

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JÉSSICA FERNANDES SCORTECCI

Estudo da via de incorporação de selenocisteínas: compreensão dos mecanismos de interações
macromoleculares

São Carlos

2019

JÉSSICA FERNANDES SCORTECCI

Estudo da via de incorporação de selenocisteínas: compreensão dos mecanismos de interações macromoleculares

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

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

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2019

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

Scortecci, Jessica Fernandes

Estudo da via de incorporação de selenocisteínas: compreensão dos mecanismos de interações macromoleculares / Jessica Fernandes Scortecci; orientador Otávio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

217 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Selenocisteína. 2. Interação proteína-proteína. 3. Interação proteína-RNA. I. Thiemann, Otávio Henrique, orient. II. Título.

À minha mãe, que sempre me apoiou em todos os momentos.

À minha avó, que sempre auxiliou meus estudos.

Pra vocês, com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo o que Ele proporcionou na minha vida. Agradeço à minha mãe, Rejane, por todo apoio e suporte que ela me deu desde sempre. Por sempre me ouvir, por incentivar meus sonhos, por me ajudar sempre que preciso, por acreditar em mim, por sempre dar o seu melhor para que eu e Té tivéssemos tudo que você não teve. Agradeço por ser meu exemplo de força, de ética e de coragem. Mãe, minha rainha, meu orgulho, você sabe o quanto lutou pra isso acontecer, e eu só tenho a dizer: muito obrigada, te amo muito! Agradeço à minha vózinha, dona Engnez, por sempre querer o melhor para seus netos. Por ajudar minha caminhada para entrar na USP, por tomar nota dos meus estudos na escola. Por fazer a melhor batata na manteiga. Sem essas duas mulheres, eu não seria nada do que sou hoje. Sou eternamente grata por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim.

Agradeço à minha irmã, por sempre me auxiliar nas tarefas, por me apoiar no meu doutorado, por pegar no meu pé quando era preciso e claro, por me defender na escola! Agradeço à minha melhor amiga, Thati, por todos esses anos de amizade, por sempre estar tão presente, mesmo que distante fisicamente. Por sempre me mandar energias positivas. Agradeço à mãe da Thati, Divani, por sempre me acolher com tanto amor desde os tempos do colégio. Ao Adriaano, por toda parceria na graduação, pelos longos finais de semanas estudando termodinâmica (com las emboladas), pelos cafés no alojá, pela parceria no lab, por ouvir meus desabafos e por sua amizade. Obrigada!

Aos meus lindinhos patudos, Bibi, Lico, Amora e Mel (que já se foi). O amor e companheirismo que vocês têm são simplesmente maravilhosos. Só tenho a agradecer Deus ter permitido vocês serem meus amores peludinhos. Amo muito todos vocês!

Ao meu namorado, B-2 (Vitor), por todo esse tempo de companheirismo, por aguentar minhas crises e tpm haha Obrigada por todo apoio e carinho! Agradeço também pela orientação no meu primeiro ano de IC, pela amizade que construímos no lab, e, por fim, agradeço a gente ter se aproximado. Só assim para eu conhecer esse coração gigante que você tem. Muito obrigada lindo, amo você!

Ao meu pai, Marco, por ter me aceitado como filha e me tratar com todo amor e carinho. Agradeço por todos os ensinamentos de matemática e na vida. Agradeço por compartilhar sua família linda comigo. À tia Rô, por sempre ouvir o meu “ôooh tia...”, por sempre torcer por mim na minha jornada até aqui.

Aos meus professores do voleibol, em especial, ao Wagner Serodio. Agradeço principalmente por ter me ensinado não só as coisas de vôlei, mas principalmente, por ter me tornado uma pessoa melhor. Diante dos desafios e severidades que você impôs, vejo que tudo foi para levar suas atletas para o caminho do bem e para tornar cada uma um ser humano mais forte, capaz de enfrentar as adversidades da vida.

Ao voleibol, por ter me ensinado muitas coisas. Às pessoas que conheci ao longo desses anos no vôlei (que já são 14 anos praticando esse esporte maravilhoso). Em especial, gostaria de agradecer à Pamella, Amandinha - TopVolley – MG. Agradeço também às meninas e aos técnicos que conheci no Espéria, Praia Grande, Corinthians, Sírio, Ibirapuera.

À família VÔLEI CAASO: obrigada a todos vocês por proporcionarem os melhores momentos que tive no CAASO. “Voleibool U-S-P, CAASO, CAASO, botando pra *****”. Às poliatletas do IFSC, afinal, conseguimos o bi-campeonato consecutivo haha. Ao pessoal do CAASO, que faz os campeonatos serem extremamente divertidos.

Ao Prof. Otavio Thiemann por ter me aceitado como aluna de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado Direto. Pela orientação e cobranças ao longo desses anos, sempre buscando extrair o melhor de seus alunos. Aos técnicos do laboratório, Su e Humberto, por toda ajuda esses anos todos e até pelos aluguéis haha Um agradecimento especial à Bel, por sempre ajudar a gente nos momentos tensos e por sempre fornecer café, a bebida sagrada dos cientistas. Aos amigos e colegas dos grupos de cristalografia e de biofísica, por todas conversas e auxílios, seja pra descontrair ou discutir um projeto.

Agradeço à Universidade de São Paulo e aos laboratórios de Biologia Estrutural e Biofísica do IFSC, que possuem uma infraestrutura excelente, permitindo que os experimentos sejam realizados com grande qualidade. Ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do LNBio (CNPEM) pelos experimentos de ultracentrifugação analítica. Agradeço às doutoras Carol Figueira e Fernanda Batista pelas coletas de dados de ultracentrifugação analítica.

Aos funcionários do IFSC (biblioteca, gráfica, scinfor, graduação, pós-graduação, financeiro) por sempre serem muito solícitos e ajudarem o desenvolvimento de todo o processo.

Aos colaboradores Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto, por auxiliar na coleta de dados de SAXS, e principalmente pelos ensinamentos envolvendo esta técnica. Ao Dr. Militar pela coleta de dados de DSC e mais ainda, por sempre auxiliar no meu desenvolvimento como cientista. Ao Prof. Dr. Marinônio Cornélio pela coleta e análise dos dados de FTIR. Ao Prof. Dr. Mário Palma e Dr. Bibiana Souza pela coleta e análise dos dados de massas. Ao

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEN) pela infraestrutura e coleta de dados de SAXS, na linha SAXS-1 e de cristalografia de proteínas, na linha MX-2.

Ao Dr. Edson Crusca pela síntese do peptídeo. Ao Dr. Marcos Roberto De Mattos Fontes por disponibilizar o equipamento de ITC para os ensaios de interação. À Prof. Dr. Ana Paula Úlian de Araújo e a aluna de doutorado Raissa Gutierrez, pela colaboração nos ensaios de duplo híbrido dirigido. À Prof. Dr. Maria Helena Goldmann e ao Prof. Dr. Cleslei Zanelli por fornecerem os plasmídeos e cepa para os ensaios de duplo híbrido dirigido. À Prof. Dr. Fernanda Anibal e seu grupo, pela produção do antissoro.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro durante o decorrer da iniciação científica (FAPESP – 2012/15777-8 e FAPESP – 2014/16005-4), mestrado (CAPES) e doutorado direto (FAPESP – 2016/20977-7). Agradeço também à USP pelo auxílio financeiro no período de intercâmbio (bolsa mérito acadêmico/ Università degli Studi di Roma Tor Vergata, 2014).

Muito obrigada a todos vocês!

Os vitoriosos serão lembrados por suas conquistas, os fracassados,
por suas tentativas, mas os omissos serão simplesmente esquecidos.

