshwani *et al.*, 2008) foram empregadas nos testes V e VI para tentar promover aumento de rendimento e solubilidade. De fato,

proteínas recombinantes solúveis foram detectadas por *western-blotting*, tanto na estratégia de simples quanto de co-expressão. Entretanto, o rendimento da expressão permaneceu baixo nas duas estratégias. Vale ressaltar que a ausência de bandas de interesse proeminentes na análise por *SDS-PAGE* contrasta com a presença marcante das bandas da chaperonina *Cpn60* (com 57 – 60 kDa), heterologamente expressa na cepa *E. coli* Arctic Express. Mais uma vez, os resultados com LB/IPTG e TB/lactose foram praticamente iguais (figura 12).

#### 4.2.2 Testes de Purificação de GST-S6K1α1-His<sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT

A partir das condições estabelecidas nos testes de expressão, realizaram-se testes de purificação, em escala média (150 mL de cultura) e larga (1,0 e 2,0 L de cultura), para verificar o rendimento das construções de S6K1 ao fim da etapa inicial de purificação (*GAC*, do inglês *glutathione-affinity chromatography*, isto é, cromatografia de afinidade por glutationa). Os testes estão sumarizados na tabela 11 e seus resultados podem ser visualizados nas figuras a seguir.

Teste	Fig.	Meio de Cultura / Volume	Condições de Expressão	Método de Purificação	Clones
Ι	9	LB / 1,0 L	13°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 12 h	<i>GAC</i> <sup>1</sup> em coluna GSTrap HP	<i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α1 + pGEX-4T1- PDPK1 + pRARE / <i>E. coli</i> Arctic Express pETG- S6K1α1 + pRARE
Ш	-	LB / 150 mL	13°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 24 h	GAC em banho com resina Glutathione Sepharose	<i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α2T389EΔCT + pRARE / <i>E. coli</i> Arctic Express pETG- S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1 +
III	10	TB / 150 mL	13°C / Lactose 10,0 mmol.L <sup>-1</sup> / 12 h	GAC em banho com resina Glutathione Sepharose	pRARE / E. coli BL21 (DE3) pETG- S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1 + pRARE
IV	11	LB / 2,0 L	13°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 12 h	GAC em coluna GSTrap HP (com tratamento para retirar Cpn60)	<i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α2T389EΔCT + pRARE
V	-	TB / 2,0 L	13°C / Lactose 10,0 mmol.L <sup>-1</sup> / 24 h	GAC em coluna GSTrap HP (com tratamento para retirar Cpn60)	<i>E. coli</i> Arctic Express pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1 + pRARE

**Tabela 14** – Detalhes do testes de purificação de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT realizados.

<sup>1</sup>GAC é a sigla em inglês de glutathione-affinity chromatography, isto é, cromatografia de afinidade por glutationa.

No teste I verificou-se o baixo rendimento da purificação da construção GST-S6K1-His<sub>6</sub>, expressa sozinha ou com GST-PDPK1, em grandes volumes de cultura. Isso foi constatado a partir da baixa intensidade das bandas da construção de S6K1 nas análises eletroforéticas das purificações, para ambas as estratégias (simples e co-expressão). Entretanto, as bandas oriundas do extrato derivado da co-expressão eram mais intensas que as do extrato derivado da simples expressão, resultado que se repetiu em todos os testes. Observou-se a existência de várias bandas de contaminantes de massa inferior às duas bandas de interesse. Provavelmente, tais bandas correspondem a produtos de degradação das proteínas de fusão e à chaperonina *Cpn60* de *Oleispira antarctica*, expressa na cepa Arctic Express (figura 13).



Figura 13 – Purificação inicial de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub> por cromatografia de afinidade por glutationa em coluna GSTrap 4B. (A) *SDS-PAGE* da purificação do extrato obtido de uma cultura de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1 $\alpha$ 1 + pGEX-4T1-PDPK1. (B) *SDS-PAGE* da purificação do extrato obtido de uma cultura de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1 $\alpha$ 1. Géis de acrilamida 8%. P, padrão de massa molecular; 1, GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub>; 2, GST-PDPK1; E.B., extrato protéico bruto; F.T.; *flow-through*; Tp; tampão de amostra aplicado na canaleta.

Diante do baixo rendimento atingido na purificação das construções originais, realizaram-se os testes II e III para verificar o rendimento da purificação das construções truncadas em média escala. Nas análises eletroforéticas resultantes, as bandas de GST-S6K1α2T389EΔCT e GST-CDPDPK1 possuem intensidades comparáveis ou superiores às das bandas das construções originais (compare a figura 14 com a 13). Nesta escala os resultados são inconclusivos quanto ao meio de cultura (LB ou TB) que permite o maior rendimento. Mas, é notório que os extratos derivados de culturas em meio TB possuem menos contaminantes (provavelmente produtos de degradação) que os extratos derivados de LB (figura 14). Note também que os extratos derivados da estratégia de simples expressão apresentam duas bandas na região de interesse, quando apenas uma era esperada, de acordo com os resultados dos *western blots* dos testes de expressão correspondentes (compare a figura 12B com 14A e 14B). Da mesma forma, três bandas são observadas na região de interesse a

partir dos extratos derivados da co-expressão (figura 12D), quando eram esperadas apenas duas (figuras 12E e 12F). A banda extra observada, de aproximadamente 60 kDa, corresponde à chaperonina *Cpn60*, que co-purifica com as construções heterologamente expressas, como já havia sido observado no teste I.



**Figura 14** – **Testes de purificação de GST-S6K1α2T389E**ΔCT **em banho com resina** *Glutathione Sepharose*. As culturas de **A**, **C** e **E** foram induzidas com IPTG 0,8 mmol.L<sup>-1</sup> em meio LB (teste II), enquanto as de **B** e **D** foram induzidas com lactose 10 mmol.L<sup>-1</sup> em meio TB (teste III), ambas a 13°C por 24 h. (**A e B**) Purificações de extratos derivados de culturas de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT. (**C e D**) Purificações de extratos derivados de culturas de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1. (**E**) Purificação de extratos derivados de culturas de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1. (**E**) Purificação de extratos derivados de culturas de *E. coli* BL21 (DE3) pRARE + pETG-S6K1α2T389EΔCT + pGEX-4T1-CDPDPK1. *SDS-PAGE*, géis de acrilamida 10%. P, padrão de massa molecular; E.B., extrato protéico bruto; Tp, tampão de amostra aplicado; F.T., *flow-through*; Res, resina usada na purificação; INS., fração insolúvel do teste de indução correspondente (vide figura 12A e 12E); 1, GST-S6K1α2T389EΔCT; 2, *Cpn60*; 3, GST-CDPDPK1.

Além da contaminação por produtos de degradação, a co-purificação da chaperonina *Cpn60* de *O. antarctica*, expressa em clones derivados de *E. coli* Arctic Express, era um problema que precisava ser remediado. Para isso, foi criado um protocolo de purificação modificado a partir do trabalho de Joseph & Andreotti (2008), aplicado nos testes V e VI. O novo protocolo possuía tampões de extrato e equilíbrio modificados para promover a dissociação entre a chaperonina e as proteínas recombinantes. Como resultado, a banda da chaperonina não foi mais encontrada na análise eletroforética da purificação do extrato derivado de simples expressão (figura 15) – compare com os perfis eletroforéticos da figura 14. Para evidenciar essa diferença, foi realizada uma *SDS-PAGE* com frações de *flow-through* e eluição das purificações de GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, com e sem tratamento para retirada de *Cpn60*, lado a lado. Esse resultado atesta que não há a banda de *Cpn60* na purificação com tampões de extrato e equilíbrio modificados. Essa purificação foi realizada a partir de culturas crescidas em meio LB e TB, mas o rendimento obtido a partir de culturas crescidas em TB é pouco superior ao obtido de culturas em LB.



Figura 15 – Purificação inicial de GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT por cromatografia de afinidade por glutationa em coluna GSTrap 4B, com tratamento para retirada da chaperonina *Cpn60*. (A) *SDS-PAGE* da purificação do extrato obtido de uma cultura de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (teste IV). (B) *SDS-PAGE* das frações eluídas sem tratamento para retirada da chaperonina *Cpn60* (S.T.) e com tratamento (C.T.). (C) *SDS-PAGE* da purificação do extrato obtido de uma cultura de *E. coli* Arctic Express pRARE + pETG-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT + pGEX-4T1-CDPDPK1 (teste V). Géis de acrilamida 10%. P, padrão de massa molecular; F.T.; *flow-through*; Tp; tampão de amostra aplicado na canaleta; 1, GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT; 2, *Cpn60*; 3, GST-CDPDPK1.

## 4.2.3 Testes de Expressão de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e GST-CTRPS6

Com vistas ao emprego como substrato de S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT em ensaios bioquímicos, as construções de CTRPS6 e CysCTRPS6 foram expressas em *E. coli*. As condições ótimas de expressão foram estabelecidas ao longo de uma série de testes, sumarizados na tabela 12. Como nos

testes de expressão das construções de S6K1, foram avaliados o meio de cultura, a temperatura de indução, a cepa de *E. coli*, o período de expressão, as construções empregadas, os indutores utilizados e suas concentrações. As alíquotas de culturas coletadas durante os testes foram analisadas por *SDS-PAGE* e *western-blotting*.

Teste	Fig.	Temperatura	Meio de Cultura	Indutor e Concentração	Intervalos de Tempo	Clones
I	-	37°C	LB	IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup>	2h, 4h	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pBUF5-CTRPS6 + pRARE / <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pBUF5-CysCTRPS6 + pRARE
Ш	12	37°C	LB	IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup>	2h, 4h	E. coli BL21 (DE3) ΔslyD pBUF5- CTRPS6 + pRARE / E. coli BL21 (DE3) ΔslyD pBUF5-CysCTRPS6 + pRARE
ш	13	37°C	LB	IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup>	2h, 4h	E. coli BL21 (DE3) ΔslyD pETG-
IV	13	30°C	TB	Lactose 10,0 mmol.L <sup>-1</sup>	4h, 8h, 12h, 24h	CTRPS6 + pRARE

**Tabela 15** – Detalhes dos testes de expressão de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e GST-CTRPS6.

No teste I a análise por *SDS-PAGE* revelou bandas de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 e His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 nas frações solúvel e insolúvel, no tempo de 4 h de indução. Contudo, no teste de purificação subseqüente (teste I, subtópico 4.2.4), realizado com os mesmos clones, ocorreu a co-purificação de uma proteína endógena, provavelmente a peptidil prolil cis-trans isomerase SlyD (20,8 kDa). Para eliminar essa contaminação, estabeleceram-se clones derivados da cepa *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  (na qual o gene da SlyD é deletado), que foram destinados ao teste de expressão II, nas mesmas condições do teste I. Mais uma vez, as bandas referentes a His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 e His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 foram visualizadas nas frações solúvel e insolúvel, na análise por *SDS-PAGE*. Como ambos os testes produziram resultados semelhantes, somente a figura do teste II está representada abaixo.



Figura 16 – Testes de expressão II de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (21,9 kDa) e His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 (22,0 kDa). (A) Expressão em *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pBUF5-CTRPS6 + pRARE. (B) Expressão em *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pBUF5-CysCTRPS6 + pRARE. *SDS-PAGE*, géis de acrilamida 15%. C+, controle positivo; C.I., controle de indução; P, padrão de massa molecular; 1, His<sub>6</sub>-Proteína D-PACT\_M3 (21,7 kDa); 2, His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6; 3, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6.

Para minimizar a degradação e aumentar o nível da expressão da proteína de fusão solúvel, a construção GST-CTRPS6 foi testada em culturas em meio LB e TB (testes III e IV, respectivamente). Em ambos os testes verificou-se a expressão da proteína de fusão sem necessidade de *western blot*, contudo, não foi possível identificar com qual meio de cultura o rendimento era maior, como pode ser visualizado abaixo.



**Figura 17 – Testes de expressão de GST-CTRPS6 (34,7 kDa). (A)** *SDS-PAGE* das frações solúveis e insolúveis do extrato protéico obtido do clone E. coli BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pRARE + pETG-CTRPS6, induzido em meio LB (teste III). (**B**) *SDS-PAGE* das frações solúveis e insolúveis do extrato protéico obtido do clone E. coli BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pRARE + pETG-CTRPS6, induzido em meio TB (teste IV). Géis de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular; C+, controle positivo; C.I., controle de indução; 1, GST-CTRPS6; 2, His<sub>6</sub>-Proteína D-PACT\_M3 (21,7 kDa); 3, GST.

## 4.2.4 Testes de Purificação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e GST-CTRPS6

A partir das condições estabelecidas nos testes de expressão, diversos testes de purificação foram realizados, em escala média (250 mL de cultura) e larga (1,0 L de cultura), para verificar o rendimento das construções de CTRPS6 ao fim da etapa inicial de purificação (cromatografia de afinidade por cátion Ni<sup>2+</sup> imobilizado). Os testes realizados estão sumarizados na tabela 13 e seus resultados podem ser visualizados nas figuras a seguir.

Teste	Fig.	Meio de Cultura / Volume	Condições de Expressão	Método de Purificação	Clones
I	14	LB / 250 mL	37°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 4 h	<i>IMAC</i> <sup>1</sup> em resina NiNTA <i>Superflow</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pBUF5- CTRPS6 + pRARE
II	14	LB / 1,0 L	37°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 4 h	<i>IMAC</i> em resina NiNTA <i>Superflow</i>	E. coli BL21 (DE3) ΔslyD
III	15	TB / 1,0 L	20°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 16 h	<i>IMAC</i> em coluna HisTrap HP	pBUF5-CTRPS6 + pRARE
IV	16	LB / 1,0 L	37°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 4 h	GAC em banho com resina Glutathione Sepharose	
v	-	TB / 1,0 L	30°C / Lactose 10,0 mmol.L <sup>-1</sup> / 24 h	GAC em banho com resina Glutathione Sepharose	E. coli BL21 (DE3) ΔslyD pETG-
VI	16	LB / 1,0 L	37°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 4 h	GAC em coluna GSTrap HP	CIRPS6 + pRARE
VII	-	LB / 1,0 L	20°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 16 h	GAC em coluna GSTrap HP	
VIII	17	TB / 1,0 L	37°C / IPTG 0,8 mmol.L <sup>-1</sup> / 24 h	Renaturação da fração insolúvel e <i>IMAC</i> com resina NiNTA <i>Superflow</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ <i>sly</i> D pBUF5-CTRPS6 + pRARE

**Tabela 16** – Detalhes do testes de purificação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e GST-CTRPS6.

 $^{1}IMAC$  é a sigla em inglês de *immobilized metal ion affinity chromatography*, isto é, cromatografia de afinidade por íon metálico imobilizado.

Em razão da produção de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 e His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 na fração solúvel, nos testes de expressão, um teste de purificação em média escala foi realizado (teste I). As proteínas de fusão eluídas foram analisadas em *SDS-PAGE*, que revelou quantidades pequenas da

proteína recombinante e grande contaminação com bandas de menor massa. Entretanto, uma das bandas contaminantes era de massa molecular alta, aproximadamente 21 kDa (figura 18A). Provavelmente era a peptidil prolil cis-trans isomerase SlyD de *E. coli*, que é rica em resíduos vizinhos de histidina e co-purifica em ensaios com resina de Ni<sup>2+</sup> imobilizado. Para confirmar a identidade da banda contaminante de 21 kDa e estabelecer um método para eliminá-la, optou-se por expressar His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 numa cepa derivada de *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$ , isto é, uma cepa na qual o gene da SlyD é deletado (teste II). A análise eletroforética dessa purificação pode ser vista abaixo (figura 18B).

A banda da SlyD não é mais encontrada no perfil da figura 18B, contudo, as bandas dos contaminantes de menor massa molecular persistem. Para verificar se essas bandas são mesmo produtos de degradação da proteína de fusão His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, realizaram-se dois *western blots* sobre o referido perfil, um com o anticorpo primário anti-RPS6 obtido da Bethyl (Montgomery, Texas) e outro com o anti-His<sub>6</sub> obtido da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinghamshire) (figuras 18C e 18D). O anticorpo anti-RPS6 reconhece um epítopo localizado entre os resíduos Lys<sub>200</sub> e Lys<sub>249</sub> de RPS6, equivalente à região compreendida entre os resíduos Lys<sub>16</sub> e Lys<sub>65</sub> de CTRPS6. Os *western blots* revelaram que as bandas da construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (21,9 kDa) reagiram com anti-RPS6 e anti-His<sub>6</sub>, enquanto todas as demais bandas de massa menor reagiram somente com o anticorpo anti-His<sub>6</sub>; logo, realmente são produtos de degradação.