(autoria desconhecida – do livro O Voleibol de Alto Nível)

RESUMO

FERNANDES, J. S. **Estudo da via de incorporação de selenocisteínas:** compreensão dos mecanismos de interações macromoleculares. 2019. 217 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

A existência de aminoácidos co-traducionalmente codificados pelo código genético tem estimulado estudos sobre os mecanismos de síntese, reconhecimento e incorporação nas cadeias polipeptídicas nascentes. Como exemplo, pode-se destacar a via específica de biossíntese do aminoácido selenocisteína, presente em eucariotos e procariotos, cuja incorporação ocorre juntamente ao códon de parada UGA. Em bactérias, a via de biossíntese de Sec é composta pelas proteínas Selenocisteína sintase (SelA), Fator de Elongação Específico (SelB), Selenofosfato sintetase (SelD), Seril-tRNA sintetase (SerRS) e Selenocisteína liase (CsdB). A via de síntese e incorporação de Sec depende também de dois RNAs; um tRNA específico (tRNA^{Sec}) e uma sequência no mRNA (Sequência de Inserção de Selenocisteínas - SECIS), sinalizadora para correta incorporação de Sec junto ao códon UGA. Em eucariotos, essa via difere pela presença das proteínas O-fosfoseril-tRNA^{Sec} Quinase (PSTK) e Selenocisteil-tRNA^{Sec} sintase (SepSecS), em substituição a SelA, e pela presença de proteínas ligadoras ao elemento SECIS (SBP2). Pelo fato do selênio ter uma citotoxicidade elevada, é fundamental a compreensão do mecanismo catalítico e formação dos complexos da via na etapa de incorporação junto ao tRNA^{Sec}. Em 2009, foi proposta a interação entre CsdB e SelD, porém não sendo demonstrada experimentalmente até o momento. Dessa forma, esse estudo traz pela primeira vez, a caracterização biofísica e estrutural da interação macromolecular entre CsdB e SelD bacterianas, indicando uma elevada afinidade de interação entre elas sob diferentes condições experimentais. Estudos biofísicos mostraram que a interação aumenta a estabilidade térmica e os estudos estruturais resultaram em um modelo em baixa resolução do complexo, indicando uma assimetria para o complexo formado. Além disso, em 2013 nosso grupo anotou uma sequência putativa para uma SBP2 em *N. gruberi*, ameba não patogênica empregada como modelo para estudos de *N. fowleri*, conhecida a infectar humanos, resultando na patologia conhecida como *Meningoencefalite Amebiana Primária*. Deste modo, esse estudo também traz, pela primeira vez, a demonstração experimental da presença de uma SBP2 em *N. gruberi*. Ademais, a interação desta proteína como o elemento SECIS também foi caracterizada através de diversos estudos biofísicos. Demonstrou-se que a NgSBP2 possui alto percentual de regiões de desordem e que ao interagir com o elemento SECIS apresenta enovelamento devido à interação. Dessa forma, este estudo trouxe um avanço no conhecimento das interações moleculares presentes na via de incorporação de selenocisteínas, sendo de grande relevância no entendimento dos determinantes moleculares de interação entre proteína-proteína e proteína-RNA.

Palavras-chave: Selenocisteína. Interação proteína-proteína. Interação proteína-RNA.

ABSTRACT

FERNANDES, J. S. **Study of the selenocysteine incorporation pathway: understanding the macromolecular interaction mechanism.** 2019. 217 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

The existence of co-translationally encoded amino acids by the genetic code has stimulated studies on the mechanisms of synthesis, recognition, and incorporation into new polypeptide chains. As an example, the selenocysteine (Sec) biosynthesis pathway, present in eukaryotes and prokaryotes, where the amino acid incorporation occurs at the canonical UGA stop-codon. In Bacteria, the Sec biosynthesis pathway is formed by Selenocysteine synthase (Sela), Specific Elongation Factor (SelB), Selenophosphate synthetase (SelD), Seryl-tRNA synthetase (SerRS) and Selenocysteine lyase (CsdB). The synthesis route also needs two RNAs; a specific tRNA (tRNA^{Sec}) and a sequence in the mRNA (SelenoCysteine Insertion Sequence - SECIS) that encodes for the in-frame UGA Sec incorporation. In eukaryotes, the pathway is distinguished through the presence of O-phosphoseryl-tRNA^{Sec} kinase (PSTK) and Selenocysteinyl-tRNA^{Sec} synthase (SepSecS), replacing Sela, also the presence of SECIS binding proteins (SBP2). Once selenium presents high cell toxicity, it is crucial to fully understand the catalytic metabolism and complex formation for the tRNA^{Sec} incorporation. In 2009, CsdB and SelD interaction was proposed, however, it has not been experimentally demonstrated until now. Thus, this project reports at the first time the biophysical and structural characterization of bacterial CsdB and SelD macromolecular interaction, indicating to a high-affinity interaction between these enzymes for the complex formation. Biophysical assays showed that the complex increased the thermal stability and structural studies showed a low-resolution model also indicating the macromolecule asymmetry. In addition, our research group reported in 2013 the putative SBP2 sequence in *N. gruberi*, the non-pathogenic amoeba used as a model for studies of *N. fowleri*, known as human infective, responsible for the pathology known as the *Primary Amebic Meningoencephalitis*. Moreover, this project also reports, at the first time, the experimental presence of *N. gruberi* SBP2. The SBP2.SECIS was also characterized by several biophysical methods. NgSBP2 has a high percentage of regions of disorder and access to each element SECIS presents due to interaction. Thus, this study was promoted in advance on the molecular interactions present in the incorporation of selenocysteines, being important for the understanding of the molecular determinants of the interaction between protein-protein and RNA-protein.

Keywords: Selenocysteine. Protein-protein interaction. Protein-RNA interaction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Exemplos dos efeitos da deficiência e excesso de selênio em animais. (A) Músculo afetado pela doença do músculo branco (superior) em comparação ao músculo sadio (inferior). (B) Um bezerro demonstrando fraqueza para se manter em pé devido à deficiência de selênio no organismo. (C) Suínos apresentando paralisia (superior) e tetraplegia (inferior) após serem expostos a altas doses de selênio. 37
- Figura 2 -** Efeitos da deficiência e excesso de selênio em humanos. A selenose, ou excesso de selênio no organismo pode provocar (A) Alopecia e (B) Enfraquecimento das unhas, mostrado através das linhas de descoloração (leuconiquia). A deficiência do selênio no organismo está relacionada a algumas doenças como (C) Doença de *Keshan*, uma cardiomiopatia severa. Observa-se a radiografia de um coração aumentado devido à patologia. (D) Doença de *Kashin-Beck*, um distúrbio osteoarticular que provoca deformidade nas articulações e redução de mobilidade articular. À esquerda, uma radiografia de um menino de 14 anos saudável, à direita, uma radiografia de um menino de 14 anos com a doença de *Kashin-Beck*. Observa-se o estreitamento dos espaços articulares. 39
- Figura 3 -** Esquema comparativo dos aminoácidos cisteína, serina e selenocisteína, evidenciada pela presença do elemento selênio (rosa) na posição do enxofre (verde) característico da cisteína e oxigênio (azul) característico da serina. 40
- Figura 4 -** Representação em trevo do (A) tRNA^{Sec} de humanos em comparação ao (B) tRNA^{Phe} de *S. cerevisiae*. Representação em cadeia dos tRNAs encontrados acima. As cores representam os braços do tRNA (verde: anticódon, vermelho: braço aceptor, azul: D-loop, amarelo: braço variável e laranja: TΨC). Observa-se a presença do anticódon UCA no tRNA^{Sec} bem como a extensão do braço variável, em comparação com o tRNA^{Phe} de leveduras e outros tRNAs. 42
- Figura 5 -** Representação dos elementos SECIS de eucariotos e bactérias indicando as diferenças estruturais. (A) Eucariotos – Forma 1, conhecida como a forma canônica. (B) Eucariotos – Forma 2. (C) Bactérias. Em *Eukarya* e *Archaea* o elemento SECIS se localiza na região 3'-UTR e em bactérias está localizado logo após o códon Sec-UGA. 43
- Figura 6 -** Esquema descrevendo as etapas envolvidas na síntese de Sec em *Bacteria*, tendo como modelo o organismo *E. coli*. As diferentes proteínas envolvidas no processo de síntese estão representadas pelas suas estruturas. Em azul, tRNA^{Sec} (PDB ID 3A3A); em laranja, Seril-tRNA sintetase (SerRS – PDB ID 2DQ3); em amarelo, Selenocisteína sintase (SelA – PDB ID 3W1H); em rosa, fator de alongação específico (SelB – PDB ID 4ZU9); em verde, Selenofosfato sintetase (SelD – PDB ID 3U00), em violeta, Selenocisteína liase (CsdB – PDB ID 1JF9). 45
- Figura 7 -** Diferenças entre a conversão Ser-Sec tRNA^{Sec} catalisada pelas enzimas SelA (*Bacteria*), PSTK e SepSecS (*Archaea* e *Eukarya*). Na via em *Bacteria* a enzima SelA (Selenocisteína sintase) faz a conversão Ser-tRNA^{[Ser]Sec} à Sec-tRNA^{Sec}. Já em *Archaea* e *Eukarya*, essa conversão é feita pelas enzimas PSTK (O-fosforil-tRNA^{Sec} quinase) que faz a fosforilação do Ser-Sec tRNA^{Sec} formando o Sep-tRNA^{[Sep]Sec}, localizado ao centro da figura. A conversão de Sep-tRNA^{[Sep]Sec} à Sec-tRNA^{Sec} é feita pela SepSecS (Selenociteil-tRNA sintase), também uma enzima PLP dependente. 46
- Figura 8 -** Fator de alongação específico para a incorporação de selenocisteína nas cadeias polipeptídicas nascentes. (A) Estrutura cristalográfica do fator de alongação específico, EFSec de *M. maripaludis*, uma arqueia metanogênica (PDB ID 4ACA). (B) Sobreposição do EFSec de arqueias (em verde) com o fator de 47

elongação específico de bactérias, SelB (PDB ID 4ZU9, em magenta). Observa-se que a região carboxi-terminal de bactéria é mais extensa devido à região de reconhecimento e interação ao elemento SECIS. Assim, evidencia-se a ausência desta região em arqueias, sendo necessária uma proteína específica para ligação ao elemento SECIS (SBP2).

- Figura 9 -** Via de incorporação de selenocisteína (Sec) em *Archaea*. As diferentes proteínas envolvidas no processo de síntese estão representadas pelas suas estruturas. Em azul, tRNA^{Sec} (PDB ID 3A3A); em laranja, Seril-tRNA-sintetase (SerRS – PDB ID 2ZR2); em amarelo, O-fosfoseril-tRNA^{Sec} quinase (PSTK - PDB ID 3AM1); em amarelo claro, Selenocisteil-tRNA sintase (SepSecS – PDB ID 2Z67); em verde, fator de elongação específico (EFSec – PDB ID 4ACA). Em processo análogo à *Bacterias*, a via de biossíntese de selenocisteína possui duas vias de entrada: uma contendo o tRNA e outra, o selênio, através da aminoacilação do tRNA específico e através da reciclagem de Sec-seleneto pela NifS, respectivamente. Em *Archaea* é previsto ter SBP2, mas até o momento não foi identificada. 48
- Figura 10 -** Etapas envolvidas na síntese de selenocisteína (Sec) no domínio *Eukarya*. As diferentes proteínas envolvidas no processo de síntese estão representadas pelas suas estruturas. Em azul, tRNA^{Sec} (PDB ID 3A3A); em laranja, Seril-tRNA-sintetase (SerRs – PDB ID 4RQE); em amarelo, O-fosfoseril-tRNA^{Sec} quinase (PSTK - PDB ID 3BC8); em amarelo claro, Selenocisteil-tRNA sintase (SepSecS – PDB ID 3HL2); em pink, fator de elongação específico (eEFSec – PDB ID 5IZK); em verde, Selenofosfato sintetase 2 (SPS2 – PDB ID 5L16); em rosa, proteína do tipo NifS (NifS, PDB ID 4Q75). A via de biossíntese de selenocisteína é análoga ao descrito para a via em *Archaea*. 49
- Figura 11 -** Estado da arte para as enzimas *EcCsdB* e *EcSelD*. (A) Estrutura cristalográfica da enzima CsdB⁵⁰ de *E. coli*. (B) Modelo proposto por Itoh e colaboradores em 2009 sobre a interação entre *EcSelD* e *EcCsdB*.⁵³ (C) Modelo estrutural da enzima SelD de *E. coli* obtido por cristalografia de proteínas em 2012.³⁸ 51
- Figura 12 -** Modelo de interação proposto no qual a SBP2 reconhece o elemento SECIS quando há uma pausa na tradução. Este complexo por sua vez, recruta o complexo eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} para o sítio A do ribossomo, permitindo a incorporação de selenocisteína na cadeia polipeptídica. 52
- Figura 13 -** Condições da reação em cadeia da polimerase. Desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos consecutivos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento durante 45 segundos a 55 °C e extensão a 72 °C durante 1,5 minutos e, por fim, um ciclo final de extensão a 72 °C durante 7 minutos e estoque a 4 °C após o término da reação. 60
- Figura 14 -** Mudanças no espectro de emissão do Triptofano (Trp). Quando o máximo se desloca para comprimentos de onda maiores (frequências menores), observa-se, em geral, uma exposição dos resíduos de Trp presente em proteínas. Quando o deslocamento do máximo de emissão é deslocado para comprimentos de onda menores (maiores frequências), é comumente observado uma internalização dos resíduos de Trp. 64
- Figura 15 -** Esquema simplificado para clonagem utilizando o sistema *gateway* (ThermoScientific). O gene de interesse é flanqueado por sequências *attBs*. O vetor doador possui em seu cassete de clonagem um gene para resistência *ccdB* flanqueado por sequências *attP*. A *BP clonase* faz a recombinação destes dois, gerando o vetor de entrada, que corresponde ao vetor doador com o gene de interesse ao invés do gene de resistência *ccdB*. Essa recombinação gera as sequências *attL* que flanqueiam o gene de interesse no vetor de entrada. Uma vez pronto o vetor de entrada, este pode ser utilizado para qualquer clonagem em 75

vetores otimizados para o sistema *gateway*. Nesse caso, utiliza-se uma *LR clonase* para fazer a recombinação entre vetor de entrada e vetor de destino, gerando assim o clone de expressão. Essa recombinação é feita devido à presença de sequências *attRs* no vetor de destino, que recombinam com as sequências *attLs*, gerando as sequências *attBs* que flaqueiam o gene de interesse no clone de expressão.