Figura 18 – Testes de purificação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 com resina NiNTA Superflow em banho. O número da fração eluída e as concentrações de imidazol utilizadas na eluição estão indicados no topo da figura. (A) SDS-PAGE da purificação do extrato obtido de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3) pBUF5-CTRPS6 + pRARE. Observe a banda de SlyD (20,8 kDa) (teste I) (B) SDS-PAGE da purificação do extrato obtido de uma cultura de *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta$ slyD pBUF5-CTRPS6 + pRARE. A banda de SlyD não é mais encontrada (teste II). (C) western blot correspondente ao SDS-PAGE B, realizado com anticorpo primário anti-RPS6. (D) western blot correspondente ao SDS-PAGE B, realizado com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. Géis de acrilamida 15%. P, padrão de massa molecular; E.B., extrato bruto; F.T., flow-through.



Figura 19 – Purificação inicial de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 por cromatografia de afinidade por Ni<sup>2+</sup> em coluna HisTrap HP. Os números das frações eluídas na cromatografia em coluna estão indicados no topo das figuras. As três primeiras canaletas do gel são para comparação e correspondem a frações eluídas nas concentrações de imidazol indicadas, na purificação em banho (figura 20). (A) *SDS-PAGE* da purificação do extrato protéico solúvel da cultura de *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pRARE + pBUF5-CTRPS6 (teste III). (B) *Western blot* correspondente ao *SDS-PAGE* A, realizado com anticorpo primário anti-RPS6. (C) Coloração por Ponceau do *western blot* B. (D) *Western blot* correspondente ao *SDS-PAGE* A, realizado com anticorpo primário anti-CPAGE A, realizado com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (E) Coloração por Ponceau do *western blot* D. Gel de acrilamida 15%. P, padrão de massa molecular; 1, His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6; 2, contaminantes.

No teste III, verificou-se a purificação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 a partir de culturas de grande volume, em meio TB e baixa temperatura. O perfil eletroforético da purificação apresentou bandas bastante intensas nas canaletas correspondentes às frações 23 a 28, na altura de 20 - 25 kDa, eluídas na faixa de 120 - 190 mmol.L<sup>-1</sup> do gradiente linear de imidazol (0 a 500 mmol.L<sup>-1</sup> em 20 volumes de coluna). Se comparadas às frações eluídas em 100 e 500 mmol.L<sup>-1</sup> de imidazol na

purificação em banho, as bandas proeminentes das frações 23 a 28 possuem massa igual à da construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 ou à massa de um contaminante de massa pouco menor. Para determinar qual dessas duas possibilidades é a verdadeira, realizaram-se dois *western blots* sobre o referido perfil, um com anticorpo primário anti-RPS6 e outro com o anti-His<sub>6</sub>, à semelhança do que foi feito anteriormente. O *western blot* com anti-RPS6 mostra claramente que a banda intensa das frações 23 a 28 não reage com o anticorpo primário, o que é confirmado pela coloração inespecífica de Ponceau. Contudo, no *western blot* com anti-His<sub>6</sub> a banda intensa reage com o anticorpo primário e a coloração inespecífica de Ponceau revela a banda que reagiu com o anti-RPS6 no primeiro *western blot* (figura 19). Portanto, as bandas intensas são produtos de degradação de massa semelhante à de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6.

Numa tentativa de aumentar o rendimento e diminuir a degradação, tentou-se expressar e purificar a construção GST-CTRPS6 em meio LB (teste IV) e TB (teste V), em média escala. A análise dessas purificações em *SDS-PAGE* revelou que a expressão de GST-CTRPS6 em ambos os meios é praticamente igual (portanto, apenas o resultado do teste IV é mostrado na figura 20), mas é significativamente superior ao nível de expressão atingido pela construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (compare as figuras 20, 18 e 19). Contudo, a intensidade das bandas contaminantes de baixa massa molecular também aumentou. Para avaliar o comportamento da nova construção numa indução em grande volume de cultura, realizaram-se duas purificações em coluna GSTrap 4B em diferentes temperaturas e tempos de indução (testes VI e VII). As análises eletroforéticas das frações eluídas revelam um rendimento superior ao atingido nas purificações da construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, com uma diminuição acentuada no número de bandas contaminantes, embora não haja diferença significativa entre as duas condições de indução testadas (portanto, apenas os resultados da indução a 37°C e 4 h são mostrados na figura 20).



**Figura 20 – Purificação inicial de GST-CTRPS6 por cromatografia de afinidade por glutationa. (A)** *SDS-PAGE* da purificação a partir do extrato protéico obtido do clone *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta slyD$  pRARE + pETG-CTRPS6, induzido em meio LB (purificação com resina em banho, teste IV). (B) *SDS-PAGE* da purificação do extrato protéico obtido do mesmo clone anterior, induzido em meio LB (purificação com resina em coluna, teste VI). Géis de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular; E.B., extrato protéico bruto; Tp, tampão de amostra aplicado; F.T., *flow-through*; Res, amostra da resina usada na purificação; 1, GST-CTRPS6.

Embora os testes de expressão e purificação com a construção GST-CTRPS6 tenham revelado um ganho de rendimento em relação a His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, ambas as estratégias ofereciam um nível de expressão aquém do desejado. Como apenas a fração solúvel dos extratos protéicos havia sido averiguada até então, decidiu-se testar a fração insolúvel proveniente da expressão de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, num processo de purificação que envolvia a renaturação das proteínas de fusão. Uma vez que a GST apresenta baixo rendimento em renaturação, a construção GST-CTRPS6 foi preterida para esse experimento, apesar da fração insolúvel dessa construção ser mais enriquecida que a fração insolúvel de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (compare a figura 17 com a 16). Na primeira experiência, realizada conforme descrito no subtópico 3.12.3, os clones de His<sub>6</sub>-Proteína D e His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 foram testados e comparados quanto à eficiência da renaturação. Além disso, o extrato protéico proveniente da fração insolúvel de cada cultura foi dividido em duas partes iguais, aplicadas em duas estratégias de renaturação diferentes, o procedimento direto e o gradual. No primeiro procedimento a solução com a proteína desnaturada em uréia 8,0 mol.L<sup>-1</sup> é dialisada diretamente contra um tampão fisiológico sem uréia (tampão C). No segundo a proteína é dialisada em etapas, contra tampões com concentração decrescente de uréia, até que o tampão fisiológico sem uréia seja atingido. Durante a renaturação, tanto no gradual quanto no direto, ocorre precipitação de parte da proteína que foi extraída dos corpos de inclusão. Por isso, a solução resultante do processo de diálise é centrifugada para retirada do precipitado de cor branca. Na análise por SDS-PAGE correspondente à renaturação (figura 21) é analisada tanto a solução não centrifugada (susp), com proteínas precipitadas em suspensão, quanto o sobrenadante com proteínas re-enoveladas (sbndt). O

mesmo procedimento de purificação foi adotado para His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e os resultados obtidos (não mostrados) foram idênticos.



Figura 21 – Extração de His<sub>6</sub>-Proteína D e His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 a partir de corpos de inclusão e purificação em banho com resina *NiNTA Superflow*, seguida de renaturação direto ou gradual. (A) *SDS-PAGE* de frações da extração de His<sub>6</sub>-Proteína D, purificação em banho e *renaturação*. (B) *SDS-PAGE* de frações da extração de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, purificação em banho e *renaturação*. Géis de acrilamida 15%. P, padrão de massa molecular; SN1, sobrenadante 1 (fração solúvel); SN2, sobrenadante 2 (lavagem dos corpos de inclusão); SN3, sobrenadante 3 (fração insolúvel); F.T., *flow-through*; Res, amostra da resina usada na purificação; Susp, suspensão; Sbndt, sobrenadante; 1, His<sub>6</sub>-Proteína D; 2, His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6; 3, contaminantes.

#### 4.2.5 Obtenção e Caracterização de CTRPS6 e CysCTRPS6

Uma vez definidas as condições ótimas para extração a partir de corpos de inclusão e renaturação de CTRPS6, estabeleceram-se as condições ótimas de clivagem da proteína de fusão His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 com a protease TEV (28,6 kDa), para liberar CTRPS6 e His<sub>6</sub>-Proteína D, conforme descrito no subtópico 3.15 (figura 22). A TEV é produzida no próprio CeBiME e é expressa com polihistidina. Os testes de clivagem foram feitos diretamente com o produto da renaturação, para que numa etapa posterior de purificação fosse separado não apenas o produto de clivagem His<sub>6</sub>-Proteína D, mas também todas as demais impurezas oriundas da própria renaturação.



**Figura 22** – Testes de clivagem do produto da renaturação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 com a protease TEV. As temperaturas e a duração dos ensaios estão indicadas no topo das figuras dos géis. (A) Clivagem de JNK1 com o N-terminal truncado (His<sub>6</sub>-JNK1 $\Delta$ NT; 43,7 kDa) com TEV, o controle positivo. (B) Clivagem de 5 µL do produto de renaturação com TEV. (C) Clivagem de 10 µL do produto de renaturação com TEV. (D) *western blot* referente à *SDS-Tricine-PAGE* B com o anticorpo primário anti-RPS6. (E) *western blot* referente à *SDS-Tricine-PAGE* B com o anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. O controle positivo foi analisado em *SDS-PAGE* com gel de acrilamida 12% e os demais ensaios em *SDS-Tricina-PAGE* com gel 16% T e uréia 6,0 mol.L<sup>-1</sup>. P, padrão de massa molecular; R, produto de renaturação não tratado com TEV; J, His<sub>6</sub>-JNK1 $\Delta$ NT não clivada; Tp, tampão de amostra aplicado; T, amostra da protease TEV aplicada. A identidade e as massas das bandas indicadas por números foram citadas no texto. As bandas de maior massa do padrão e das amostras tiveram migração anômala em decorrência da alta concentração de acrilamida e bis-acrilamida utilizadas no preparo dos géis de *SDS-Tricine-PAGE*.

As análises por *SDS-Tricine-PAGE* das figuras 22B e 22C efetivaram uma excelente resolução da mistura reacional do ensaio com TEV, a ponto de separar todas as bandas coradas com *Coomassie Blue R-250* e permitir a identificação das bandas de interesse, graças à comparação com os *western blots* das figuras 20D e 20E. As bandas **1** e **2** são reconhecidas pelo anticorpo anti-His<sub>6</sub>, mas apenas a banda **1** é reconhecida pelo anticorpo anti-RPS6. Portanto, a banda **1** corresponde à

construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (21,9 kDa) e à TEV (28,6 kDa), pois ambas coincidem em massa (compare a banda mais alta da TEV com as do teste na figura 22C). Além disso, a banda 1 diminui de intensidade com o aumento do tempo e temperatura do ensaio, indicando que está sendo consumido, como de fato ocorre com a construção de CTRPS6 e com a própria TEV, que sofre autólise. A banda 2, por sua vez, corresponde ao produto maior da autólise da TEV (26 kDa), pois é reconhecido pelo anti-His<sub>6</sub> e não o é pelo anti-RPS6, além de coincidir com a banda mais baixa da TEV (figura 22C). As bandas 3, 4 e 5 são reconhecidas pelo anti-His<sub>6</sub>, mas não o são pelo anti-RPS6. As bandas 3 e 4 também estão presentes no produto de renaturação não clivado, portanto, são contaminantes, provavelmente produtos de degradação (ou tradução interrompida) da construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (com massas aparentes entre 20 e 25 kDa). A banda 4 enquadra-se nesse perfil em especial, pois sua intensidade diminui com o tempo e temperatura do ensaio, logo, está sendo consumido. A banda 5 praticamente não está presente no produto de renaturação não clivado e aumenta de intensidade com o aumento do tempo e temperatura do ensaio, indicando que está sendo produzido; trata-se da His<sub>6</sub>-Proteína D originada na clivagem (14,0 kDa). A banda 6 não é reconhecida pelo anti-His<sub>6</sub>, mas o é pelo anti-RPS6, o que é suficiente para afirmar que se trata do peptídeo CTRPS6 (7,9 kDa). Além disso, a banda 6 praticamente não está presente no produto de renaturação não clivado e aumenta de intensidade com o aumento do tempo e temperatura do ensaio, pois nesse sentido aumenta o rendimento de sua produção. Por fim, a banda 7 não é reconhecida por nenhum dos anticorpos, não está presente no produto de renaturação não clivado e aumenta de intensidade tal qual o conjunto 6. Provavelmente, é o peptídeo CTRPS6 degradado (6,3 kDa), possivelmente originado da clivagem da proteína da banda 4.

Após a realização dos testes de clivagem com TEV, escolheram-se a temperatura de 4°C e o tempo de 16 h como condições ótimas de reação. Embora a temperatura de 30°C permita um maior rendimento da reação, em temperaturas mais baixas a precipitação de substrato é menor. Portanto, uma alíquota de 7,0 mL do produto de renaturação foi tratada com protease TEV de acordo com o protocolo supracitado e posteriormente submetida à troca catiônica em coluna HiTrap SP HP, conforme descrito no subtópico 3.12.4, para promover a melhor separação possível de CTRPS6 dos contaminantes mostrados na figura 20. De fato, CTRPS6 foi eluída na faixa de 0,75 a 0,85 mol.L<sup>-1</sup> do gradiente de NaCl, juntamente com apenas outro peptídeo. Todos os demais contaminantes foram eluídos em concentrações inferiores de NaCl (figura 23). O mesmo protocolo de clivagem e

purificação foi adotado para His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e os resultados obtidos (não mostrados) foram idênticos.

As figuras 23C e 23E não deixam dúvidas quanto à massa aparente de CTRPS6 na análise por *SDS-Tricine-PAGE*, 15 kDa, quando o previsto era apenas 8,0 kDa (1). Outro aspecto interessante é o peptídeo que co-purifica com CTRPS6 e não é reconhecido pelos dois anticorpos primários, anti-His<sub>6</sub> e anti-RPS6. A julgar por esse comportamento e pela sua massa aparente, na faixa de 10 - 15 kDa, esse peptídeo possivelmente corresponde à banda 7 da figura 22 (na figura 23 ele está indicado pelo número 2). Assim como na figura 22, acima também podem ser observados o outro produto de clivagem liberado pela TEV, His<sub>6</sub>-Proteína D (3), e uma quarta banda que pode ser a própria protease TEV ou His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 não clivado.



**Figura 23 – Purificação de CTRPS6 por cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP HP.** As frações analisadas estão indicadas por números no topo das figuras. (A) Cromatograma ampliado da purificação. O detalhe traz o cromatograma original, em que se observa apenas o pico da fração catiônica (*flow-through*). (B) *SDS-Tricine-PAGE* de frações de picos do cromatograma A. Note as duas bandas eluídas na fração 59. (C) *western blot* correspondente ao gel C, realizado com anticorpo primário anti-RPS6. (D) *western blot* correspondente ao gel C, realizado com 16%T e uréia 6,0 mol.L<sup>-1</sup>. P, padrão de massa molecular; R, produto da renaturação; Tp, tampão de amostra aplicado. A identidade das bandas 1 a 4 está descrita no texto.

Diante da possível distorção de massa molecular observada na SDS-Tricine-PAGE, experimentos de MS foram realizados para determinar a massa real dos peptídeos CTRPS6 e CysCTRPS6, assim como a massa do contaminante persistente de 10 - 15 kDa, e concluir quanto à origem desse contaminante, isto é, se ele é mesmo um produto de degradação ou não. Os espectros resultantes, gerados pelo programa Masslynx 4.1 Software Package (obtido da Waters Corporation -Milford, Massachusetts) podem ser vistos na figura 24. O espectro de CysCTRPS6 é mais ruidoso que o de CTRPS6, logo, as populações de íons obtidas de CysCTRPS6 geraram picos menos intensos que as populações obtidas de CTRPS6, ou seja, a quantidade de CysCTRPS6 analisada é menor em relação à quantidade de CTRPS6. Como os volumes das amostras processadas desde o início do experimento eram rigorosamente iguais e provenientes de fontes equivalentes, conclui-se que o rendimento de produção de CysCTRPS6 é inferior ao de CTRPS6. De fato, a concentração da fração do pico mais intenso do cromatograma de CTRPS6 foi de 127,8 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto a concentração da amostra correspondente de CysCTRPS6 foi de 59,0 µg.mL<sup>-1</sup>, conforme obtido pelo método do ácido bicinconínico de quantificação de proteínas solúveis totais. Outra observação interessante foi a de que os dois espectros apresentaram duas populações de íons cada um, assinaladas por estrelas verdes (íons de maior intensidade) e vermelhas (de menor intensidade). Ou seja, tais espectros recapitularam a figura 23, onde duas bandas são observadas no perfil eletroforético de CTRPS6 (idêntico ao de CysCTRPS6), uma mais intensa que a outra.



Figura 24 – Espectros de massa obtidos por ESI/MS para CTRPS6 e CysCTRPS6 purificados por cromatografia de troca catiônica e dessalinizados. Observe as duas populações de íons em ambos os espectros, a de maior intensidade (estrelas verdes) e a de menor intensidade (estrelas vermelhas). (A) Espectro não deconvoluído de CTRPS6. (B) Espectro não deconvoluído de CysCTRPS6, mais ruidoso em relação ao espectro de CTRPS6.