- Figura 16 -** Cromatografia de dessalinização utilizando coluna *Desalting* (Amersham). Monitorou-se a absorvância em 280 nm (linha em azul) para realizar a coleta do pico. A condutividade (linha em marrom) foi observada entre os intervalos das injeções (linhas em rosa). Os vários picos com mesmo perfil referem-se às múltiplas injeções sequencialmente utilizadas. 79
- Figura 17 -** Cromatografia de troca iônica utilizando a coluna *DEAE Sepharose* (GE). A linha em verde corresponde ao aumento linear da concentração salina entre 0 e 1 M. O pico indicado com o número 6 na figura corresponde à proteína *EcCsdB*, sendo eluída em aproximadamente 350 mM NaCl (Canaleta 6 da Figura 19). 80
- Figura 18 -** Cromatografia de exclusão molecular de *EcCsdB* em coluna *Superdex 200 10/300* (GE). O pico indicado na figura corresponde à *EcCsdB* (Canaleta 7 da Figura 19). 80
- Figura 19 -** SDS-PAGE 15% resultante das etapas de purificação de *EcCsdB*. Nas canaletas tem-se: (1) marcador molecular (kDa); (2) extrato proteico bruto; (3) sobrenadante após a precipitação com sais iônicos; (4) *pellet* proteico após a precipitação com sais iônicos; (5) amostra após a cromatografia de dessalinização utilizando coluna *Desalting* (Amersham); (6) amostra eluída da cromatografia de troca iônica utilizando coluna *DEAE Sepharose* (GE); (7) amostra eluída da cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna *Superdex 200 10/300*. Verifica-se que ao final de todo o processo de purificação a proteína *EcCsdB* encontra-se com elevado grau de pureza. 81
- Figura 20 -** Cromatografia de afinidade de *EcSelD* em coluna de Ni^{2+} -NTA (HiTrap – Amersham). A linha em verde corresponde ao aumento linear da concentração de imizadol, 10-500 mM. (Canaleta 4 da Figura 22). 82
- Figura 21 -** Cromatografia de exclusão molecular de *EcSelD*, em coluna *Superdex 200 10/300*. O pico indicado corresponde à *EcSelD* (Canaleta 7 da Figura 22). 82
- Figura 22 -** SDS-PAGE 15% das amostras coletadas nas etapas de purificação da proteína *EcSelD*. As canaletas correspondem a (1) Marcador molecular (kDa); (2) Extrato proteico bruto; (3) Fração não interagente à coluna; (4) Fração de maior intensidade (maior absorvância em 280 nm) coletado da cromatografia de afinidade em coluna de Ni^{2+} -NTA (Hi-Trap – Amersham); (5) Amostra após proteólise (1 u/100 μg); (7) Fração do pico de maior absorvância em 280 nm resultante da cromatografia de exclusão molecular em *Superdex 200 10/300* (GE). 83
- Figura 23 -** Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico a 25 °C para (A) *EcCsdB*, com diâmetro hidrodinâmico de $(7,9 \pm 1,6)$ nm e (B) *EcCsdB*, com diâmetro hidrodinâmico de $(6,6 \pm 1,2)$ nm. O experimento foi realizado em triplicata experimental e cada curva corresponde a cada uma das medidas. 84
- Figura 24 -** Medidas de dicroísmo circular para *EcSelD*. (A) Espectros VT-CD da proteína *EcSelD*. Observa-se uma estabilidade até 45 °C e, a partir de 50 °C, há perda de estrutura secundária. (B) Curva de desnaturação térmica para *EcSelD*, monitorando-se o comprimento de onda em 222 nm. Em vermelho, o ajuste de *Boltzmann* indicando uma T_m de $(47,4 \pm 0,1)$ °C. 85
- Figura 25 -** Medidas de dicroísmo circular para a enzima *EcCsdB*. (A) Espectros de VT-CD da *EcCsdB* para diferentes temperaturas. Observa-se uma estabilidade até 55 °C e 86

a partir de 60 °C há perda de estrutura secundária. (B) Curva de desnaturação térmica para *EcCsdB*, monitorando-se o comprimento de onda em 222 nm. Em vermelho, o ajuste de *Boltzmann* indicando uma T_m de $(66,5 \pm 0,5)$ °C.

- Figura 26 -** Medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca da *EcSelD*. (A) Espectros de emissão obtidos para a proteína, com comprimento de onda de excitação de 295 nm, com filtro 295 nm e λ_{MAX} -emissão = 322 nm.. As medidas foram feitas a 10 °C (curva em preto) e a 25 °C (curva em vermelho). A excitação em 295 nm reflete a emissão dos resíduos aromáticos, em especial, os triptofanos. (B) Dímero de *EcSelD* (PDB ID 30UO) com estrutura em cadeia, com destaque para a localização dos triptofanos, em laranja. Observa-se que eles se localizam mais externamente à estrutura, sendo de fácil acesso ao solvente. 88
- Figura 27 -** Medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca da *EcCsdB*. (A) Espectros de emissão obtidos para a proteína, com comprimento de onda de excitação de 295 nm, com filtro 295 nm e λ_{MAX} -emissão = 330 nm. As medidas foram feitas a 10 °C (curva em preto) e a 25 °C (curva em vermelho). A excitação em 295 nm reflete a emissão dos resíduos aromáticos, em especial, os triptofanos. (B) Espectro de emissão do PLP, com comprimento de onda de excitação em 423 nm. (C) Dímero de *EcCsdB* (PDB ID 1JF9) com estrutura em cadeia, com destaque para a localização dos triptofanos, em rosa e roxo. O PLP está destacado em azul na estrutura. Observa-se que os triptofanos em rosa estão mais enterrados na estrutura e, aqueles em roxo estão mais externos. 89
- Figura 28 -** Espectro de absorção UV-Vis da *EcCsdB* ligada ao PLP (em preto). As setas indicam a absorção dos resíduos aromáticos na *EcCsdB* (280 nm) e do PLP (423 nm). Em vermelho, espectro de absorção 10X menor. 90
- Figura 29 -** Ensaio de atividade enzimática de *EcCsdB* na conversão Sec-seleneto. A concentração de enzima foi mantida constante de 20 μ M e a concentração de selenocisteína variada entre 0 e 3,7 mM em diluição seriada. O monitoramento foi realizado em 423 nm, uma vez que o produto formado possui uma banda de absorção de 380-480 nm. O ajuste foi feito pela função de *Michaelis-Menten*, em triplicata, com desvio padrão de $4,15 \times 10^{-6}$, resultando em $K_M = 0,9$ mM e $V_{max} = 1,4$ μ M/s. 91
- Figura 30 -** Medidas de IFS, excitando-se em 423 nm, para a interação *EcCsdB.EcSelD*. Medidas para o complexo na ausência de ligantes (A), na presença de seleneto (B) e na presença de selenocisteína (C). O ajuste de *Hill* resultou em $K_{Dapp} = (19,8 \pm 2,2)$ nM, $(13,3 \pm 2,4)$ nM e $(1,8 \pm 0,4)$ nM, com R^2 de 0,93, 0,97 e 0,90 para os ajustes experimentais para as interações dos complexos *EcCsdB.EcSelD*, *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻* e *EcCsdB.EcSelD.Sec*, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e o resultado apresentado corresponde à média das medidas. 93
- Figura 31 -** Gráficos de $Abs_{280nm} \times r$ (cm) obtidos nas análises de Ultracentrifugação analítica em sedimentação em equilíbrio, monitorando-se o comprimento de onda de 280 nm (ANEXO 3). Valores residuais para cada medida podem ser observados na parte inferior de cada curva experimental. 1 corresponde à razão estequiométrica de 1 *EcCsdB*:0,5 *EcSelD*, 2, à razão 1 *EcCsdB*:1 *EcSelD* e por fim, 3, à razão 1 *EcCsdB*:2 *EcSelD* (A) Medidas para o complexo *EcCsdB.EcSelD*, (B) *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻*, e (C) *EcCsdB.EcSelD.Sec*, resultando em $K_{D-m\u00e9dio} = 24,4$ nM, 14,4 nM e 1,8 nM, respectivamente. 96
- Figura 32 -** Termogramas de DSC obtidos para (A) *EcSelD*, (B) *EcCsdB* e para o complexo binário na estequiometria de *EcCsdB* 1 : 1,5 *EcSelD* (C) e *EcCsdB* 1 : 2 *EcSelD* (D). Em preto, tem-se a curva experimental e, em cinza, o ajuste pelo modelo de não dois estados. A maior sobreposição do termograma para o complexo indica a formação do complexo. A linha em verde corresponde à T_m de *EcSelD* e a linha 98

em rosa, de EcCsdB. As setas indicam um deslocamento da T_m, para temperaturas maiores, indicando maior estabilidade térmica. Os experimentos realizados em duplicata estão indicados com x2.

- Figura 33 -** Determinação da variação de entalpia aparente (ΔH_{ap}) da interação entre EcCsdB e EcSelD, utilizando injeção única de 8 μ L de EcCsdB na EcSelD. Em vermelho, tem-se o calor de diluição de EcCsdB no tampão KPB-150 NaCl. Este valor foi subtraído do valor da variação de entalpia, representada pela curva em preto. O tratamento dos dados resultou em $\Delta H_{ap} = -11$ kcal/mol. 100
- Figura 34 -** Perfil termodinâmico da interação EcCsdB.EcSelD. Em azul, a variação da energia livre de Gibbs da interação, $\Delta G_{ap} = -15,9$ kcal/mol; em vermelho, a variação de entalpia da interação, $\Delta H_{ap} = -11$ kcal/mol; em verde a contribuição entrópica, sendo T a temperatura de análise e $T\Delta S_{ap} = 4,92$ kcal/mol a contribuição entrópica da interação. Observa-se que a interação é, portanto, favorável, uma vez que $\Delta G < 0$ e a maior contribuição é entálpica. 101
- Figura 35 -** Ensaio de *pull-down* para a interação EcCsdB.EcSelD em SDS-PAGE 8%. Imobilizou-se na coluna de Ni²⁺-NTA a enzima EcSelD e por ela, passou-se uma solução contendo EcCsdB. Em seguida, realizou-se uma cromatografia de afinidade com aumento da concentração de imidazol. (1) Marcador molecular (kDa). Os controles foram submetidos a mesma eletroforese em gel, sendo EcCsdB (2) com 44,4 kDa e (3) EcSelD com 36,6 kDa. (4) fração não interagente à coluna. (5) lavagem com 30 mM de imidazol e (6) eluição com 500 mM de imidazol. Observa-se que grande parte de EcCsdB não interagiu, sendo eluída na lavagem. Apesar disso, verifica-se que uma fração de EcCsdB interagiu com a EcSelD, sendo ambas as amostras co-eluídas. 102
- Figura 36 -** Análise do coeficiente de sedimentação para EcCsdB, EcSelD e o complexo formado. O tratamento dos dados através da função de distribuição contínua c(s) resultou em $S_w = 4,90$ S para EcSelD, $S_w = 5,64$ S para EcCsdB e $S_w = 8,39$ S para o complexo binário. Verifica-se então a formação do complexo, uma vez que ele possui maior coeficiente de sedimentação. 103
- Figura 37 -** Visualização do complexo macromolecular EcCsdB.EcSelD coletado por NS-EM. 105
- Figura 38 -** Seleção de algumas partículas do complexo binário através de NS-EM. A seleção das partículas foi realizada através de método de correlação cruzada utilizando 5 referências manualmente selecionadas, resultando em um conjunto com aproximadamente 200 partículas únicas. 105
- Figura 39 -** Aproximação de Guinier para (A) EcCsdB; (B) EcSelD e (C) EcCsdB.EcSelD, resultando em $R_g = 30,4$ Å, $R_g = 32,7$ Å e $R_g = 41,1$ Å, respectivamente. Observa-se que o R_g obtido para o complexo é maior em comparação com os homodímeros, indicando formação do complexo. 107
- Figura 40 -** Função de distribuição dos pares, p(r) das amostras em análise. p(r) obtida para EcCsdB, em preto, EcSelD, em vermelho e, EcCsdB.EcSelD, em azul. Em comparação aos homodímeros, verifica-se que D_{max} do complexo binário é maior, indincao a formação do mesmo. 108
- Figura 41 -** Modelos *ab initio* de baixa resolução gerados por SAXS para: (A) O complexo binário EcCsdB.EcSelD; (B) EcCsdB e (C) EcSelD. No interior dos envelopes foram ajustados: (A) modelo *in silico* gerado para o complexo, (B) estrutura cristalográfica da Selenocisteína liase (PDB ID 1JF9) e (C) Selenofosfato sintetase (PDB ID 3U0O). O envelope para EcCsdB e EcSelD estão de acordo com as estruturas já depositadas e apresentam-se com eixo de simetria de ordem 2. O modelo gerado para o complexo não apresenta simetria inerente à molécula. 109

Figura 42 -	Sobreposição dos envelopes moleculares obtidos por SAXS. Em cinza, o envelope do complexo binário <i>EcCsdB.EcSelD</i> ; em laranja, <i>EcCsdB</i> ; em azul, <i>EcSelD</i> . O envelope gerado para o complexo é maior em comparação com os envelopes dos homodímeros, além disso, observas-se que a forma do complexo é menos compacta.	110
Figura 43 -	Espectroscopia de anisotropia de fluorescência de <i>EcCsdB</i> com os peptídeos sintetizados. Cys corresponde ao peptídeo contendo a cisteína catalítica de <i>EcSelD</i> (Cys17) e Ala corresponde ao controle negativo da interação, no qual o resíduo Cys17 catalítico foi substituído por uma alanina. As medidas foram feitas para os complexos na ausência de ligantes, na presença de seleneto e de selenocisteína. O controle negativo apresentou interação inespecífica pra o primeiro caso (ausência de ligantes), enquanto que para o Pep-Cys, o ajuste de <i>Hill</i> revelou uma $K_{Dapp} = 7,2$ nM enquanto que o controle negativo não apresentou perfil de interação juntamente com os substratos de <i>EcCsdB</i> . O experimento foi realizado em duplicata biológica.	112
Figura 44 -	Espectros normalizados de dicroísmo circular para a interação <i>EcCsdB.Pep-Cys</i> . O peptídeo construído não possui nenhum tipo de enovelamento. Já a proteína apresenta algumas diferenças no espectro quando interage com o peptídeo. Há diminuição do sinal relativo de CD bem como deslocamento dos mínimos, indicando que houve mudanças a nível de estrutura secundária. <i>Inset</i> : destaque para o sinal relacionado ao Pep-Cys.	113
Figura 45 -	Estrutura cristalográfica de <i>EcCsdB</i> , resolvida por cristalografia de proteínas (PDB ID 1JF9). Destaca-se o acesso ao sítio ativo, em amarelo o PLP ligado no sítio ativo da enzima e, em verde, a posição da Cys364 catalítica. Observa-se que o sítio não encontra-se internalizado na estrutura, sendo, portanto, permitido o acesso do Pep-Cys.	116
Figura 46 -	Cristais de <i>EcCsdB</i> produzidos para realização do soaking com Pep-Cys. . Destaca-se a coloração amarelada dos cristais devido a presença do PLP covalentemente ligado à <i>EcCsdB</i> .	116
Figura 47 -	Densidade eletrônica após primeiro ciclo de refinamento utilizando o programa Phenix. Em destaque a Cys 364 de <i>EcCsdB</i> . . Em verde, o mapa Fo-Fc e em azul, o mapa 2Fo-Fc.	117
Figura 48 -	Conteúdo da unidade assimétrica de <i>EcCsdB</i> colorido N-terminal (azul) para C-terminal (vermelho).	119
Figura 49 -	Destaque para o íon sódio coordenando E 95 e E248. À esquerda: densidade eletrônica indicando a coordenação do íon. À direita: visualização da coordenação pelo programa PyMOL. ⁸¹	119
Figura 50 -	Diagrama de Ramachandram da estrutura depositada no banco de dados (PDB ID 6DN6).	120
Figura 51 -	Visualização da densidade correspondente ao peptídeo. Em verde, o mapa Fo-Fc e em azul, o mapa 2Fo-Fc.	121
Figura 52 -	Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação dos genes <i>csdB</i> e <i>selD</i> de <i>E. coli</i> para clonagem através de sistema <i>gateway</i> . (A) Amplificação a partir de uma alíquota de DNA genômico. (B) amplificação utilizando como DNA molde o produto da primeira PCR. Verifica-se que as bandas possuem tamanho esperado (1221 pb para <i>csdB</i> e 1044 pb para <i>selD</i>).	123
Figura 53 -	Gel de agarose 1% para confirmação da recombinação dos vetores de entrada com	124

os vetores de destino, gerando os clones de expressão. (A) PCR de confirmação dos genes *csdB* e *selD* no vetor pGBKcG. (B) PCR de confirmação dos genes *csdB* e *selD* no vetor pGADcG. Os números acompanhando o nome dos genes correspondem a cada uma das colônias testadas.