Os espectros anteriores mostram a relação massa/carga (m/z) dos íons multicarregados de CTRPS6 e CysCTRPS6. Para se obter a massa exata desses íons, foi necessário utilizar o algoritmo MaxEnt I (obtido da Waters Corporation – Milford, Massachusetts) para realizar a deconvolução de cargas, isto é, o cálculo do número de cargas dos íons e de suas massas exatas, para geração do espectro de massa (e não de m/z). O espectro resultante, dito "deconvoluído", pode ser observado na figura 25. Ele apresenta duas massas moleculares médias por amostra; a maior massa média foi de 7910,00 Da para CTRPS6 e 8013,00 Da para CysCTRPS6. Essas massas aproximam-se satisfatoriamente das predições de 7894,20 Da para CTRPS6 e 7997,34 Da para CysCTRPS6 realizadas pelo algoritmo ProtParam (http://ca.expasy.org/tools/protparam.html). Mais importante

ainda, a diferença entre as massas moleculares médias de CTRPS6 e CysCTRPS6 é de 103,00 Da, que coincide precisamente com a massa monoisotópica do resíduo de Cisteína (103,00919 Da), o único aminoácido diferente entre esses dois peptídeos. Por sua vez, a menor massa molecular média do espectro deconvoluído apresentou 6346,00 Da para CTRPS6 e 6449,00 Da para CysCTRPS6. A diferença entre as massas dos íons menores obtidos por ESI/MS, mais uma vez, coincide precisamente com a massa monoisotópica do resíduo de Cisteína (ver setas azuis na figura 25).

Outro aspecto interessante dos espectros deconvoluídos é a diferença de massa entre os peptídeos maiores e menores de ambas as amostras, que é constante e igual a 1564,00 Da (ver setas verdes na figura 25). Tal diferença corresponde exatamente à seqüência SSLRASTSKSESSQK, cuja massa monoisotópica é 1563,79 Da, calculada a partir dos valores de massas monoisotópicas dos resíduos de aminoácidos disponíveis no *site* da *The Association of Biomolecular Resource Facilities* (http://www.abrf.org/ResearchGroups/MassSpectrometry/EPosters/ms97quiz/residueMasses.html). Essa seqüência, presente tanto em CTRPS6 quanto em CysCTRPS6, corresponde aos 15 últimos resíduos do carboxiterminal de RPS6 e possui os dois sítios de fosforilação por S6K1 em RPS6 (Ser<sub>235</sub> e Ser<sub>236</sub>), que equivalem aos dois resíduos iniciais de Serina. Além disso, a referida seqüência é parte do epítopo reconhecido pelo anticorpo anti-RPS6 utilizado nos *western-blots*, o que explica a ausência de sinal da banda contaminante (esse anticorpo não consegue reconhecer o epítopo incompleto).



Figura 25 – Espectros de massa deconvoluídos obtidos por ESI/MS para CTRPS6 e CysCTRPS6, purificados por cromatografia de troca catiônica e dessalinizados. Observe as duas massas moleculares médias de cada espectro, correspondentes às duas populações identificadas em cada espectro da figura 24. As setas azuis indicam a diferença entre as massas médias correspondentes de ambos os espectros, equivalente à massa monoisotópica de um resíduo de Cisteína. As setas verdes indicam a diferença entre as massas médias monoisotópica da seqüência SSLRASTSKSESSQK, presente em ambos os peptídeos. (A) Espectro deconvoluído de CTRPS6. (B) Espectro deconvoluído de CysCTRPS6.

As frações dos peptídeos CTRPS6 e CysCTRPS6 (que não apresentavam o contaminante de menor massa em quantidades expressivas) foram reunidas num único *pool*, submetido à troca de tampão em Amicon (limite de exclusão: 5 kDa) e subseqüentemente à análise por espectroscopia de dicroísmo circular, para determinação da composição de estrutura secundária. Os dados coletados nessa análise foram convertidos de *mdeg (milidegrees*, isto é, miligraus) para elipticidade molar residual média (deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>) e plotados contra o comprimento de onda (nm) do feixe de luz

incidente, resultando no espectro apresentado na figura 26. Esses dados de elipticidade também foram enviados para processamento pelo algoritmo CDSSTR do portal DichroWeb (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml), que estimou a composição de estrutura secundária de CTRPS6 em, aproximadamente, 16% de  $\alpha$ -hélices, 31% de folhas- $\beta$ , 22% de voltas e 33% de estrutura desordenada. A composição de CysCTRPS6 foi estimada em 15% de  $\alpha$ -hélices, 29% de folhas- $\beta$ , 23% de voltas e 34% de estrutura desordenada. Portanto, a adição de um resíduo de cisteína na terceira posição a partir do aminoterminal de CTRPS6, após os resíduos de glicina e serina (nessa ordem) restantes do sítio da protease TEV, justifica a significativa variação de estrutura secundária observada entre CTRPS6 e CysCTRPS6.





### 4.3 Expressão Heteróloga em Células de Inseto, Purificação e Caracterização das Proteínas Recombinantes His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1

Uma vez que o rendimento da expressão das construções de S6K1 em *E. coli* não foi satisfatório para a produção em grandes quantidades, inseriu-se o cDNA de S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT no vetor pFastBacDual(EGFP) para dar início à construção do sistema de expressão mediada por

baculovírus, de acordo com o subtópico 3.6.8. O mesmo procedimento foi adotado em relação ao cDNA de CDPDPK1. Ambas as construções foram expressas com cauda de polihistidina.

O bacmídeo-CDPDPK1 e o bacmídeo-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foram produzidos por transposição na cepa E. coli DH10bac e submetidos ao teste de PCR, para averiguar se os cDNAs a serem expressos foram satisfatoriamente transpostos (figuras 27A e 27B). Algumas colônias de DH10bac positivas para a transposição podem apresentar contaminação por bacmídeo não transposto, que é evidenciada por uma banda de ~300 pb no teste de PCR. Os bacmídeos corretos e puros foram transfectados em células Sf9 e o sucesso da transfecção foi averiguado 36 h depois, por checagem da fluorescência produzida por E-GFP (figura 27C) em microscópio Nikon Eclipse TS 100 obtido da Nikon (Tóquio, Japão). Em seguida, 2,0x107 células Sf9 infectadas com baculovírus-CDPDPK1 e baculovírus-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foram coletadas e ressuspendidas em 4,0 mL de tampão de amostra para SDS-PAGE; a mistura foi homogeneizada para promover a lise celular e submetida à eletroforese. Os géis produzidos foram analisados por western blot com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub> obtido da GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, Buckinhamgshire) e as bandas das proteínas recombinantes foram satisfatoriamente identificadas, confirmando sua expressão (figuras 27D e 27E). Observe que duas bandas são identificadas no sistema de expressão de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (48,0 kDa), enquanto apenas uma é evidenciada no sistema de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 (41 kDa).



**Figura 27 – Expressão de His**<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 mediada por baculovírus em células *Sf*9. (A e B) Teste de PCR para detecção do cassete de expressão de CDPDPK1 (~3,9 kb) transposto no bacmídeo em DH10bac. Em A o PCR foi realizado com o *primer* reverso do inserto e o *forward* do bacmídeo; todos os clones são positivos. Em B os mesmos clones foram testados com ambos os *primers* do bacmídeo; todos são positivos, embora os clones 6, 7 e 12 estejam contaminados com bacmídeo -S6K1α2T389EΔCT. (C) Células *Sf*9 transfectadas com o bacmídeo-CDPDPK1 36 h após a transfecção, expressando EGFP, em aumento de 200X. (D) *SDS-PAGE* de proteínas totais de células *Sf*9 infectadas (I) e não infectadas (N) com baculovírus-CDPDPK1 e *western blot* subseqüente, realizado com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (E) *SDS-PAGE* de proteínas totais de células *Sf*9 infectadas (N) com baculovírus-S6K1α2T389EΔCT e *western blot* subseqüente, realizado com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (E) *SDS-PAGE* de proteínas totais de células *Sf*9 infectadas (N) com baculovírus-CDPDPK1 e *western blot* subseqüente, realizado com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (E) *SDS-PAGE* de proteínas totais de células *Sf*9 infectadas (N) com baculovírus-CDPDPK1 e *western blot* subseqüente, realizado com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (E) *SDS-PAGE* de proteínas totais de células *Sf*9 infectadas (I) e não infectadas (I)

No protocolo de expressão adotado, a linhagem *Sf*9, de crescimento lento, foi utilizada unicamente para produção de partículas virais infectivas (vetores). Para produção das proteínas recombinantes em maiores quantidades utilizaram-se células *HighFive*, cuja velocidade de crescimento é muito superior. Portanto, a fim de se estabelecer as condições ótimas para a produção de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 e His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT nessas células, foi preciso determinar os valores de multiplicidade de infecção (MDI) e tempo de incubação que permitem o maior nível de expressão
das proteínas recombinantes. Com essa finalidade, curvas de crescimento de culturas infectadas com os dois baculovírus recombinantes foram feitas em diversas MDIs diferentes. As curvas do baculovírus-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT podem ser observadas na figura 28A, em que o controle negativo (multiplicidade de infecção nula) cresce até atingir um máximo em 72 h, a partir do qual a densidade de células cai. As culturas infectadas, por sua vez, permanecem com crescimento praticamente estático. As curvas do baculovírus-CDPDPK1, não mostradas neste texto, apresentaram o mesmo comportamento.

A cada ponto das curvas de crescimento no tempo,  $1,0_x10^7$  células eram coletadas das culturas para extração de proteínas, análise por SDS-PAGE e *western-blotting*. Para o baculovírus-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, apenas os *western-blots* derivados de culturas crescidas por 24 h e 48 h apresentaram sinal. Para os demais tempos de crescimento não se detectou sinal de proteína recombinante (figura 28B). Pelos resultados obtidos, as melhores condições de expressão de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT são MDI igual a 2 e tempo de incubação de 24 h. Um rendimento semelhante foi obtido para MDI igual a 10 e 48 h de incubação, mas com produção de duas formas da proteína. Até o momento dessa análise, não se sabia se uma dessas formas era fosforilada ou degradada (tal qual ocorreu na expressão em células *Sf*9). Os *western-blots* derivados de culturas infectadas por baculovírus-CDPDPK1 não apresentaram sinal.



**Figura 28** – **Determinação das condições ótimas de expressão de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT mediada por baculovírus em células** *High Five***. (A) Curvas de crescimento das culturas de** *High Five* **não-infectada (MDI nula) e infectadas com diferentes MDIs. (B)** *Western-blot* **para determinação da melhor MDI e do intervalo de tempo ótimo para a produção da proteína recombinante. Gel de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular; Tp, tampão de amostra aplicado.** 

Contudo, diante da ausência e da baixa intensidade de sinal ocorridos nos *western-blots* referentes a baculovírus-CDPDPK1 e baculovírus-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, respectivamente, testes de expressão em maior escala (0,5 L de cultura) tornaram-se necessários. O baculovírus-

S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foi testado nas condições MDI 2 / 24 h, MDI 10 / 48 h, MDI 3 / 48 h e o baculovírus-CDPDPK1 foi testado nas condições MDI 3 / 24 h, MDI 10 / 48 h, MDI 3 / 48 h. As culturas foram submetidas à extração de proteínas totais e à purificação inicial em coluna de cátion níquel imobilizado, em Äkta FPLC (GE Healthcare Life Sciences – Little Chalfont, Buckinghamshire). As análises por *SDS-PAGE* de alíquotas (10  $\mu$ L) das frações cromatográficas podem ser vistas nas figuras 29 e 30. Para baculovírus-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT as condições que propiciaram o maior rendimento, por pico mais intenso do cromatograma (fração 26), foram MDI 10 / 48 h. Para as condições MDI 3 / 48 h o rendimento do pico mais intenso (fração 32) foi pouco inferior. Entretanto, o número de frações enriquecidas derivadas das condições MDI 3 / 48 h é maior que o número de frações enriquecidas derivadas das condições MDI 3 / 48 h é maior que o número de frações enriquecidas das condições MDI 10 / 48 h. Ou seja, em termos de quantidade total de proteína, o melhor conjunto de condições para a expressão de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT é MDI 3 / 48 h. Além disso, a proteína recombinante obtida nas condições MDI 10 / 48 h possui mais contaminantes que a obtida nas condições MDI 3 / 48 h (compare as figuras 29A e 29B). Já o conjunto de condições MDI 2 / 24 h não apresentou rendimento satisfatório desde a análise por *SDS-PAGE* e foi prontamente abandonado (figura 29C).



Figura 29 – Testes de expressão e purificação de His<sub>6</sub>-S6K1a2T389EACT mediada por baculovírus em células *High Five.* Foram aplicados em cada canaleta 10  $\mu$ L de frações de 1,0 mL, indicadas por números no topo das figuras. Do extrato solúvel bruto (E) foram aplicados 18  $\mu$ L. (A) *SDS-PAGE* do teste com MDI 2 / 24 h de incubação. (B) *SDS-PAGE* do teste com MDI 3 / 48 h de incubação. (C) *SDS-PAGE* do teste com MDI 10 / 48 h de incubação. Géis de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular; F.T., *flow-through*; L, lavagem.

Para baculovírus-CDPDPK1 as condições que propiciaram o maior rendimento, por pico mais intenso do cromatograma, foram MDI 3 / 24 h. Os demais conjuntos de condições não apresentaram rendimento satisfatório desde a análise por *SDS-PAGE* e foram abandonados (compare as fotos dos géis na figura 30).



Figura 30 – Testes de expressão e purificação de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 mediada por baculovírus em células *High Five*. Foram aplicados em cada canaleta 10  $\mu$ L de frações de 1,0 mL, indicadas por números no topo das figuras. Do extrato solúvel bruto (E) foram aplicados 18  $\mu$ L. (A) *SDS-PAGE* do teste com MDI 3 / 24 h de incubação. (B) *SDS-PAGE* do teste com MDI 3 / 48 h de incubação. (C) *SDS-PAGE* do teste com MDI 10 / 48 h de incubação. Géis de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular; Tp, tampão de amostra aplicado; F.T., *flow-through*; L, lavagem.

Após a purificação inicial por cromatografia de afinidade por íon imobilizado, as frações ricas em His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 foram reunidas em *pools* e aplicadas em cromatografia de troca catiônica em coluna de heparina, conforme Keshwani *et al.* (2009). Alíquotas (10 µL) das frações produzidas nessa segunda etapa foram analisadas por *SDS-PAGE* (figura 31), novamente reunidas em *pools* e submetidas à concentração e troca de tampão em Amicon (obtido da Millipore – Billerica, Massachusetts). É interessante observar que as proteínas recombinantes não se ligam à coluna de heparina nas condições de purificação adotadas, isto é, são eluídas no *flowthrough*. Ao fim de todo processo, obteve-se 500 µL de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT 184,0 µg.mL<sup>-1</sup> e 500 µL de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 109,5 µg.mL<sup>-1</sup>. Portanto, o rendimento final foi de 92 µg de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e 54,8 µg de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 para 0,5 L de cultura.



Figura 31 – Purificação de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 por cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap Heparin HP. As frações analisadas estão indicadas por números no topo das figuras. Ambas as proteínas foram eluídas no *flow-through* da cromatografia. (A) *SDS-PAGE* de frações da purificação de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. (B) *SDS-PAGE* de frações da purificação de His<sub>6</sub>-CDPDPK1. Géis de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular.

A proteína His<sub>6</sub>-CDPDPK1, obtida com nível de pureza satisfatório, foi também submetida à análise por espectroscopia de dicroísmo circular, para determinação da composição de estrutura secundária do polipeptídio. O mesmo procedimento não foi adotado para His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, pois essa proteína estava presente em duas formas ao término da purificação. Os dados coletados nessa análise foram convertidos de *mdeg (milidegrees,* isto é, miligraus) para elipticidade molar residual média (deg.cm<sup>2</sup>.dmol<sup>-1</sup>) e plotados contra o comprimento de onda (nm) do feixe de luz incidente, resultando no espectro apresentado na figura 32. Esses dados de elipticidade também foram enviados para processamento pelo algoritmo CDSSTR do portal DichroWeb (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml), que estimou a composição de estrutura secundária de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 em, aproximadamente, 6% de  $\alpha$ -hélices, 34% de folhas- $\beta$ , 25% de voltas e 31% de estrutura desordenada.



Figura 32 – Espectro de dicroísmo circular de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 heterologamente expressa em células de inseto *HighFive*. A amostra analisada estava em concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> e foi purificada por cromatografia de afinidade por íon imobilizado e cromatografia de troca catiônica em coluna de heparina.