- Figura 54 -** Ensaio de ativação do gene repórter *HIS3* para verificação da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* em sistema in vivo. 125
- Figura 55 -** Resultados obtidos pela ferramenta *BLASTp* (NCBI). O domínio NT da SBP2 de *N. gruberi* não apresentou alinhamento com nenhuma sequência do banco de dados não redundante, enquanto que o domínio CT da SBP2 de *N. gruberi* apresentou um alinhamento com SBP2s de outros organismos, com cobertura de 55% e 32% de identidade com a SBP2 de *Scleropages formosus*, um peixe ornamental.¹²² 151
- Figura 56 -** Predição de domínios conservados através da ferramenta PFAM para a NgSBP2. Verifica-se que a região amino terminal não possui domínios conservados com o banco de dados, enquanto que a região carboxi-terminal apresenta o domínio Ribossomal L7Ae, representado em verde, comum para SBP2s. 152
- Figura 57 -** Resultados obtidos pela análise do SAS – PDBSum. Verifica-se que a região da L203 é predita como uma região não estruturada. 152
- Figura 58 -** Eletroforese em gel de agarose 1% após coloração com Sybr Safe® correspondentes às etapas realizadas para obtenção dos genes *sbp2CT* (A)-(C) e *sbp2NT* (D)-(F) de *N. gruberi* em vetores de expressão. (A) e (D) Amplificação através de PCR a partir de uma alíquota de DNA genômico, resultando nas bandas de tamanho esperado, sendo 849 pb para *sbp2CT* e 603 pb para *sbp2NT*. (B) e (E) Digestão com enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* após a ligação dos insertos no vetor de propagação *pJET1.2 blunt*. Observam-se duas bandas em cada gel, sendo as correspondentes ao vetor (~3000 pb) e as correspondentes aos insertos de interesse com seus respectivos tamanhos. (C) e (F) Confirmação por PCR após ligação nos vetores de expressão, sendo pET-TEV não comercial para o gene *sbp2CT* e pET28a(+) (Novagen) para o gene *sbp2NT*. Novamente observam-se as bandas de tamanho esperado. As canelatas (1) correspondem ao marcador molecular *Gene Ruler 1kb Plus* (Fermentas), e as canaletas (2) as etapas descritas acima. 153
- Figura 59 -** SDS-PAGE 12% para o teste de expressão de (A) NgSBP2-CT e (B) NgSBP2-NT. (1) Marcador molecular; (2) cultura não induzida; (3)-(8) indução com 1 mM de IPTG, sendo monitorados os tempos de 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h e 18 h de indução, respectivamente. Com 3 h de indução é possível observar um aumento da intensidade das bandas correspondentes a cada uma das proteínas, sendo indicadas com uma seta. 154
- Figura 60 -** *Western blot* realizado para detecção da His-TAG. (1) *Spectra Broad Range* (Fermentas); (2) NgSBP2-CT não induzida; (3) NgSBP2-CT induzida com 1 mM de IPTG por 3 h; (4) NgSBP2-NT não induzida e (5) NgSBP2-NT induzida com 1 mM de IPTG por 3 h. Verifica-se, primeiramente, a presença da His-TAG, indicando que as bandas observadas no teste de expressão correspondem às proteínas de interesse fusionada a cauda de hexa-histidinas. Além disso, observa-se um aumento da intensidade nas amostras induzidas, indicando que houve a super expressão das proteínas de interesse. 155
- Figura 61 -** SDS-PAGE 12% resultante da etapa de purificação dos truncamentos da NgSBP2-CT (2)-(5) 3 NgSBP2-NT (7)-(10). (1) Marcador molecular; (2) Extrato celular bruto; (3) Fração não interagente à coluna; (4) Lavagem com 20 mM de imidazol; (5) Eluição de NgSBP2-CT com 500 mM de imidazol. (7) Extrato celular bruto; (8) Fração não interagente à coluna; (9) Lavagem com 20 mM de 156

imidazol; (10) Eluição de NgSBP2-NT com 500 mM de imidazol.

- Figura 62 -** Gel de agarose 2% para obtenção do DNA molde do elemento SECIS. (1) Padrão de pares de bases (*GeneRuler* 1 kb Plus DNA Ladder - ThermoScientific); (2)-(4) DNA molde do elemento SECIS com tamanho esperado, de 75 pb. 157
- Figura 63 -** Monitoramento do enovelamento do elemento SECIS por CD. (A) Espectros de CD variando-se a temperatura de 90 °C a 10 °C. Observa-se um aumento do sinal em 268 nm com a diminuição da temperatura, indicando um maior pareamento de bases formado com o perfil em “S”. (B) Monitoramento dos máximos em 268 nm. O ajuste de *Boltzmann* (em vermelho) revela uma $T_m = (47.9 \pm 2.7) ^\circ\text{C}$. 158
- Figura 64 -** Medidas de CD para NgSBP2-CT. (A) Espectros em função da temperatura. Observa-se uma elevada estabilidade térmica para a amostra, sendo que esta começa a ter perda de estruturas secundárias a partir de 55 °C. (B) Monitoramento dos mínimos em 208 nm, obtendo, através do ajuste de *Boltzmann*, uma $T_m = (59,3 \pm 3,8) ^\circ\text{C}$. 159
- Figura 65 -** Medidas de CD para NgSPB2-NT. (A) Espectros em função da temperatura. Observa-se um perfil de estruturas não ordenadas. (B) Curva de desnaturação térmica, mostrando que não é possível determinar a T_m por esta técnica, indicando novamente que NgSBP2-NT deve ter muitas regiões de desordem. 160
- Figura 66 -** Determinação do percentual de estruturas secundárias por FTIR. Análise da banda Amida-I de (A) NgSBP2-CT e (B) NgSBP2-NT. 162
- Figura 67 -** Medidas de Espalhamento de luz dinâmico para (A) NgSBP2-CT, com diâmetro hidrodinâmico de $(10,2 \pm 1,5)$ nm e (B) NgSBP2-NT, com diâmetro hidrodinâmico de $(9,8 \pm 0,6)$ nm. O experimento foi realizado em triplicata e cada curva corresponde a cada uma das medidas. 163
- Figura 68 -** Termogramas de DSC obtidos para NgSBP2-NT, NgSBP2-CT. Observa-se uma transição do tipo não-cooperativa para as amostras. Dessa forma, não foi possível determinar o valor da T_m para os truncamentos da proteína interagente ao elemento SECIS de *N. gruberi*. 164
- Figura 69 -** Gráficos de *Kratky* para (A) NgSBP2-CT e (B) NgSBP2-NT. Verifica-se que o truncamento CT é altamente flexível enquanto que o truncamento NT é desestruturado. 166
- Figura 70 -** Análises utilizando *EOM* para NgSBP2-CT. (A) Distribuição de R_g , sendo em cinza a distribuição do *pool* de conformações gerados pelo programa. E em preto, o *ensemble* que melhor se ajusta aos dados experimentais. Observa-se que a distribuição apresenta uma pequena variação, sendo o pico máximo em 34,1 Å. (B) Distribuição de D_{max} . As cores representam o mesmo mencionado anteriormente, Verifica-se uma distribuição mais ampla, com máximo em 104,5 Å. 167
- Figura 71 -** Análises utilizando *EOM* para NgSBP2-NT. (A) Distribuição de R_g , sendo em cinza a distribuição do *pool* de conformações gerados pelo programa. E em preto, o *ensemble* que melhor se ajusta aos dados experimentais. Observa-se que a distribuição apresenta variação maior, indicando várias populações diferentes. (B) Distribuição de D_{max} . As cores representam o mesmo mencionado anteriormente, Verifica-se uma distribuição mais ampla, com D_{max} variando de 96,3 a 192,8 Å. 167
- Figura 72 -** Modelos produzidos pelo EOM a partir do *ensemble* selecionado para determinação dos parâmetros de SAXS. (A) Modelo utilizado para NgSNP2-NT e (B) Modelo utilizado para NgSBP2-CT. 168