Após o estabelecimento do protocolo de purificação das proteínas recombinantes, restou descobrir se elas eram fosforiladas durante a expressão em células de inseto. Para tanto, as proteínas recombinantes foram analisadas por *SDS-PAGE* e submetidas à coloração especial para identificação de fosfoproteínas com o corante *Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain* (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia). Para fins de comparação, o mesmo gel de *SDS-PAGE* foi subseqüentemente corado com *SYPRO Ruby Protein Gel Stain* (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia), corante inespecífico de proteínas compatível com o *Pro-Q Diamond*. Observou-se que o corante específico de fosfoproteínas corou as bandas de ambas as proteínas recombinantes, mas não teve qualquer efeito sobre as bandas do gel, inclusive as do padrão e de alguns contaminantes, foram coradas no passo seguinte de coloração com corante inespecífico de proteínas (figura 33). Portanto, esse experimento sugeriu que His<sub>6</sub>-S6K1a2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 são fosforiladas *in vivo* durante a expressão em células de inseto, porém, em poucos resíduos de aminoácidos, dada a baixa intensidade da coloração com *Pro-Q Diamond* (essa intensidade é proporcional à quantidade de proteínas e ao número de resíduos fosforilados presentes).



**Figura 33** – *SDS-PAGE* de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 e His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT com coloração específica para evidenciação de bandas de fosfoproteínas e coloração inespecífica. O mesmo gel foi utilizado nas duas colorações, para efeito de comparação. (A) Coloração específica para evidenciação de bandas de fosfoproteínas (corante *Pro-Q Diamond*). (B) Coloração inespecífica para evidenciação de todas as proteínas (corante *SYPRO Ruby*). Géis de acrilamida 12%. C, His<sub>6</sub>-CDPDPK1; S, His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT; P1, padrão de massa molecular *BenchMark* (Invitrogen – Carlsbad, Califórnia); P2, padrão de massa molecular *PageRuler* (Fermentas – Burlington, Ontário).

Para confirmar definitivamente a identidade das proteínas recombinantes expressas em células de inseto, ambas foram submetidas a SDS-PAGE, tripsinizadas em gel e analisadas por MS/MS em espectrômetro ESI-Q-Tof (quadrupole - time of flight). Os espectros obtidos foram submetidos à análise no algoritmo Mascot, um programa que usa os dados gerados por MS/MS para identificar proteínas partir de bancos de dados protéicas primárias а com estruturas (http://www.matrixscience.com/search\_form\_select.html). Os parâmetros de busca ajustados para a identificação foram (1) pesquisa por íons em MS/MS (tipo de busca); (2) tripsina como agente de hidrólise; (3) possibilidade de omissão de um sítio de clivagem pela tripsina; (4) carbamidometilação como modificação fixa dos peptídeos trípticos; (5) oxidação de resíduos de metionina e fosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina como modificações variáveis; (6) sem restrição de massa para a proteína analisada; (7) tolerância de massa de  $\pm 0.1$  Da. Os peptídios trípticos de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (as duas bandas do gel da figura 31A) e His<sub>6</sub>-CDPDPK1, cujas fragmentações foram identificadas pelo Mascot, estão listados nas tabelas 17 e 18. A cobertura da análise de MS sobre a sequência das proteínas recombinantes pode ser vista na figura 34. O número de peptídios encontrados com fragmentações que se igualam (com uma pequena margem de erro) aos espectros de fragmentação teóricos (gerados in silico) foi significativo e confirma a identidade das proteínas recombinantes.

Pentídios	Replicatas		m/z	7
i epitulos	1	2	111/2	L
LLVLDATK	+	+	436,7839	2
LDHPFFVK	+	-	334,8693	3
LLVLDATKR	+	+	514,8334	2
EYAIKILEK	+	+	553,8437	2
VLSPESKQAR	+	-	372,2268	3
RPEDFKFGK	+	+	375,2142	3
AGNEYLIFQK	+	+	591,8129	2
IGSFDETCTR	+	+	593,2663	2
ELATSREYAIK	+	+	427,5812	3
KIGSFDETCTR	-	+	438,5573	3
IIKLEYDFPEK	+	+	465,6100	3
ILGEGSFSTVVLAR	+	+	724,9043	2
DLVEKLLVLDATK	+	+	728,9403	2
LGCEEMEGYGPLK	+	+	749,8414	2
DVMSRLDHPFFVK	+	+	536,2893	3
RLGCEEMEGYGPLK	+	+	552,2716	3
FYTAEIVSALEYLHGK	+	+	614,3363	3
ANSFVGTAQYVSPELLTEK	+	+	1067,4740	2
QARANSFVGTAQYVSPELLTEK	+	-	830,4185	3
ANSFVGTAQYVSPELLTEKSACK	+	+	860,7469	3
DLKPENILLNEDMHIQITDFGTAK	+	+	693,6078	4

**Tabela 17** – Lista de peptídios trípticos resultantes da identificação da proteína recombinante His<sub>6</sub>-CDPDPK1 expressa em células de inseto. O símbolo "+" significa presença e o "-", ausência.

Banda	Peptídios	Rep	licatas	m/z	Z
		1	2		
Inferior	TIDKILK	+	+	277,5296	3
	LTDFGLCK	-	+	477,2370	2
	GGYGKVFQVR	+	-	370,8913	3
	FEISETSVNR	+	+	591,3073	2
	HINWEELLAR	+	+	640,8327	2
	IRPECFELLR	+	+	444,9119	3
	LNLPPYLTQEAR	+	+	707,8833	2
	KVEPPFKPLLQSEEDVSQFDSK	+	+	849,7595	3
	VEPPFKPLLQSEEDVSQFDSKFTR	+	-	706,6249	4
	AVDWWSLGALMYDMLTGAPPFTGENR	+	+	977,4584	3
	ESIHDGTVTHTFCGTIEYMAPEILMR	+	-	756,8647	4
Superior	TIDKILK	+	+	277,5296	3
	LTDFGLCK	+	+	477,2370	2
	GGYGKVFQVR	+	+	370,8913	3
	FEISETSVNR	-	+	591,3075	2
	HINWEELLAR	+	-	640,8327	2
	IRPECFELLR	+	+	444,9119	3
	VTGANTGKIFAMK	+	+	451,9281	3
	LNLPPYLTQEAR	+	+	707,8833	2
	FEISETSVNRGPEK	+	+	531,6150	3
	CKLNLPPYLTQEAR	+	+	568,3142	3
	GPEKIRPECFELLR	+	-	581.9978	3
	LGAGPGDAGEVQAHPFFR	+	+	609,3065	3
	DLKPENIMLNHQGHVK	+	+	472,9957	4
	KVEPPFKPLLQSEEDVSQFDSK	+	+	849,7595	3
	AVDWWSLGALMYDMLTGAPPFTGENR	+	+	977,4584	3
	ESIHDGTVTHTFCGTIEYMAPEILMR	-	+	760,8671	4

**Tabela 18** – Lista de peptídios trípticos resultantes da identificação das duas bandas da proteína recombinante  $His_6$ -S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT expressa em células de inseto. O símbolo "+" significa presença e o "-" ausência.

### Α

MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGSMAGVFDIDLDQPEDAGSEDELEEGGQLNESMD HGGVGPYELGMEHCEK<mark>FEISETSVNR</mark>GPEKIRPECFELLR</mark>VLGK<mark>GGYGKVFQVR</mark>KVTGAN TGKIFAMKVLKKAMIVRNAKDTAHTKAERNILEEVKHPFIVDLIYAFQTGGKLYLILEYL SGGELFMQLEREGIFMEDTACFYLAEISMALGHLHQKGIIYRDLKPENIMLNHQGHVK<mark>LT DFGLCKESIHDGTVTHTFCGTIEYMAPEILMR</mark>SGHNR<mark>AVDWWSLGALMYDMLTGAPPFTG ENR</mark>KKTIDKILKCKLNLPPYLTQEARDLLKKLLKRNAASRLGAGPGDAGEVQAHPFFR<mark>HI</mark> NWEELLARKVEPPFKPLLQSEEDVSQFDSKFTRQTPVDSPDDSTLSESANQVFLGFEYVA PSVLES-

### В

MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMGSMAGVFDIDLDQPEDAGSEDELEEGGQLNESMD HGGVGPYELGMEHCEK<mark>FEISETSVNRGPEKIRPECFELLR</mark>VLGK<mark>GGYGKVFQVR</mark>K<mark>VTGAN TGKIFAMK</mark>VLKKAMIVRNAKDTAHTKAERNILEEVKHPFIVDLIYAFQTGGKLYLILEYL SGGELFMQLEREGIFMEDTACFYLAEISMALGHLHQKGIIYR<mark>DLKPENIMLNHQGHVKLT DFGLCKESIHDGTVTHTFCGTIEYMAPEILMR</mark>SGHNR<mark>AVDWWSLGALMYDMLTGAPPFTG ENRKKTIDKILKCKLNLPPYLTQEAR</mark>DLLKKLLKRNAASR<mark>LGAGPGDAGEVQAHPFFRHI</mark> NWEELLARKVEPPFKPLLQSEEDVSQFDSK</mark>FTRQTPVDSPDDSTLSESANQVFLGFEYVA PSVLES-

### С

MSYYHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMDPEFMDGTAAEPRPGAGSLQHAQPPPQPRKK<mark>RPE DFKFGKILGEGSFSTVVLARELATSREYAIKILEK</mark>RHIIKENKVPYVTRER<mark>DVMSRLDHP FFVK</mark>LYFTFQDDEKLYFGLSYAKNGELLKYIR<mark>KIGSFDETCTRFYTAEIVSALEYLHGK</mark>G IIHR<mark>DLKPENILLNEDMHIQITDFGTAKVLSPESKQARANSFVGTAQYVSPELLTEKSAC KSSDLWALGCIIYQLVAGLPPFR<mark>AGNEYLIFQKIIKLEYDFPEK</mark>FFPKAR<mark>DLVEKLLVLD</mark> ATKRLGCEEMEGYGPLKAHPFFESVTWENLHQQTPPKLT-</mark>

Figura 34 – Cobertura da análise de *mass fingerprinting* sobre as seqüências das proteínas recombinantes analisadas. As seqüências hachuradas em amarelo correspondem aos peptídios identificados no MS/MS. (A) Cobertura da análise da banda inferior de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT sobre a seqüência da proteína recombinante. (B) Cobertura da análise da banda superior de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT sobre a seqüência da proteína recombinante. (C) Cobertura da análise de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 sobre a seqüência da proteína recombinante.

# 4.4 Análise *In Vitro* da Interação entre as Construções de S6K1 e TIPRL1, α4, Isoformas Maior e Menor de PP2A<sub>C</sub>α (*GST Pull-down*).

Como evidenciado no subtópico 4.2.2, a expressão das diversas construções de S6K1 em *E. coli* oferece rendimento suficiente para experimentos de interação *in vitro*. Portanto, prosseguiu-se ao estudo da interação de S6K1 $\alpha$ 2 e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT com as isoformas maior e menor da subunidade catalítica  $\alpha$  da proteína fosfatase 2A (PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor). A isoforma menor de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$  foi descoberta em nosso laboratório e existe em células *HeLa* (dados não publicados). Esse experimento (assim como os demais) foi realizado em colaboração com a Dra. Juliana Helena Costa Smetana e Deivid Lucas Migueleti, do nosso grupo de pesquisa. O GST *pull-down* foi realizado conforme descrição do subtópico 3.11, a partir de clones citados no subtópico 3.1. Testaram-se construções das isoformas de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$  com polihistidina no N-terminal (maior, 40 kDa; menor, 32 kDa) contra GST (27 kDa), GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> (83 kDa) e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (71,6 kDa). Os resultados do experimento podem ser visualizados na figura 35.

As figuras 35B e 35C confirmam que todas as construções testadas estavam presentes nas frações solúveis dos clones empregados, antes da purificação em banho com resina *Glutathione Sepharose*. A figura 35E, por sua vez, atesta que a GST e todas as construções com essa proteína ligaram-se satisfatoriamente à resina *Glutathione Sepharose*. Finalmente, a figura 35F demonstra o resultado dos testes de interação propriamente ditos. Como esperado, His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) não interagem com GST, demonstrando que as interações observadas nos demais ensaios devem-se exclusivamente à porção das proteínas de fusão que não se liga à resina. A construção His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) não interage com GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> (a única banda que aparece no *western blot* correspondente é da própria GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub>), embora interaja fortemente com GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. Por sua vez, a construção His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) interage fracamente com todas as construções testadas, GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub>, GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e GST-TIPRL1 (utilizada como controle positivo de interação da isoforma menor de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ ).

Pelos resultados obtidos, a interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) e S6K1 $\alpha$ 2 independe do carboxiterminal da quinase, pois o resultado do teste de interação com S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT é semelhante ao teste com S6K1 $\alpha$ 2 inteira, e ambos são semelhantes ao controle positivo (TIPRL1). Testes de interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e as construções de S6K1 também foram realizados, para permitir uma comparação direta entre os comportamentos de ambas as isoformas de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ . Conseqüentemente, o perfil da interação de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) com as construções de S6K1 é radicalmente diferente do observado para PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor). A isoforma maior não interage com S6K1 $\alpha$ 2 inteira (ao contrário da isoforma menor), a menos que o carboxiterminal seja truncado e/ou haja uma mutação que mimetize o estado fosforilado por mTOR no resíduo 389. De fato, a interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foi a mais intensa observada no experimento.



Figura 35 – GST *pull-down* para estudo da interação entre as isoformas maior e menor de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$  e as construções de S6K1. As frações protéicas solúveis anteriores à purificação em banho foram analisadas por *SDS*-*PAGE* e *western blot* com anticorpos primários anti-GST e anti-His<sub>6</sub> (**A**, **B**, **C**). As frações solúveis que permaneceram ligadas à resina *Glutathione Sepharose* após a purificação foram analisadas da mesma forma (**D**, **E**, **F**). (**A**) *SDS-PAGE* das frações protéicas solúveis dos clones empregados. (**B**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (**C**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (**D**) *SDS-PAGE* das frações protéicas solúveis que permaneceram ligadas à resina. (**E**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* das frações protéicas solúveis que permaneceram ligadas à resina. (**E**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. (**G**) *SOS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. Géis de acrilamida 10%. P, padrão de massa molecular; Tp, tampão de amostra aplicado; G, GST; α2, S6K1α2;  $\Delta$ CT, S6K1α2T389E $\Delta$ CT; T, TIPRL1; 1, GST-TIPRL1; 2, GST-S6K1α2-His<sub>6</sub>; 3, GST-S6K1α2T389E $\Delta$ CT; 4, His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub>α(maior); 5, His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub>α(menor); 6, GST.

Outro conjunto de experimentos foi realizado para averiguar as possíveis interações de S6K1 $\alpha$ 2 e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT com a proteína reguladora TIPRL1. Testou-se a construção His<sub>6</sub>-TIPRL1 (33,3 kDa) contra GST (27 kDa), GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> (83 kDa) e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (71,6 kDa). Os resultados do experimento podem ser visualizados na figura 36.

As figuras 36B e 36C confirmam que todas as construções testadas estavam presentes nas frações solúveis dos clones empregados, antes da purificação em banho com resina Glutathione Sepharose. A figura 36E, por sua vez, atesta que a GST e todas as construções com essa proteína ligaram-se satisfatoriamente à resina *Glutathione Sepharose*. Finalmente, a figura 36F demonstra o resultado dos testes de interação propriamente ditos. Como esperado, His<sub>6</sub>-TIPRL1 não interage com GST, demonstrando que as interações observadas nos demais ensaios devem-se exclusivamente à porção das proteínas de fusão que não se liga à resina. De fato, His<sub>6</sub>-TIPRL1 interage fracamente com GST-S6K1α2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT. Embora essa interação seja fraca, não é um artefato, pois os controles de interação com a resina atestam que His<sub>6</sub>-TIPRL1, mesmo presente em alta concentração, não se liga à resina de glutationa. Os controles positivos (C+) de interação com a resina consistiram de purificações em banho de GST, GST-S6K1α2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT na ausência de His<sub>6</sub>-TIPRL1. Como pode ser observado nas figuras 36B e 36C, essas construções estavam presentes tanto no extrato solúvel, antes da purificação com a resina, quanto no eluato da purificação. O controle negativo (C-) de interação com a resina, por sua vez, consistiu de purificações em banho de His<sub>6</sub>-TIPRL1 sozinha. Como também pode ser observado na figura abaixo, essa construção estava presente no extrato solúvel, mas nenhum traço dela foi encontrado no eluato. A amostra denominada de Tc ("His<sub>6</sub>-TIPRL1 controle") corresponde ao extrato solúvel bruto, onde se encontrava His<sub>6</sub>-TIPRL1, não submetido à incubação com a resina (foi colocado na figura 36F como controle do anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>). Tomados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a interação entre TIPRL1 e S6K1 $\alpha$ 2 independe do carboxiterminal da quinase e da mutação T389E (mimetização do estado fosforilado por mTOR), pois o resultado do teste de interação com S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT é semelhante ao do teste com S6K1 $\alpha$ 2 inteira.