Figura 73 -	Visualização das amostras(A) <i>NgSBP2-NT</i> e (B) <i>NgSBP2-CT</i> por NS-EM.	169
Figura 74 -	Medidas de FAS excitando-se em 492 nm. (A) Medidas de interação <i>NgSBP2-CT.SECIS</i> , (B) <i>NgSBP2-NT.SECIS</i> e (C) <i>NgSBP2-NT</i> ao complexo (<i>NgSBP2-CT.SECIS</i>). O ajuste de <i>Hill</i> resultou em constante de dissociação aparente de $(175,1 \pm 19,2)$ nM, com R^2 0,98, para o complexo (A) e de $(77,6 \pm 5,9)$ nM, com R^2 0,97, para o complexo (C). O complexo (B) não apresentou perfil de interação.	171
Figura 75 -	Gráficos $Abs_{280nm} \times r$ (cm) obtidos nas análises de Ultracentrifugação analítica em sedimentação em equilíbrio (acima), monitorando-se o comprimento de onda de 280 nm (ANEXO 3). Valores residuais para cada medida (parte inferior de cada dado experimental). (A) Medidas para o complexo <i>NgSBP2-CT.SECIS</i> , obtendo-se um valor de $K_{D-m\u00e9dio} = 170,9$ nM. Os índices 1 e 2 correspondem às estequiometrias de 0,5:1 e 1:1 de <i>NgSBP2-CT:SECIS</i> , respectivamente. Não foi possível analisar a estequiometria de 2:1 devido a problemas na cela contendo esta amostra. (B) Medidas para o complexo <i>NgSBP2-CT. NgSBP2-NT</i> , com um valor de $K_{D-m\u00e9dio} = 143,3$ nM. Os índices 1, 2 e 3 correspondem às estequiometrias de 0,5:1, 1:1 e 2:1 de <i>NT:CT</i> , respectivamente (C) Medidas para o complexo (<i>NgSBP2-CT.SECIS</i>). <i>NgSBP2-NT</i> , resultando em um $K_{D-m\u00e9dio} = 74,1$ nM.	174
Figura 76 -	Determinação do percentual de estruturas secundárias por FTIR do complexo <i>NgSBP2-CT</i> interagente ao elemento <i>SECIS</i> .	176
Figura 77 -	Análise do coeficiente de sedimentação para os truncamentos <i>NgSBP2-CT</i> , <i>NgSBP2-NT</i> , bem como o complexo entre eles e <i>NgSBP2-CT</i> com o elemento <i>SECIS</i> . O tratamento dos dados através da função de distribuição contínua $c(s)$ resultou em $S_w = 3,97$ S para <i>NgSBP2-CT</i> , $S_w = 6,50$ S para <i>NgSBP2-NT</i> , $S_w = 3,87$ S para o complexo entre eles e $S_w = 3,51$ S para <i>NgSBP2-CT.SECIS</i> .	178
Figura 78 -	Histograma da análise por ELISA do antissoro produzido para <i>NgSBP2-CT</i> . Em azul, as medidas de absorbância observadas em 450 nm. Em marrom, o erro associado às medidas.	180
Figura 79 -	Curva de crescimento de <i>Naegleria gruberi</i> em meio ATCC 1034, para determinação do tempo de dobra. A contagem foi realizada ao longo de 9 dias consecutivos.	181
Figura 80 -	Ensaio de estresse oxidativo em cultura de <i>N. gruberi</i> . A contagem foi feita a cada 12 h em um período de 48 h. Verifica-se que a concentração de 50 μ M de H_2O_2 possui crescimento celular similar ao da cultura controle. As concentrações de H_2O_2 de 100 μ M e 200 μ M provocam maiores efeitos na cultura, sendo o de maior concentração correspondente ao maior dano. O experimento foi realizado em triplicata biológica.	182
Figura 81 -	Ensaio de estresse oxidativo em meio suplementado com seleneto e selenocisteína em cultura de <i>N. gruberi</i> . A cultura foi mantida por 48 h, sendo a contagem das células realizadas a cada 12 h. Observa-se que a cultura estressada com 100 μ M de H_2O_2 suplementada tanto com seleneto como com selenocisteína possui uma curva de crescimento similar da cultura sadia. A cultura estressada com 200 μ M de H_2O_2 apresenta efeitos de morte celular significativos tanto no meio suplementado com seleneto como com selenocisteína. O experimento foi realizado em triplicata biológica.	183
Figura 82 -	Identificação dos truncamentos de <i>NgSBP2</i> por <i>Western blot</i> utilizando os antissoros produzidos para (A) <i>NgSBP2-NT</i> , com título de 1:1000 e (B) <i>NgSBP2-CT</i> , com título de 1:300.	184
Figura 83 -	SDS-PAGE 12% referente ao <i>pulldown</i> realizado para (A) <i>NgSBP2-NT</i> e (B) <i>NgSBP2-CT</i> . As canaletas correspondem a (1) Marcador molecular. (2) Amostras controles. (3) Fração não interagente à coluna previamente equilibrada com	185