Figura 36 – GST *pull-down* para estudo da interação entre TIPRL1 e as construções de S6K1. As frações protéicas solúveis anteriores à purificação em banho foram analisadas por *SDS-PAGE* e *western blot* com anticorpos primários anti-GST e anti-His<sub>6</sub> (**A**, **B**, **C**). As frações solúveis que permaneceram ligadas à resina *Glutathione Sepharose* após a purificação foram analisadas da mesma forma (**D**, **E**, **F**). (**A**) *SDS-PAGE* das frações protéicas solúveis dos clones empregados. (**B**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (**C**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (**C**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (**C**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (**F**) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GSC, GST, α2, S6K1α2; ΔCT, S6K1α2T389EΔCT; T, TIPRL1; Tc, extrato solúvel com His<sub>6</sub>-TIPRL1 não incubado com resina de glutationa (controle do anticorpo anti-His<sub>6</sub>); 1, His<sub>6</sub>-TIPRL1; 2, GST.

Finalmente, um último conjunto de experimentos foi realizado para averiguar as possíveis interações de S6K1 $\alpha$ 2 e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT com a proteína reguladora  $\alpha$ 4. Testou-se a construção His<sub>6</sub>- $\alpha$ 4 (39,5 kDa) contra GST (27 kDa), GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> (83 kDa) e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (71,6 kDa). Os resultados do experimento podem ser visualizados na figura 37.

As figuras 37B e 37C confirmam que todas as construções testadas estavam presentes nas frações solúveis dos clones empregados, antes da purificação em banho com resina *Glutathione Sepharose*. A figura 37E, por sua vez, atesta que a GST e todas as construções com essa proteína ligaram-se satisfatoriamente à resina *Glutathione Sepharose*. Finalmente, a figura 37F demonstra o resultado dos testes de interação propriamente ditos. Como esperado, His<sub>6</sub>- $\alpha$ 4 não interage com GST, demonstrando que as interações observadas nos demais ensaios devem-se exclusivamente à porção das proteínas de fusão que não se liga à resina. Contudo, His<sub>6</sub>- $\alpha$ 4 também não interage com GST-S6K1 $\alpha$ 2-His<sub>6</sub> e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. De fato, a literatura relata que essa interação realmente não ocorre (subtópico 5.4).



Figura 37 – GST *pull-down* para estudo da interação entre a4 e as construções de S6K1. As frações protéicas solúveis anteriores à purificação em banho foram analisadas por *SDS-PAGE* e *western blot* com anticorpos primários anti-GST e anti-His<sub>6</sub> (A, B, C). As frações solúveis que permaneceram ligadas à resina *Glutathione Sepharose* após a purificação foram analisadas da mesma forma (D, E, F). (A) *SDS-PAGE* das frações protéicas solúveis dos clones empregados. (B) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (C) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (C) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (C) *western blot* referente à *SDS-PAGE* A com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-GST. (F) *western blot* referente à *SDS-PAGE* D com anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>. Géis de acrilamida 12%. P, padrão de massa molecular; Tp, tampão de amostra aplicado; G, GST; α2, S6K1α2; ΔCT, S6K1α2T389EΔCT; 1, His<sub>6</sub>-α4; 2, GST.

# 4.5 Micro-ensaio Colorimétrico de Atividade de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT (Imunoensaio Enzimático)

O modelo de ensaio enzimático foi realizado com os tampões, concentrações de proteínas (quinases e substratos) e passos descritos no subtópico 3.18. Contudo, não produziu resultados aproveitáveis, visto que todos os testes apresentaram absorbância em torno de 0,1 a 630 nm e 0,08 a 490 nm (os poços vazios apresentaram ~0,03 a 630 nm e ~0,04 a 490 nm). Esses valores de *background* devem-se à interação inespecífica do anticorpo secundário conjugado à peroxidase com o material constituinte dos poços da microplaca de ELISA. De fato, visualmente todos os poços empregados no ensaio apresentaram cores azul e amarela de mesma intensidade (figura 38). Portanto, para que o ensaio alcance resultados satisfatórios, tanto a ativação da quinase quanto a ligação do substrato devem ser padronizadas.



**Figura 38** – **Resultado do Micro-ensaio colorimétrico de atividade de His<sub>6</sub>-S6K1\alpha2T389E\DeltaCT. (A) Foto da microplaca momentos antes da interrupção da reação da peroxidase, quando a absorbância dos poços foi lida a 630 nm. (B) Foto da microplaca após a interrupção da reação da peroxidase pela adição de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 mol.L<sup>-1</sup>, quando a absorbância dos poços foi lida a 490 nm.** 

### 5 DISCUSSÃO

#### 5.1 Pesquisa de mRNAs de novas Isoformas de S6K1em Células HeLa

A análise da estrutura primária e a predição dos domínios das duas formas incomuns de S6K1, isoladas durante a clonagem, revelam características comuns a ambas as formas. As duas adicionam peptídeos de 12 resíduos de aminoácidos antes dos códons de término e truncam S6K1 antes da porção carboxiterminal, caracterizada por ser regulatória e desestruturada. Contudo, o cDNA com inserção de 75 pb (isolado da biblioteca de cérebro fetal) interrompe a proteína consensual aproximadamente no meio do sítio catalítico, enquanto o cDNA com inserção de 185 pb (isolado da biblioteca de HeLa) a interrompe logo após o sítio de Ser/Thr quinase. Nesse sentido, o polipeptídio hipotético referente ao cDNA incomum isolado da biblioteca de HeLa assemelha-se à construção S6K1a2T389EACT, idealizada por Keshwani et al., 2008. Ambas as seqüências truncam S6K1 imediatamente após o domínio catalítico e não possuem o domínio auto-inibitório carboxiterminal (AID), que deve ser fosforilado por mTOR em diversos sítios antes que a quinase seja fosforilada por PDPK1 e atinja seu nível máximo de atividade (Isotani et al., 1999; Alessi et al., 1998; Pullen et al., 1998; Jastrzebskik et al., 2007). Portanto, num contexto celular, pode-se sugerir que o polipeptídio hipotético referente ao cDNA de HeLa e a construção S6K1a2T389EACT seriam natural e parcialmente ativados. Os gráficos resultantes das predições do SMART para S6K1a1, S6K1 $\alpha$ 2, S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e os peptídeos hipotéticos citados acima podem ser visualizados na figura 39.

Embora a amplificação persistente e específica dos cDNAs incomuns de bibliotecas de cérebro fetal e HeLa sugerisse que as formas correspondentes de mRNA fossem constituintes normais das células que originaram as bibliotecas, era preciso um indício de que eventos desse tipo são plausíveis em mamíferos. Dessa forma, Karni *et al.* (2007) demonstraram que a superexpressão do fator de *splicing* alternativo SF2/ASF origina uma isoforma oncogênica de S6K1 com o carboxiterminal truncado (chamada "isoforma-2", que não deve ser confundida com S6K1α2 ou S6K2), tanto em camundongos e ratos quanto em humanos (a organização do gene e seu mecanismo de *splicing* é semelhante nas três espécies). A superexpressão da "isoforma-2" em células NIH 3T3 provocou a transformação dessas células, que passaram a formar colônias em placas de ágar mole, assim como as células que superexpressavam SF2/ASF. As células com superexpressão da isoforma normal de S6K1 não formaram colônias e a supressão da "isoforma-2" por meio de shRNAs

reverteu a transformação de células que superexpressavam SF2/ASF. De fato, observou-se que há uma correlação positiva entre o nível de expressão de SF2/ASF e a razão "isoforma-2"/S6K1 em tumores de pulmão. Interessantemente, a "isoforma-2" de camundongos possui seqüências do íntron 6, assim como o cDNA incomum isolado da biblioteca de cérebro fetal humano, além de uma seqüência do íntron 7.



Figura 39 - Resultados gráficos do algoritmo SMART após análise estrutural in silico das seqüência primárias das várias formas de S6K1 e polipeptídios hipotéticos. O domínio S\_TKc (pentágono azul) é o domínio catalítico de Ser/Thr quinases, o S TK X (quadrado azul) é o domínio de extensão de Ser/Thr quinases e o STYKc (pentágono vermelho claro) é o domínio de proteína quinase com especificidade indeterminada. Os pequenos quadrados e retângulos azuis indicam regiões de desordem intrínseca. A linha cinza representa regiões de estrutura desconhecida após análise in silico. A escala representada acima da figura, em resíduos de aminoácidos, é válida para todos os polipeptídios representados. (A) Proteína quinase S6K1a1. As linhas verticais indicam as junções entre os éxons na sequência primária e a posição exata do último aminoácido do éxon. O primeiro retângulo azul da região N-terminal corresponde ao sinal de localização nuclear da isoforma α1. Note a presença de várias regiões de desordem intrínseca no C-terminal da proteína, correspondentes ao AID. (B) Proteína quinase S6K1 $\alpha$ 2, idêntica à isoforma a1, a não ser pela inexistência do sinal de localização nuclear no N-terminal. (C) Construção S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, idêntica à isoforma  $\alpha$ 2, a não ser pela inexistência da região carboxiterminal (AID) e pela substituição de Thr<sub>389</sub> por Glu, inserida para mimetizar o estado fosforilado por mTOR. (D) Polipeptídio hipotético referente ao cDNA incomum isolado da biblioteca de HeLa, idêntico à isoforma  $\alpha$ 1, a não ser pela inexistência do carboxiterminal, aspecto que o torna semelhante à construção S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. (E) Polipeptídio hipotético referente ao cDNA incomum isolado da biblioteca de cérebro fetal humano, que corresponde à isoforma α2 truncada aproximadamente no meio do domínio catalítico de Ser/Thr quinase.

Diante de todas as hipóteses lançadas e dos resultados de outros grupos de pesquisa, recorreuse ao experimento de *Nested* PCR para provar a existência do mRNA incomum em células HeLa. Todavia, nenhuma banda diferente da obtida para o controle positivo (cDNA de S6K1 consensual) foi observada. Possivelmente, a estratégia utilizada para detecção da forma incomum de cDNA em células HeLa não era suficientemente sensível, apesar da amplificação persistente a partir da biblioteca de cDNA obtida da Clontech. Provavelmente, a extração com reagentes específicos para obtenção de mRNA a partir das células (a exemplo do *Oligotex*, da QIAGEN – Valencia, Califórnia), ao invés da extração de RNA total, permitiria a síntese de um conjunto de cDNAs mais representativo do *pool* existente nas células HeLa, aumentando a sensibilidade do *Nested* PCR. Alternativa ao aumento de sensibilidade da detecção seria o emprego de qPCR para diferenciar as formas comum e incomum de cDNAs. Por fim, resta a possibilidade de que os cDNAs encontrados na biblioteca de cDNA de HeLa sejam artefatos, originados a partir de pré-mRNAs captados durante o preparo da biblioteca.

#### 5.2 Expressão em *E. coli* e Purificação de Proteínas Heterólogas

#### 5.2.1 Testes de Expressão de GST-S6K1α1-His<sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT

Os resultados dos testes de expressão demonstram claramente que as construções de S6K1 testadas têm sua solubilidade aumentada em induções a baixas temperaturas, embora o rendimento total da expressão seja diminuído. Ou seja, a quantidade de proteína recombinante na fração solúvel é incrementada, mas a quantidade na fração insolúvel é reduzida numa extensão superior à do incremento observado na fração solúvel.

Outros fatores que ajudam a solubilizar a proteína recombinante são a cepa de *E. coli* e as construções truncadas dessas proteínas. De fato, a cepa Arctic Express possibilita uma expressão superior de todas as construções de S6K1 na fração solúvel, se comparada à cepa BL21 (DE3), graças à superexpressão da chaperonina *Cpn60* de *Oleispira antarctica* em baixas temperaturas. A princípio, esse aumento de solubilidade foi observado apenas na estratégia de simples expressão de GST-S6K1 $\alpha$ 1-His<sub>6</sub>, e só foi estendido para a estratégia de co-expressão quando as construções truncadas das proteínas recombinantes foram empregadas. De fato, por não possuir o NLS no aminoterminal e o domínio auto-inibitório no carboxiterminal, caracterizadas por serem regiões desestruturadas, a construção S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT (expressa em fusão com GST) é mais solúvel que

GST-S6K1α1-His<sub>6</sub>. Por semelhante modo, a construção CDPDPK1 (também expressa em fusão com GST) é mais solúvel que GST-PDPK1, pois possui apenas o domínio catalítico de PDPK1 e não contém o *pleckstrin homology domain* (PH), de interação com a membrana. Por fim, os testes de expressão não foram eficazes em apontar quais os melhores meio de cultura e indutor para expressão das construções de S6K1, logo, testes em escala maior tornaram-se necessários para essa distinção.

#### 5.2.2 Testes de Purificação de GST-S6K1α1-His<sub>6</sub> e GST-S6K1α2T389EΔCT

Os resultados dos testes de purificação indicam que o sistema bacteriano não é uma boa opção para expressão em grandes volumes das construções GST-S6K1 $\alpha$ 1 e GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, pois o rendimento obtido ao fim das cromatografias de afinidade por glutationa estava muito aquém dos esperado. Muitas variáveis foram testadas na tentativa de incrementar esse rendimento, mas pouco avanço foi obtido. Contudo, verificou-se que as construções truncadas eram purificadas em maior quantidade que as originais, o que recapitula os testes de expressão. Por outro lado, a estratégia de co-expressão fornecia rendimento superior ao da simples expressão, ao contrário do sugerido pelos testes de expressão.

Além disso, houve a presença persistente de um excesso de contaminantes, que poderiam complicar passos posteriores de purificação, pois eram produzidos em quantidade superior à das proteínas recombinantes. Esses contaminantes eram produtos de degradação das proteínas de fusão (ver subtópico 4.4 – resultados do *GST pull-down*) e co-purificavam na cromatografia de afinidade. Juntamente com os produtos de degradação, a chaperona *Cpn60* era um contaminante proeminente se a expressão era realizada em clones derivados da cepa Arctic Express de *E. coli*. Entretanto, a co-purificação de *Cpn60* foi eliminada mediante adaptações nos protocolos de extração e purificação (adição de ATP, KCl e MgCl<sub>2</sub> a tampões empregados nesses procedimentos). Contrariamente, os produtos de degradação persistiam, apesar da manutenção da temperatura em 4°C durante todo processo de extração, além do uso de coquetéis de inibidores de proteases nos tampões de extrato e da cromatografia.

Embora o rendimento da cromatografia em coluna de glutationa seja muito baixo para prover a quantidade de quinase necessária a aplicações em larga escala, é satisfatório para a realização de ensaios de interação *in vitro* como o GST *pull-down*. De fato, ensaios desse tipo foram realizados com sucesso neste trabalho.

# 5.2.3 Testes de Expressão de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e GST-CTRPS6

Tomados em conjunto, os resultados dos testes mostram que o nível de expressão de GST-CTRPS6 é superior ao de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, tanto na fração solúvel quanto na insolúvel. As condições em que a expressão dessas construções ocorre satisfatoriamente são iguais e correspondem a 37°C e 4 h de indução com IPTG 0,8 mmol.L<sup>-1</sup>. A diminuição da temperatura e o aumento do tempo de indução não causam variações significativas no nível de expressão de GST-CTRPS6.

# 5.2.4 Testes de Purificação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, His<sub>6</sub>-Proteína D-CysCTRPS6 e GST-CTRPS6

Os resultados dos testes de purificação indicam que o sistema bacteriano é uma boa opção para expressão em grandes volumes das construções de CTRPS6, mas na fração insolúvel. Os testes com fração solúvel proporcionaram um rendimento aquém do esperado para ambas as construções, enquanto a renaturação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 a partir da fração insolúvel rendeu quantidade satisfatória de proteína recombinante. Além disso, foi mostrado que é necessário expressar essa construção em clones derivados da cepa *E. coli* BL21 (DE3)  $\Delta sly$ D, pois caso contrário, a peptidil prolil cis/trans isomerase SlyD torna-se um contaminante recorrente de purificações por cromatografia de afinidade por cátion Ni<sup>2+</sup> imobilizado.

Contudo, os vários testes realizados com a fração solúvel originaram importantes conclusões acerca da degradação da proteína recombinante durante o processo de expressão e purificação. Tanto GST-CTRPS6 quanto His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 apresentam intensa degradação, apesar de todos os cuidados tomados para evitar esse problema (uso de coquetel de inibidores de protease no preparo do extrato a 4°C e de PMSF/benzamidina nos tampões cromatográficos). No teste II, especificamente, uma das bandas contaminantes co-purificadas possui massa muito próxima à da construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (ambas estão na faixa de 20 a 25 kDa) e é reconhecida pelo anticorpo primário anti-His<sub>6</sub>, mas não pelo anti-RPS6 (figura 18). Logo, essa banda corresponde a um polipeptídio que possui a porção His<sub>6</sub>-Proteína D, mas não possui o epítopo de RPS6 reconhecido pelo anticorpo primário anti-RPS6, compreendido entre os resíduos de lisina 200 e 249 (correspondente à região delimitada pelos resíduos Lys<sub>16</sub> e Lys<sub>65</sub> de CTRPS6), ou pelo menos não possui parte dele. Portanto, sugere-se que essa banda é um produto de degradação de His<sub>6</sub>-Proteína

D-CTRPS6 no sentido carboxi-aminoterminal, produzida ainda na bactéria, ou um produto de tradução prematuramente interrompida. A mesma banda reaparece nos resultados de todos os testes de purificação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 efetuados, independentemente das condições de expressão empregadas (compare a figura 18 com as figuras 19, 20 e 21).

No resultado da renaturação direta e gradual (teste VIII, figura 19A) de His<sub>6</sub>-Proteína D notase a presença de três bandas, dois contaminantes de ~40 kDa e ~20 kDa e a banda de His<sub>6</sub>-Proteína D (14,2 kDa), na faixa de 15 kDa. A intensidade da banda de His<sub>6</sub>-Proteína D é visivelmente superior à da banda de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 (localizada na faixa de 25 kDa na figura 21B), pois quantidades equivalentes de amostra foram aplicadas nos dois géis. O alto rendimento da renaturação de His<sub>6</sub>-Proteína D mostra que essa proteína é satisfatoriamente susceptível ao reenovelamento, logo, sugere-se que a Proteína D auxilia o re-enovelamento de CTRPS6, quando ambos estão fusionados. Além da banda da proteína de fusão de CTRPS6, a figura 21B apresenta muitas bandas de contaminantes. Entre as mais proeminentes, há uma na faixa de ~50 kDa e outras duas de ~15 kDa e ~20 kDa; as duas últimas equivalem a His<sub>6</sub>-Proteína D e um contaminante também presente na figura 21A. Por fim, há uma banda de massa muito próxima à de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6, na faixa de 20 a 25 kDa, que corresponde ao contaminante observado desde as primeiras purificações da proteína de fusão em fração solúvel. O fato de esse contaminante aparecer também nos corpos de inclusão reforça a tese de que é originado ainda na bactéria, seja por terminação prematura da tradução, seja por degradação de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 a partir do carboxiterminal. Por fim, concluiu-se que a renaturação gradual de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 possui maior rendimento que a renaturação direto, pois este método rendeu 10 mL de uma solução com 0.68 mg.mL<sup>-1</sup> de proteínas solúveis totais, enquanto aquele rendeu o mesmo volume de uma solução com 0,75 mg.mL<sup>-1</sup> de proteínas solúveis totais (quantificações realizadas pelo método do ácido bicinconínico).

#### 5.2.5 Obtenção e Caracterização de CTRPS6 e CysCTRPS6

A estratégia desenvolvida para obtenção de CTRPS6 e CysCTRPS6 apresentou bom rendimento e seus resultados reforçaram a hipótese de que há um contaminante persistente no processo de purificação do peptídeo, desde a expressão da proteína de fusão em *E. coli*. Na estratégia de obtenção, em síntese, a mistura obtida da renaturação é tratada com a protease TEV e os produtos são destinados à cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP HP (GE

Healthcare Life Sciences – Little Chalfont, Buckinghamshire), em que CTRPS6 e o contaminante persistente são separados das demais moléculas da mistura. A espectroscopia de dicroísmo circular realizada tanto com CTRPS6 quanto com CysCTRPS6 demonstrou que esses peptídios possuem uma fração significativa de estrutura secundária, o que sugere o sucesso do processo de renaturação. As amostras utilizadas nesse experimento foram idênticas às analisadas por *SDS-PAGE* e mostradas na figura 23.

Embora o rendimento máximo da clivagem em pequena escala seja obtido a 30°C por 16 h, as condições ótimas para a clivagem em volumes maiores foram estabelecidas em 4°C e 16 h, pois na temperatura mais baixa a precipitação de substrato é menor. Interessantemente, o resultado do teste (figura 22) mostra que um conjunto de proteínas é consumido durante a clivagem por TEV, como se fosse substrato, mas só é reconhecido pelo anticorpo primário anti-His<sub>6</sub> (banda 4). Se de fato essa banda fosse constituída pelo substrato (His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6), deveria ter sido reconhecido pelo anti-RPS6 também. Simultaneamente, uma banda é produzida durante a clivagem, mas não é reconhecida por nenhum dos dois anticorpos primários (banda 7). Esses eventos recapitulam a hipótese de que houve uma construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 incompleta produzida desde a expressão em bactéria, com falta de resíduos no sentido carboxi-aminoterminal, devido à degradação *in vivo* ou à interrupção prematura da tradução. Isso explicaria porque a banda 4 é identificada pelo anticorpo anti-His<sub>6</sub>, possui massa inferior ao da construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 íntegra (banda 1) e superior ao de His<sub>6</sub>-Proteína D (banda 5), e porque uma nova banda (7) de massa inferior a CTRPS6 (banda 6) surge durante a clivagem. Ou seja, a banda 4 corresponde à construção His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 incompleta, que é clivada por TEV e origina a banda 7.

A troca catiônica é eficiente para separar CTRPS6 de todos os contaminantes provenientes da renaturação e da clivagem com TEV, à exceção de um peptídeo de massa um pouco inferior. O fato de ser eluído na mesma faixa de gradiente em que CTRPS6 é eluído sugere que ambos tenham propriedades físico-químicas semelhantes. Portanto, é muito provável que o peptídeo contaminante corresponda à banda 7 do teste de clivagem, isto é, que tenha se originado da hidrólise de um produto de degradação ou tradução interrompida de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6. Essas observações, logicamente, também são válidas para CysCTRPS6 e sua proteína de fusão correspondente. A hipótese de o contaminante ser um produto de degradação foi praticamente confirmada pelas análises de MS realizadas com ambos os peptídeos, após troca iônica e dessalinização. O fato dos dois espectros apresentarem duas populações de íons (CTRPS6 ou CysCTRPS6 e o contaminante de

menor massa) já era esperado, mas as coincidências entre eles é que tornaram tal hipótese factível. Primeiramente, a diferença constante de um resíduo de cisteína entre as massas dos peptídeos maiores (CTRPS6 e CysCTRPS6) e entre as massas dos menores sugere que os menores sejam produtos de degradação dos maiores, tal qual indicado por diversos experimentos anteriores. Além disso, como o resíduo de Cisteína foi artificialmente adicionado ao aminoterminal de CysCTRPS6, sugere-se que a degradação ocorra a partir do carboxiterminal, pois esse resíduo é conservado intacto após a hidrólise, dada a persistência da diferença de 103,00 Da entre os picos menos intensos e entre os mais intensos. Por fim, se há apenas uma população de íons de menor massa, sugere-se que a quebra ocorra num único ponto da seqüência primária de ambos os peptídeos derivados de RPS6, como na hidrólise sítio-específica efetuada por diversas proteases. Essa última conclusão é apoiada ainda pelo fato de que a diferença de massa entre os peptídeos maiores e menores de ambas as amostras é constante e igual a 1564,00 Da (ver setas verdes na figura 25). Como demonstrado anteriormente, essa diferença corresponde exatamente aos quinze últimos resíduos de aminoácidos do carboxiterminal de RPS6 (SSLRASTSKSESSQK), cuja massa monoisotópica é 1563,79 Da. É a falta dessa seqüência que impede o reconhecimento do produto de degradação pelo anticorpo anti-His<sub>6</sub>, ocasionando ausência de sinal nos western-blots. Além disso, essa degradação também compromete a função de CysCTRPS6 como substrato imobilizável de S6K1 no ensaio enzimático baseado em ELISA, pois elimina os sítios de fosforilação da quinase (Ser<sub>235</sub> e Ser<sub>236</sub>, sublinhados na seqüência anterior). Portanto, no preparo do imunoensaio, é aconselhável utilizar somente as frações da troca catiônica com pequena quantidade do produto de degradação.

### 5.3 Expressão Heteróloga em Células de Inseto, Purificação e Caracterização das Proteínas Recombinantes His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1

A expressão das construções His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 foi eficientemente confirmada em células *Sf*9 e *HighFive* (figuras 27 a 31), embora a primeira linhagem tenha sido utilizada apenas para replicação dos baculovírus recombinantes e a segunda para a produção das proteínas recombinantes em grandes volumes (0,5 L de cultura em erlenmeyer, sob agitação). Em geral, as células *HighFive* permitem um rendimento maior na produção de proteínas recombinantes, se comparadas com as *Sf*9, que crescem mais lentamente. De fato, as melhores condições para produção de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 em *HighFive* foram MDI 3 e 24 h de incubação (produção de 500 µL de proteína a 109,5 µg.mL<sup>-1</sup>, após purificação), enquanto His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foi produzida em

maior quantidade com MDI 3 e 48 h de incubação (produção de 500 µL de proteína 184,0 µg.mL<sup>-1</sup>, após purificação). Interessantemente, na condição de MDI 10 e 48 h de incubação houve um grande pico de produção de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT também, porém, por menos tempo. Na condição de MDI 3 e 24 h de incubação o pico foi menor, mas por mais tempo. Isso ocorre porque com altos MDIs o desgaste da cultura é demasiado, dado o grande número de partículas virais por célula, o que ocasiona sobrecarga anabólica e rápida morte celular. Isso pode ser claramente observado no comportamento das curvas de crescimento em diferentes MDIs (figura 28): ao fim de 96 h de incubação, a viabilidade celular nas culturas de MDI 2 é de ~70%, enquanto nas de MDI 5 é de apenas ~36%. Ou seja, em MDIs altas, o pico de produção de proteína recombinante é alto, mas efêmero. Em MDIs mais baixas o pico de produção é inferior, mas mais duradouro. Outra desvantagem da expressão com altas MDIs é a presença de muitos contaminantes após a purificação, dada a extensa degradação celular que ocorre nessa condição. De fato, com MDIs mais baixas, a proteína recombinante obtida alcança nível maior de pureza já na primeira etapa de purificação (compare as figuras 29B e 29C).

Contudo, tanto em Sf9 quanto em HighFive, a expressão da construção de S6K1 apresentou um padrão com duas bandas protéicas ao invés de apenas uma, como ocorreu com His<sub>6</sub>-CDPDPK1. Os experimentos de identificação por MS/MS demonstraram que ambas as bandas de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT são construções de S6K1, assim como a banda de His<sub>6</sub>-CDPDPK1 é mesmo uma construção de PDPK1. Hipotetizou-se que a banda de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT de massa inferior correspondesse a um produto de degradação, normalmente produzido em sistemas de expressão baseados em baculovírus, dada a natureza lítica da infecção e o alto nível de comprometimento da célula infectada. Uma segunda explicação possível seria a ocorrência de modificações pós-traducionais que alteram as características físico-químicas da proteína recombinante e distorcem seu padrão de migração em SDS-PAGE. Provavelmente as células Sf9 e HighFive continham um sistema de modificação pós-traducional conservado que fosse capaz de modificar a construção recombinante. Uma possibilidade em especial era a existência de uma via de sinalização promíscua, que acabasse por fosforilar e ativar  $His_6$ -S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. Esse evento já havia sido descrito na expressão heteróloga de S6K1 de rato em células Sf9 (Kozma et al., 1993), logo, como a S6K1 de rato e humana são extremamente semelhantes, é possível que parte do pool de His<sub>6</sub>-S6K1a2T389EACT tivesse sido fosforilado e ativado in vivo. Além disso, o sistema de expressão mediada por baculovírus em células de inseto é reconhecidamente capaz de produzir quinases recombinantes em diversos estados de fosforilação, segundo Wang *et al.* (2008).

# 5.4 Análise *In Vitro* da Interação entre as Construções de S6K1 e TIPRL1, α4, Isoformas Maior e Menor de PP2A<sub>C</sub>α (*GST Pull-down*).

As interações da isoforma menor de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$  fazem parte de uma caracterização inicial da rede de interações dessa proteína, cuja existência e funcionalidade estão em processos de validação no nosso grupo de pesquisa (Smetana & Zanchin, 2007). O teste de interação de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) com as construções de S6K1 é de particular interesse, porque permite a comparação com a interação da isoforma maior com S6K1 $\alpha$ 2, descrita há bastante tempo na literatura (Ferrari *et al.*, 1993; Westphal *et al.*, 1999; Peterson, 1999; Yamashita *et al.* 2005). Os resultados mostraram que a isoforma menor de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$  interage com menor afinidade e igualmente com as formas íntegra e truncada de S6K1 $\alpha$ 2, tal qual com TIPRL1 (controle positivo).

Entretanto, foram os resultados da análise de interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e construções de S6K1a2 que geraram os resultados mais interessantes. Embora não se tenha observado interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) e S6K1 $\alpha$ 2, a interação entre a isoforma maior e S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT foi observada no experimento, indicando maior afinidade entre essas duas proteínas. Esse último resultado é interessante porque parece complementar descobertas de outros pesquisadores. Em 1995, Cheatham et al. observaram sensibilidade limitada à rapamicina em linhagens derivadas de células NIH 3T3, clones estáveis que superexpressavam HA-S6K1a2 truncada no C-terminal (construção -CT dotada dos resíduos 1-402). Diversos pesquisadores já demonstraram que a rapamicina inibe S6K1 $\alpha$ 2 a níveis de atividade inferiores ao basal, em diversas células de mamíferos (Chung et al., 1992; Calvo et al., 1992; Kuo et al., 1992; Price et al., 1992), contudo, a construção -CT de Cheatham (1995) era inibida apenas até o nível basal. Interessantemente, no mesmo estudo foi observado que a HA-S6K1α2 truncada tanto no amino quanto no carboxiterminal (construção -NT/-CT dotada dos resíduos 31-402) era ativada em resposta à estimulação por soro, mas não era inativada por rapamicina. Portanto, a presença do N-terminal é importante para a regulação negativa de S6K1, enquanto o C-terminal parece não ser. Uma vez que PP2A<sub>C</sub>α(maior) interage muito bem com a construção S6K1a2T389EACT e não interage com a quinase inteira, sugere-se que essa fosfatase necessita do aminoterminal de S6K1 para efetivar a interação. Isso explicaria porque a construção -CT de Cheatham (1995) é inativada por tratamento com rapamicina, enquanto a construção -NT/-CT não o é, já que a PP2A ativa é conhecida por desfosforilar e inativar S6K1.

Estudos como o de Cheatham (1995) ajudaram a propor o modelo de ativação passo-a-passo de S6K1, em que essa quinase é fosforilada sucessivamente por outras quinases à jusante, até atingir seu estado mais ativo. De fato, o carboxiterminal de S6K1 possui um domínio auto-inibitório (AID) que precisa ser fosforilado por mTOR nos resíduos Ser<sub>411</sub>, Ser<sub>418</sub>, Thr<sub>421</sub>, e Ser<sub>424</sub>, a fim de perder sua capacidade inibitória e liberar o acesso a outros sítios de fosforilação existentes nos domínios catalítico, de ligação e hidrofóbico (mais centrais). O sítio do domínio catalítico é o Thr<sub>229</sub>, fosforilado por PDPK1, e os sítios do domínio de ligação e hidrofóbico são os resíduos Ser<sub>371</sub> e Thr<sub>389</sub>, respectivamente, fosforilados pela própria mTOR (revisado por Jastrzebskik *et al.*, 2007). Portanto, mTOR exerce extensivo controle sobre S6K1, pois é determinante em sua ativação e também o é em sua desativação, por meio da PP2A. Sabe-se que a desativação de mTOR por rapamicina culmina na ativação de PP2A (Peterson *et al.*, 1999), embora não se conheça exatamente o mecanismo pelo qual a mTOR inibida ativa PP2A (modelos que envolvem a proteína *a*4 têm sido propostos, e possivelmente a TIPRL1 também esteja envolvida, segundo Gingras *et al.*, 2001 e 2005).

O mecanismo de ativação e desativação de S6K1, aliado ao resultado deste experimento, poderia explicar porque a construção -CT de Cheatham (1995) exibe sensibilidade limitada à rapamicina. Como possui aminoterminal intacto, a construção -CT interagiria muito bem com a PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior), o que garantiria a desfosforilação dos sítios críticos dos domínios centrais, levando a construção a um estado quase inativo. A inibição não seria completa, pois -CT não possui AID, que exerce efeito inibitório quando desfosforilado. Logo, a desativação de -CT se deveria exclusivamente à desfosforilação dos sítios críticos centrais, pois não existiria a contribuição do AID para a inibição. Ou seja, o nível de desativação de -CT jamais seria máximo, ao contrário do que ocorreria com a S6K1 inteira, que possui AID.

Os dados discutidos acima sugerem que a PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) interage melhor com a construção de S6K1 que mimetiza o estado parcialmente ativo dessa quinase (S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT), em consonância com o fato de PP2A<sub>C</sub>(maior) ser a fosfatase de S6K1. Além disso, sugere-se também que a forma inativa (desfosforilada) não interage com PP2A<sub>C</sub>(maior), pois a S6K1 $\alpha$ 2 expressa em bactéria (inativa e, portanto, desfosforilada) não interage com PP2A<sub>C</sub>(maior) nos ensaios de GST *pull-down*. Uma vez que as proteínas TIPRL1 e  $\alpha$ 4 também interagem com PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior), procurou-se entender o efeito de ambas sobre S6K1 $\alpha$ 2 por meio de PP2A. Para tanto, inicialmente testou-se a interação direta das construções de S6K1 com TIPRL1 e  $\alpha$ 4 em novos experimentos de GST *pull-down*. Como resultado, a proteína  $\alpha$ 4 não apresentou interação com qualquer uma das formas de S6K1. Isso já era esperado e recapitula o trabalho de Yamashita *et al.* (2005), que demonstra a existência do complexo ternário S6K1 $\alpha$ 2-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ - $\alpha$ 4 em células B de rato ativadas por lipopolissacarídeo (LPS), mas exclui a possibilidade de interação direta entre S6K1 $\alpha$ 2 e  $\alpha$ 4. Entretanto, observou-se pela primeira vez a interação entre TIPRL1 e construções de S6K1. Essa interação pode trazer novas perspectivas sobre a regulação coordenada de mTOR1 e PP2A.

Sabe-se que a ativação da mTOR1 é concomitante à inativação de PP2A e a recíproca é verdadeira. O mecanismo que explica porque isso ocorre não está muito claro. Segundo Gingras, Raught & Sonenberg (2001), essa regulação é efetivada por α4. Para eles, a dinâmica da interação entre α4 e mTOR1 é semelhante à dos respectivos ortólogos de levedura (TAP42 e TOR1, respectivamente). Por esse modelo, mTOR1 ativada (na presença de nutrientes) fosforila  $\alpha$ 4, que se associa com PP2A<sub>C</sub>. A associação de α4 fosforilada com PP2A<sub>C</sub> previne a ativação da fosfatase. Na ausência de nutrientes ou em células tratadas com rapamicina, mTOR1 é inibida, não fosforila α4 e ainda sinaliza a desfosforilação das moléculas ativas de  $\alpha$ 4, que perde a capacidade de ligação a PP2A<sub>C</sub>, acarretando a ativação da fosfatase. Contudo, em leveduras existe uma segunda proteína reguladora nesse contexto, a TIP41, cuja ortóloga humana é a TIPRL1. TIP41 inativa (fosforilada) não se liga a TAP42, que fica livre para interagir com uma fosfatase do tipo 2A de levedura, a SIT4. Essa cascata ocorre quando a célula está em condições ativadoras de TOR1, que fosforila TIP41 diretamente. Em condições inibidoras de TOR1, TIP41 permanece desfosforilada e ativa, pronta para ligar-se a TAP42. A interação entre TIP41 e TAP42 impede a ligação da última proteína com SIT4, que fica livre para exercer sua função. Em resumo, TIP41 regula SIT4 indiretamente, por meio de TAP42 (Jacinto et. al, 2001 e 2003). Portanto, resta saber se a ortóloga humana de TIP41 também pode ser fosforilada em resposta à ativação de mTOR1 e ligar-se a α4, que fica impedida de bloquear a ativação de PP2A. Uma vez que a S6K1 $\alpha$ 2 é o efetor mais bem caracterizado de mTOR, a existência da interação entre ela e TIPRL1 pode revelar qual é, de fato, a ação da cascata de mTOR1 sobre TIPRL1 e, por conseguinte, sobre α4 e PP2A<sub>C</sub>. É possível que TIPRL1 seja alvo de fosforilação de S6K1 $\alpha$ 2 ou possua atividade regulatória sobre essa quinase, provavelmente em resposta à sinalização pela via de mTOR1 também.

# 5.5 Micro-ensaio Colorimétrico de Atividade de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT (Imunoensaio Enzimático)

O ensaio de atividade de His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT não obteve sucesso provavelmente porque o substrato da quinase (CysCTRPS6) não foi imobilizado. Essa conclusão só é plausível graças aos controles de imobilização do substrato efetuados (SS+S, SS+SC, SS+T, SS+ST, SS+C – ver figura 7), que eram ensaios nos quais a imobilização do substrato não foi realizada. Tais controles produziram resultados praticamente iguais aos dos demais ensaios. No entanto, é possível que o problema do ensaio esteja na quinase, que poderia ser inativa. Contudo, essa hipótese é a menos provável, pois His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT deve ter sido produzida nas células de inseto na forma fosforilada (ativa) e desfosforilada (parcialmente ativa). Portanto, o ensaio ainda necessita de padronização quanto à imobilização do substrato e à ativação da quinase expressa em células de inseto, além de requerer um controle positivo com peptídio sintético de CTRPS6.

### CONCLUSÃO

Dados os resultados anteriormente apresentados, não se chegou a uma conclusão a respeito dos cDNAs incomuns isolados das bibliotecas de HeLa e cérebro fetal humano. Embora as seqüências das inserções presentes nesses cDNAs tenham sido encontradas em íntrons do gene de S6K1, o *Nested* PCR realizado não conseguiu detectar a presença do cDNA incomum no *pool* sintetizado a partir do RNA total extraído de células HeLa, cultivadas no próprio laboratório. Portanto, o método empregado não é sensível o suficiente ou o cDNA incomum isolado da biblioteca obtida da Clontech (Mountain View, Califórnia) é um artefato.

Pode-se concluir que a expressão em grandes volumes das construções GST-S6K1 $\alpha$ 1, GST-PDPK1, GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e GST-CDPDPK1 em *E. coli* não é possível, pois o rendimento obtido após a primeira etapa de purificação é insuficiente para permitir etapas subseqüentes de clivagem com a protease TEV e refinamento da purificação. Os resultados sugerem que a degradação excessiva das proteínas de fusão é a principal causa do baixo rendimento obtido. Contudo, a quantidade expressa foi satisfatória para realização de ensaios de GST *pull-down*. No intuito de remediar a baixa produção em *E. coli*, sistemas de expressão mediada por baculovírus das construções His<sub>6</sub>-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 em células de inseto foram montados e não apresentaram degradação significativa das proteínas recombinantes. As condições ótimas de produção das proteínas recombinantes em células de inseto e o protocolo de purificação foram ajustados, embora tenha se confirmado a produção da construção de S6K1 em duas formas, provavelmente, dois estados diferentes de fosforilação.

Por outro lado, a expressão de His<sub>6</sub>-Proteína D-CTRPS6 em *E. coli* fornece um rendimento satisfatório na fração protéica insolúvel (corpos de inclusão). A extração, a renaturação, a clivagem com TEV e a purificação dessa construção por troca catiônica (coluna HiTrap SP HP) foram estabelecidos e fornecem bons resultados. Os mesmos protocolos foram realizados com o peptídeo CysCTRPS6, que foi empregado em ensaios enzimáticos baseados em ELISA, juntamente com S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT. Apesar da ocorrência de degradação de CTRPS6 (e CysCTRPS6) no sistema procariótico em que é expressa, a produção em grandes volumes desse fragmento de 65 resíduos de aminoácidos é um grande avanço, pois RPS6 é uma proteína de difícil expressão em modelo heterólogo (apenas ortólogos de bactérias termofílicas foram produzidos por Otzen *et al.*, 1999).

Nos experimentos de GST *pull-down*, observou-se que a construção His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior) não interage com GST-S6K1 $\alpha$ 2, embora interaja com GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT com maior afinidade.

Por sua vez, a construção His<sub>6</sub>-PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) interage com menor intensidade e igualmente com todas as construções testadas, GST-S6K1 $\alpha$ 2, GST-S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT e GST-TIPRL1 (utilizada como controle positivo de interação da isoforma menor de PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ ). Tomados em conjunto, os resultados sugerem que a presença do C-terminal de S6K1 $\alpha$ 2 impede a interação com PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (maior), a menos que ele esteja fosforilado ou seja eliminado. Por sua vez, PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) comporta-se de forma completamente diferente da isoforma maior, pois a interação entre PP2A<sub>C</sub> $\alpha$ (menor) e S6K1 $\alpha$ 2 parece ser independente do carboxiterminal da quinase, visto que a intensidade de sua interação com S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT é igual à intensidade da interação com S6K1 $\alpha$ 2 inteira, e ambas são iguais à intensidade da interação com o controle positivo (TIPRL1).

Ainda sobre os experimentos de interação *in vitro* das construções de S6K1 com outras proteínas, confirmou-se que  $\alpha 4$  e S6K1 $\alpha 2$  não interagem diretamente, conforme observado por Yamashita *et al.* (2005). Contudo, constatou-se uma interação fraca entre TIPRL1 e S6K1 $\alpha 2$ . Se confirmado *in vivo*, esse resultado compõe um novo quadro na regulação coordenada entre mTOR e PP2A. TIP41, a ortóloga de TIPRL1 de *S. cerevisae*, é fosforilada por mTOR e se liga a TAP42 (ortóloga de  $\alpha 4$ ), impedindo-a de bloquear a atividade de uma fosfatase do tipo 2A (SIT4). Como S6K1 $\alpha 2$  é o principal efetor de mTOR em mamíferos, é possível que TIPRL1 seja fosforilada e se ligue a  $\alpha 4$  em resposta à ativação de mTOR, tal qual TIP41 se liga a TAP42 em leveduras. Nesse caso, TIPRL1 pode ser substrato de S6K1 $\alpha 2$ . Outra possibilidade é que TIPRL1 possua atividade regulatória sobre S6K1 $\alpha 2$  em resposta à sinalização de mTOR, tal qual a ação de TIP41 sobre TAP42 (e, indiretamente, sobre uma fosfatase do tipo 2A) em leveduras.

Finalmente, o ensaio de atividade de  $His_6$ -S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT não obteve sucesso provavelmente porque o substrato da quinase (CysCTRPS6) não foi imobilizado.

#### PERSPECTIVAS

Este trabalho alcançou resultados diversos que podem originar novas propostas de pesquisa ou mesmo outros experimentos comprobatórios, para dar solidez às hipóteses lançadas. Por exemplo, sugere-se que novas tentativas de detecção de cDNAs incomuns de S6K1 em células HeLa sejam realizadas, mas com técnicas mais sensíveis, afinal, formas semelhantes a esses cDNAs já foram encontradas in vivo (Karni et al., 2007). Futuramente, as construções His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT e His<sub>6</sub>-CDPDPK1 produzidas em células de inseto poderão ser empregadas em estudos estruturais ou biofísicos, para caracterização físico-química e/ou averiguação de interações relevantes com outras proteínas, tal qual o fragmento carboxiterminal de RPS6 (CTRPS6). O protocolo de expressão também poderá ser otimizado para a co-expressão de ambas as construções (por meio da co-infecção das células de inseto com os dois baculovírus recombinantes), a fim de promover a produção de um único pool de His<sub>6</sub>-S6K1α2T389EΔCT homogeneamente fosforilado. Ainda sobre CTRPS6, esse peptídeo poderá ser submetido a estudos estruturais e/ou de dinâmica molecular, que poderão trazer importantes contribuições para o entendimento da regulação da tradução em células humanas, visto que a proteína ribossomal S6 está envolvida nesse processo como substrato de S6K1. Experimentos in vivo podem ser realizados diante dos resultados de GST pull-down das construções de S6K1a2 com as isoformas de PP2A.

Sobre as interações identificadas entre S6K1 $\alpha$ 2T389E $\Delta$ CT, S6K1 $\alpha$ 2 e TIPRL1, é preciso discriminar entre as duas hipóteses existentes: (1) TIPRL1 é substrato de S6K1 $\alpha$ 2 ou (2) TIPRL1 é reguladora de S6K1 $\alpha$ 2.

Finalmente, deve-se padronizar o protocolo do imunoensaio enzimático colorimétrico e em larga escala, para detecção da atividade de S6K1. Este ensaio é importante não só para os ensaios funcionais de S6K1, como também para triagens em larga escala de moléculas candidatas a inibidores de S6K1.

### REFERÊNCIAS

- Alessi DR, Kozlowski MT, Weng QP, Morrice N, Avruch J (1998) "3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase *in vivo* and *in vitro*." *Curr. Biol.* **8**:69–81.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1998). "Current Protocols in Molecular Biology." John Wiley & Sons, New York.
- Balendran A, Currie R, Armstrong CG, Avruch J, Alessi DR (1999). "Evidence that 3-phosphoinositidedependent protein kinase-1 mediates phosphorylation of p70 S6 kinase *in vivo* at Thr-412 as Thr-252." J. *Biol. Chem.* 274: 37400–37406.
- Barry GF (1988). "A broad host-range shuttle system for gene insertion into the chromosomes of gramnegative bacteria." *Gene* 71:75-84.
- Beck T, Hall MN (1999). "The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors". *Nature* **402**: 689–692.
- Beugnet A, Wang X, Proud CG (2003). "Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1." J. Biol. Chem. 278: 40717–40722.
- Brautigan DL. (1995). "Flicking the switches: phosphorylation of serine/threonine protein phosphatases." *Sem. Cancer Biol.* **6**:211-217.
- Brunn GJ, Williams J, Sabers C, Wiederrecht G, Lawrence Jr. JC, Abraham RT (1996). "Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002". *EMBO J.* 15: 5256–5267.
- Brunn GJ, Hudson CC, Sekulic A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence Jr. JC, Abraham RT (1997). "Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin." *Science* **277**: 99–101.
- Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM (1998). "RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 1432–1437.
- Calvo V, Crews CM, Vik TA, Bierer, BE (1992). "Interleukin 2 stimulation of p70 S6 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:7571-7575.
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR (1994). "Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation." *Mol. Cell. Biol.* **14:** 4902–4911.
- Cheatham L, Monfar M, Chou MM, Blenis J (1995). "Structural and functional analysis of pp70<sup>S6k</sup>." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11696-11700.
- Chen J, Zheng XF, Brown EJ, Schreiber SL (1995). "Identification of an 11-kDa FKBP12–rapamycinbinding domain within the 289-kDa FKBP12–rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92:** 4947–4951.
- Chen RT, Peterson ST, Schreiber SL (1998). "α4 associates with protein phosphatase 2A, 4, and 6." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**:827–832.
- Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J (1996). "Structure of the FKBP12–rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP." *Science* **273**: 239–242.
- Choi KM, McMahon LP, Lawrence Jr. JC (2003). "Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor." *J. Biol. Chem.* **278**: 19667–19673.
- Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J (1994). "PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase." *Nature* **370**: 71–75.
- Cohen PT (1997). "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life." *Trends Biochem Sci.* **22**:245-51.
- Collins FS, Mammalian Gene Collection (MGC) Program Team (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and maouse cDNA sequences." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(26):16899-903.

- Crespo JL, Hall MN (2002). "Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:579–591.
- Crespo JL, Diaz-Troya S, Florencio FJ (2005). "Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Physiol.* **139**:1736–1749.
- Dennis PB, Pullen N, Kozma SC, Thomas G (1996). "The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin- insensitive kinase kinases." *Mol. Cell. Biol.* **16**:6242–6251.
- Di Como CJ, Arndt KT (1996). "Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases." *Genes & Dev.* **10**:1904–1916.
- Dmitriev SE, Terenin IM, Dunaevsky YE, Merrick WC, Shatsky IN (2003). "Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5\_ untranslated regions." *Mol. Cell. Biol.* 23: 8925–8933.
- Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun, YA (1993). "Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A." J. Biol. Chem. 268:15523-30.
- Duncan R, Hershey JW (1985). "Regulation of initiation factors during translational repression caused by serum depletion." *J. Biol. Chem.* **260**:5493–5497.
- Ferrari S, Pearson RB, Siegmann M, Kozma SC, Thomas G (1993). "The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites." J. Biol. Chem. 268:16091–16094.
- Flotow H & Thomas G (1992). "Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver." *J. Biol. Chem.* **267**:3074–8.
- Fumagalli S, Thomas G (2000). "S6 phosphorylation and signal transduction." In *Translational control of gene expression* (ed. N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, and M.B. Mathews), pp. 695–718. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes Dev.* **15**:807-826.
- Gingras AC, Caballero M, Zarske M, Sanchez A, Hazbun TR, Fields S, Sonenberg N, Hafen E, Raught B, Aebersold R (2005). "A novel, evolutionarily conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity." *Mol Cell Proteomics* **4**(11):1725-40.
- Götz J, Probst A, Ehler E, Hemmings B, Kues W (1998). "Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit C-alpha." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12370-12375.
- Grove JG, Banerjee P, Balasubramanyam A, Coffer PJ, Price DJ, Avruch J, Woodgett JR (1991). "Cloning and Expression of Two Human p70 S6 Kinase Polypeptides Differing Only at Their Amino Termini." *Mol. Cel. Biol.* **11**:5541-50.
- Hannan KM, Thomas G, Pearson RB. (2003). "Activation of S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase 1) requires an initial calcium dependent priming event involving formation of a high-molecular-mass signalling complex." *Biochem. J.* **370**(Pt 2):469–477.
- Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." *Cell* **110**:177–189.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR (2004). "The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins." J. Cell Biol. 166:213–223.
- Hay N & Sonenberg N (2004). "Upstream and Downstream of mTOR." Genes Dev. 18:1926-45.
- Heggestad AD, Notterpek L, Fletchera BS (2004). "Transposon-based RNAi delivery system for generating knockdown cell lines." *BBRC* **316**:643-650.
- Heitman J, Movva NR, Hall MN (1991). "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast." *Science* **253**:905–909.
- Holz MK, Blenis J (2005). "Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase." *J. Biol. Chem.* **280**:26089–26093.
- Hou Z, He L & Qi RZ (2007). "Regulation of S6 kinase 1 activation by phosphorylation at Ser-411". J. Biol. Chem. 282:6922–6928.

- Inoki K, Corradetti MN, Guan KL (2005). "Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease." *Nat. Genet.* **37**:19–24.
- Inui S, Kuwahara K, Mizutani J, Maeda K, Kawai T, Nakayasu H, Sakaguchi N (1995). "Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptormediated signal transduction." *J. Immunol.* **154**:2714–2723.
- Inui S, Sanjo H, Maeda K, Yamamoto H, Miyamoto E, Sakaguchi E (1998). "Ig receptor binding protein 1 (a4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." *Blood* **92**:539–546.
- Isotani S, Hara K, Tokunaga C, Inoue H, Avruch J, Yonezawa K (1999). "Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro." *J. Biol. Chem.* **274**:34493–34498.
- Jacinto E, Guo B, Arndt KT, Schmelze T, Hall MN (2001). "TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway." *Mol. Cell* **8**(5):1017-26.
- Jacinto E, Hall MN (2003). "Tor signalling in bugs, brain and brawn." Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4: 117-126.
- Janssens V, Goris J (2001). "Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling." *Biochem. J.* **353**:417-39.
- Jastrzebskik K, Hannan KM, Tchoubrieva EB, Hannan RD, Pearson RB (2007). "Coordinate regulation of ribosome biogenensis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function." *Growth Factors* **25**: 209-226.
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p7086k. *EMBO J.* **16:** 3693–3704.
- Jiang Y, Broach JR (1999). "Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast." *EMBO J.* **18:** 2782–2792.
- Jones DT (1999). "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices". J. Mol. Biol. 292:195-202.
- Joseph RE & Andreotti AH (2008). "Bacterial expression and purification ok interleukin-2 tyrosine kinase: single step separation of the chaperonin impurity." *Protein Expr. Purif.* **60:** 194-197.
- Karni R, Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Um D, Krainer AR (2007). "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene." *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**:185-193.
- Keshwani MM, Harris TK (2008). "Kinetic mechanism of fully activated S6K1 protein kinase." J. Biol. Chem. 283: 11972-80.
- Keshwani MM, Ross DB, Ragan TJ, Harris TK (2008). "Baculovirus-mediated expression, purification, and characterization of a fully activated catalytic kinase domain construct of the 70 kDa 40S ribosomal S6 kinase-1 αII isoform (S6K1αII)." *Protein Expr. Purif.* **58**: 32-41.
- Keshwani MM, Gao X, Harris TK (2009) "Mechanism of PDK1-catalyzed T229 phosphorylation of the S6K1 protein kinase." *J. Biol. Chem.* **284:** 22611-24.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." *Cell* **110**:163–175.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2003). "GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR." *Mol. Cell* **11**:895–904.
- Klein S, Geiger T, Linchevski I, Lebendiker M, Itkin A, Assayag K, Levitzki A (2005) "Expression and purification of active PKB kinase from *Escherichia coli*". *Protein Expr. Purif.* **41**:162-169.
- Kozma SC, McGlynn E, Siegmann M, Reinhard C, Ferrari S & Thomas G (1993) "Active baculovirus recombinant p70<sup>s6k</sup> and p85<sup>s6k</sup> produced as a function of the infectious response". *J. Biol. Chem.* **268:**7134–7138.
- Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR (1992). "Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase." *Nature* **358**:70-74.
- Kuwahara K, Matsuo T, Nomura J, Igarashi H, Kimoto M, Inui S, Sakaguchi, N (1994). "Identification of a 52-kDa molecule (p52) coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate." *J. Immunol.* **152**:2742–2752.
- Laemmli UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227:680-695.
- Lee S, Comer FI, Sasaki A, McLeod IX, Duong Y, Okumura K, Yates IJR, Parent CA, and Firtel (2005). "TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in *Dictyostelium*." *Mol. Biol. Cell* **16**:4572–4583.
- Leslie NR, Biondi RM & Alessi DR (2001) "Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinoitide phosphatases". *Chem. Rev.* 101:2365-2380.
- Letunic I, Copley RR, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P (2006). "SMART 5: domains in the context of genomes and networks." *Nucleic Acids Res.* **34**:D257-60.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* **10**: 457–468.
- Mahalingam M, Templeton D (1996). "Constitutive activation of S6 kinase by deletion of amino-terminal autoinhibitory and rapamycin sensitivity domains." *Mol. Cell. Biol.* **16**:405–413.
- Manning BD (2004). "Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis." *J. Cell Biol.* **167**:399–403.
- Manzella, JM, Rychlik W, Rhoads RE, Hershey JW, Blackshear PJ (1991). "Insulin induction of ornithine decarboxylase". Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4E. J. Biol. Chem. 266: 2383–2389.
- Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, Doi T, Shimotoho K, Harada T, Nishida E, Hayashi H, Sugano S (2003). "Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways." *Oncogene* **22**(21):3307-18.
- McCright B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM (1996). "The B56 Family of Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulatory Subunits Encodes Differentiation-induced Phosphoproteins That Target PP2A to Both Nucleus and Cytoplasm." J. Biol. Chem. 271:22081-22089
- Meyuhas O, Hornstein E. (2000). Translational control of TOP mRNAs. In *Translational control of gene expression* (ed. M.B. Mathews), pp. 671–694. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA (1999). "Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A." *Trends Biochem. Sci.* 24:186-91.
- Montagne J, Stewart MJ, Stocker H, Hafen E, Kozma SC, Thomas G (1999). *Drosophila* S6 kinase: A regulator of cell size. *Science* **285**: 2126–2129.
- Morello LG, Sartori D, de Oliveira Martinez AL, Vieira ML, Taniwaki MH, Fungaro MH (2007). "Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR." *Int. J. Food Microbiol.***119**:270-276.
- Mumby MC, Walter G (1993). "Protein serine/threonine phosphatases: Structure, regulation, and functions in cell growth." *Physiol. Rev.* **73**:673-699.
- Murata K, Wu J, Brautigan DL (1997). "B cell receptor-associated protein a4 displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:10624–10629.
- Nanahoshi T, Nishiuma Y, Tsujishita K, Hara S, Inui N, Sakaguchi K, Yonezawa K (1998). "Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog Tap42." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:520–526.
- Nanahoshi M, Tsujishita Y, Tokunaga C, Inui S, Sakaguchi N, Hara K, Yonezawa K (1999). "Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases." *FEBS Lett.* **446**:108–112.

- Neshat MS, Mellinghoff IK, Tran C, Stiles B, Thomas G, Petersen R, Frost P, Gibbons JJ, Wu H, Sawyers CL (2001). "Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:10314–10319.
- Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, Oshiro N, Hidayat S, Yoshino K, Hara K, Tanaka N, Avruch J, Yonezawa K (2003). "The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif." *J. Biol. Chem.* **278:**15461–15464.
- Ogris E, Du X, Nelson KC, Mak EK, Yu XX, Lane WS, Pallas DC (1999). "A protein phosphatase methylesterase (PME-1) is one of several novel proteins stably associating with two inactive mutants of protein phosphatase 2A." *J. Biol. Chem.* **274**:14382-91.
- Oliver CJ and Shenolikar S (1998). "Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors." *Front Biosci.* **3**:D961-72.
- Onda M, Inui S, Maeda K, Suzuki M, Takahashi E, Sakaguchi N (1997). "Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IgBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42P protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway." *Genomics* **46**:373-8.
- Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, Avruch J, and Yonezawa K (2004). "Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function." *Genes Cells* **9**: 359–366.
- Otterhag L, Gustavsson N, Alsterfjord M, Pical C, Lehrach H, Gobom J, Sommarin M (2006). "Arabidopsis PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase." *Biochimie* **88**:11–21.
- Otzen DE, Kristensen O, Proctor M & Oliveberg M (1999). "Structural changes in the transition state of protein folding: alternative interpretations of curved chevron plots." *Biochemistry* **38**:6499–6511.
- Pende M, Um SH, Mieulet V, Sticker M, Goss VL, Mestan J, Mueller M, Fumagalli S, Kozma SC, and Thomas G (2004). "S6K1<sup>-/-</sup>/S6K2<sup>-/-</sup> Mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5\_-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway." *Mol. Cell. Biol.* **24:**3112–3124.
- Peterson RT, Desai BN, Hardwick JS, and Schreiber SL (1999). "Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12–rapamycin associated protein." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**:4438–4442.
- Petritsh C, Woscholski R, Edelmann HM & Ballou LM (1995) "Activation of p70 S6 kinase and *erk*-encoded mitogen-activated protein kinases is resistant to high cyclic nucleotide levels in Swiss 3T3 fibroblasts". *J. Biol. Chem.* **270**:26619–26625.
- Podsypanina K, Lee RT, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J (2001). "An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten<sup>+/-</sup> mice." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 10320–10325.
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, and Grindey G (1994). "Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase." *Cancer Res.* 54: 2419–2423.
- Price DJ, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer BE (1992). "Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase." *Science* 257:973-977.
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G (1998) "Phosphorylation and activation of p70<sup>s6k</sup> by PDPK1." *Science* **279**:707-710.
- Radimerski T, Montagne J, Rintelen F, Stocker H, van der Kaay J, Downes CP, Hafen E, and Thomas G (2002). "dS6K-regulated cell growth is dPKB/dPI(3)K-independent, but requires dPDK1." *Nat. Cell. Biol.* 4:251–255.
- Ragan TJ, Ross DB, Keshwani MM, Harris TK (2007). "Expression, purification, and characterization of a structurally disordered and functional C-terminal autoinhibitory domain (AID) of the 70 kDa 40S ribosomal protein S6 kinase-1 (S6K1)." *Protein Expr. Purif.* 57:271-9.
- Raught B, Peiretti F, Gingras AC, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, Polakiewicz RD, Sonenberg N, and Hershey JW (2004). "Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases." *EMBO J.* 23:1761–1769.

- Rebholz H, Panasyuk G, Fenton T, Nemazanyy I, Valovka T, Frajolet M, Ronnstrand L, Stephens L, West A & Gout IT (2006) "Receptor association and tyrosine phosphorilation of S6 kinases". *FEBS J.* 273:2023-2036.
- Reinhard C, Fernandez A, Lambl NJC, Thomas G (1994). "Nuclear localization of p85<sup>s6k</sup>: functional requirement for entry into S phase." *EMBO J.* **13**:1557-65.
- Rogers Jr. GW, Komar AA, and Merrick WC (2002). "eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases." *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **72**:307–331.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schägger H (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nat Protoc 1:16-22.
- Schalm SS and Blenis J (2002). "Identification of a conserved motif required for mTOR signaling." *Curr. Biol.* **12**:632-639.
- Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, and Blenis J (2003). "TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function." *Curr. Biol.* **13:** 797–806.
- Schmidt A, Beck T, Koller A, Kunz J, and Hall MN (1998). "The Tor nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease." *EMBO J.* **17:**6924–6931.
- Schwab MS, Kim SH, Terada N, Edfjäll C, Kozma SC, Thomas G, and Maller JL (1999). "p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*." *Mol. Cell. Biol.* **19:**2485–2494.
- Shah OJ, Wang Z, Hunter T (2004). "Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies." *Curr. Biol.* **14**:1650–1656.
- Sharma PM, Egawa K, Huang Y, Martin JL, Huvar I, Boss GR, and Olefsky JM (1998). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by adenovirus-mediated gene transfer and its effect on insulin action." *J. Biol. Chem.* **273**:18528–18537.
- Shima H, Pende M, Chen Y, Fumagalli S, Thomas G, and Kozma SC (1998). "Disruption of the p70S6k/p85S6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase." *EMBO J*. **17:**6649–6659.
- Shönthal AH (2001). "Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer." Cancer Lett. 170(1):1-13.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998). "SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:5857-64.
- Smetana JH, Oliveira CL, Jablonka W, Aguiar Pertinhez T, Carneiro FR, Montero-Lomeli M, Torriani I, Zanchin NI. (2006). Low resolution structure of the human alpha4 protein (IgBP1) and studies on the stability of alpha4 and of its yeast ortholog Tap42. *Biochim Biophys Acta*. 1764(4):724-34.
- Smetana JH & Zanchin NI (2007). "Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 and the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL1)." *FEBS J.* **22**:5891-904.
- Stolovich M, Tang H, Hornstein E, Levy G, Cohen R, Bae SS, Birnbaum MJ, and Meyuhas O (2002). "Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation." *Mol. Cell. Biol.* **22:**8101–8113.
- Strausberg, RL *et al.* (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (26):16899-1690
- Tang H, Hornstein E, Stolovich M, Levy G, Livingstone M, Templeton D, Avruch J, and Meyuhas O (2001). "Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinasemediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation." *Mol. Cell. Biol.* 21:8671–8683.
- Tee AR, and Blenis J (2005). "mTOR, translational control and human disease." Semin. Cell Dev. Biol. 16:29–37.
- Thomas G and Hall MN (1997). "TOR signalling and control of cell growth." *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9:**782–787.
- Thomas G (2002). "The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth." *Biol. Res.* **35**:305–313.

- Tolstykh T, Lee J, Vafai S, and Stock JB (2000). "Carboxyl methylation regulates phosphoprotein phosphatase 2A by controlling the association of regulatory B subunits." *EMBO J.* **19**:5682-91.
- (a) Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A, Sorisky A, Marette A (2005). "Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes." *Endocrinology* **146**:1328-37.
- (b) Tremblay F, Krebs M, Dombrowski L, Brehm A, Bernroider E, Roth E, Nowotny P, Waldha W, Marette A, Roden M (2005). "Overactivation of S6 Kinase 1 as a Cause of Human Insulin Resistance During Increased Amino Acid Availability." *Diabetes* **54**:2674-84.
- (c) Tremblay F, Jacques H, Marette A (2005). "Modulation of insulin action by dietary proteins and amino acids: role of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway." *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 8:457–462.
- Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, and Kahn CR (2000). "Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85\_regulatory subunit." *Mol. Cell. Biol.* **20**:8035–8046.
- Ui M, Okada T, Hazeki K, and Hazeki O (1995). "Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase." *Trends Biochem. Sci.* **20**:303–307.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004). "Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity." *Nature* **431**:200–205.
- Valovka T *et al.* (2003) "Protein kinase C phosphorylates ribosomal protein S6 kinase βII and regulates its subcellular localization". *Mol. Cell. Biol.* 23:852-863.
- Virshup DM (2000). "Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes." Curr. Opin. Cell Biol. 12:180-5.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, and Brown RF (1994). "A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3kinase, 2-(4morpholinyl)- 8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)." J. Biol. Chem. 2169:5241– 5248.
- Volarevic S, Thomas G (2001). "Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth." *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**:101–127.
- Yakimov MM, Giuliano L, Gentile G, Crisafi E, Chernikova TN, Abraham WR, Lunsdorf H, Timmis KN and Golyshin PN (2002). "*Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal seawater." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:779-785.
- Yamashita T, Inui S, Maeda K, Hua DR, Takagi K, Sakaguchi N (2005). "The heterodimer of *a*4 and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells." *BBRC* **330**:439-445.
- Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, Ruggero D (2006) "Impaired control of IRESmediated translation in X-linked dyskeratosis congenita." *Science* **312**:902-906.
- Wang L, Foster M, Zhang Y, Tschantz WR, Yang L, Worrall J, Loh C, Xu X (2008) "High yield expression of non-phosphorylated protein tyrosine kinases in insect cells." *Protein Expr. Purif.* **61**:204-11.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, and Proud CG (2001). "Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase." *EMBO J.* 20:4370–4379.
- Wera S and Hemmings BA (1995). "Serine/threonine protein phosphatases." Biochem. J. 311:17-29.
- Westphal RS, Coffee RL, Marotta A, Pelech SL, Wadzinski BE (1999). "Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A." J. Biol. Chem. 274:687–692.
- Wu J, Tolstykh T, Lee J, Boyd K, Stock JB, and Broach JR (2000). "Carboxyl methylation of the phosphoprotein phosphatase 2A catalytic subunit promotes its functional association with regulatory subunits in vivo." *EMBO J.* **19**:5672-81.
- Wullscheleger S, Loewith R & Hall MN (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." *Cell* **124**:471-84.
- Zhang WG, Shor B, Yu K (2006). "Identification and characterization of a constitutively T-loop phosphorylated and active recombinant S6K1: Expression, purification, and enzymatic studies in a high capacity non-radioactive TR-FRET Lance assay." *Protein Expr. Purif.* **46**:414–420.

Zhao Y, Boguslawski G, Zitomer RS, and DePaoli-Roach AA (1997). "Saccharomyces cerevisiae homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions." J Biol Chem. 272:8256-62.

Zolnierowicz S and Bollen M (2000). "Protein phosphorylation and protein phosphatases." *EMBO J.* **19**:483-8.