tampão de lise contendo as proteínas recombinantes imobilizadas. (4) Lavagem com 20 mM de imidazol. (5) Lavagem com 100 mM de imidazol. (6) Eluição com 500 mM de imidazol. (7) Segunda eluição com 500 mM de imidazol.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Parâmetros em solução obtidos por DLS a 25 °C para <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> ..	84
Tabela 2-	Parâmetros cinéticos obtidos para a conversão Sec-seleneto pela <i>EcCsdB</i> . K_M , constante de <i>Michaelis-Menten</i> ; V_{max} , velocidade máxima.	91
Tabela 3 -	Valores de constantes de dissociação aparente para a interação entre as proteínas <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> obtidas por Ultracentrifugação analítica – sedimentação em equilíbrio.	94
Tabela 4 -	Comparativo entre as constantes de dissociação obtidas por diferentes técnicas para os complexos entre as proteínas <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> .	97
Tabela 5 -	Parâmetros termodinâmicos associados às transições de desnaturação proteica. Temperatura de <i>melting</i> , T_m , variação de entalpia, ΔH_{cal} , obtidos da análise dos termogramas pelo programa MicroCal DSC <i>Origin</i> ®. Os dados experimentais foram ajustados a uma das proteínas (<i>EcCsdB</i> ou <i>EcSelD</i> , individuais) ou às duas proteínas (complexo <i>EcCsdB.EcSelD</i>), considerando-se um modelo de desnaturação do tipo não-dois-estados.	99
Tabela 6 -	Parâmetros obtidos através da análise de SV-AUC. As variáveis representam: S_w , coeficiente de sedimentação, $S_{20,w}$, coeficiente de sedimentação padrão, MM , massa molecular, R_s , raio de <i>Stokes</i> .	103
Tabela 7 -	Parâmetros obtidos pelas medidas de SAXS. Sendo D_{max} , dimensão máxima da partícula e R_g , raio de giro da amostra em solução	108
Tabela 8 -	Resumo dos parâmetros obtidos através das técnicas de DLS, SV-AUC e SAXS	111
Tabela 9 -	Valores de constante aparente obtidos para interação dos peptídeos.	112
Tabela 10 -	Predição de percentual de estruturas secundárias na interação <i>EcCsdB.Pep-Cys</i> na ausência e na presença de selenocisteína. Sendo unrd do tipo não estruturada	114
Tabela 11 -	Dados do processamento e refinamento da estrutura <i>EcCsdB</i> a 1,77 Å.	118
Tabela 12 -	Dados do processamento e refinamento da estrutura <i>EcCsdB</i> contendo o peptídeo em seu sítio ativo.	122
Tabela 13 -	Verificação do crescimento das células de <i>S. cerevisiae</i> , linhagem MaV203, no ensaio de ativação do gene repórter <i>HIS3</i> .	125
Tabela 14-	Análise do perfil de estruturas secundárias dos truncamentos de <i>NgSBP2</i> , utilizando o banco de dados otimizado para estimar estruturas secundárias de proteínas desordenadas. ¹¹² Unrd: não estruturada	160
Tabela 15 -	Percentual de estruturas secundárias para os truncamentos da <i>NgSBP2</i> . $\beta_{ }$, fita β paralela, β_{\perp} , fita β anti-paralela	162
Tabela 16 -	Resultados da medida de DLS dos truncamentos CT e NT da <i>NgSBP2</i> baseado em modelo esférico de proteína.	163
Tabela 17 -	Valores de constantes de dissociação aparente para a interação dos complexos envolvendo as proteínas <i>NgSBP2-NT</i> e <i>NgSBP2-CT</i> , bem como o elemento SECIS, obtidas por SE-AUC.	172
Tabela 18 -	Comparativo entre as constantes de dissociação aparente obtidas para os complexos	175

entre as proteínas NT e CT de *NgSBP2*, juntamente com o elemento SECIS.

Tabela 19 -	Comparativo do percentual de estruturas secundárias obtidas por FTIR para <i>NgSBP2</i> -CT e o complexo deste truncamento com o elemento SECIS.	177
Tabela 20 -	Parâmetros obtidos através da análise de SV-AUC. As variáveis representam: S_w , coeficiente de sedimentação, $S_{20,w}$, coeficiente de sedimentação padrão, MM, massa molecular, R_s , raio de <i>Stokes</i> .	178
Tabela 21 -	<i>Hits</i> encontrados pelo Mascot após análise por espectrometria de massas contra o banco proteômico de <i>N. gruberi</i> .	186
Tabela 22 -	Análises de <i>BLASTp</i> das proteínas identificadas por MS/MS anotadas no genoma de <i>N. gruberi</i> .	187

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔH	Variação de entalpia
ΔG	Variação de energia livre de <i>Gibbs</i>
ΔS	Variação de entropia
3D	Tridimensional
3'-UTR	Região não codificante na extremidade 3'-OH do mRNA
5'-IAF	5-iodoacetamino-fluoresceína
5'-OH	Extremidade 5'-OH do elemento de RNA
Abs	Absorbância
AD	Domínio de ativação da transcrição
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
atm	Pressão atmosférica
ATP γ S	Adenosina gama tiotri-fosfato
c(S)	Distribuição de sedimentação
CD	Dicroísmo circular
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
Co-ip	Co-imunoprecipitação
CsdB	Selenocisteína liase
CT	Domínio carboxi-terminal
CTF	Função de transferência de contraste
CTP	Citidina trifosfato
Cys-tRNA ^{Cys}	tRNA para incorporação de cisteína
DBD	Domínio de ligação ao DNA
D _H	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
D _{máx}	Distância máxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO _{600nm}	Absorbância em 600 nm
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTT	DL-Ditiotreitol
<i>EcCsdB</i>	Selenocisteína liase de <i>E. coli</i>
<i>EcSelD</i>	Selenofosfato sintetase de <i>E. coli</i>
EDTA	Ácido Tilenodiamino tetra-acético
eEFSec	Fator de alongação específico para incorporação de selenocisteína
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FAS	Espectroscopia de anisotropia de fluorescência
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
For	<i>Forward</i>
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
His-TAG	Cauda de hexa-histidina (pET28a(+)) (Novagen))
IDP	Proteína intrinsecamente desordenada
IFS	Espectroscopia de fluorescência intrínseca
IPTG	β -D-1-isopropiltiogalactosídeo
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica
K _A	Constante de associação
K _D	Constante de dissociação
KH ₂ PO ₄	Fosfatp de potássio monobásico
K _M	Constante de <i>Michaelis-Menten</i>

KPB	Tampão fosfato de potássio, 10 mM, pH 7,4
KPB-150 NaCl	KPB suplementado com 150 mM de NaCl
kV	Volt x 10 ³
LB	Luria-Bertani
m/v	Relação massa/volume
MM	Massa molecular
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
N	Normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NgSBP2	Proteína ligadora do elemento SECIS de <i>N. gruberi</i>
NgSBP2-CT	Domínio carboxi-terminal da proteína ligadora do elemento SECIS de <i>N. gruberi</i>
NgSBP2-NT	Domínio amino-terminal da proteína ligadora do elemento SECIS de <i>N. gruberi</i>
NifS	Proteína cisteína desulfurase
NP-40	Octil-fenoxi-polietoxi-etanol
nr	Não redundante
NS-EM	Miscroscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra em contraste negativo
NT	Domínio amino-terminal
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino suplementado com 1% de Tween 20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDB ID	Código de acesso ao PDB
PEG	Poli-etileno-glicol
Pep-Ala	Peptídeo controle
Pep-Cys	Peptídeo contendo Cys catalítica de <i>EcSelD</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PMSF	fluoreto de fenilmetanosulfonil
p(r)	Função de distribuição dos pares
Rev	<i>Reverse</i>
R _g	Raio de giro
rpm	Rotações por minuto
R _s	Raio de <i>Stokes</i>
SAXS	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo
SBP2	Proteína ligadora do elemento SECIS
SE-AUC	Sedimentação em equilíbrio por Ultracentrifugação analítica
Sec	Selenocisteína
SECIS	Sequência de inserção de selenocisteínas
SelA	Selenocisteína sintase
SelB	Fator de alongação específico para incorporação de Sec
SelD	Selenofosfato sintetase
SeMet	Selenometionina
SepCysS	Cys-tRNA ^{Cys} sintase
SepSecS	Selenociteil-tRNA sintase
SerRS	Seril-tRNA sintetase
Ser-tRNA ^{[Ser]Sec}	tRNA intermediário carregado com Ser
Sec-tRNA ^{Sec}	Selenociteil-tRNA ^{Sec}

SPS2	Selenofosfato sintetase 2
SV-AUC	Velocidade de sedimentação por ultracentrifugação analítica
U	Unidade
u.a.	Unidades arbitrárias
Unrd	Estruturas não ordenada
v/v	Relação volume/volume
V_{\max}	Velocidade máxima
VT-CD	CD com variação de temperatura
WB	<i>Western blot</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	37
1.1	Selênio e sua importância para saúde humana e dos animais	37
1.2	Selenocisteína (Sec)	40
1.3	Biossíntese de incorporação de selenocisteína	43
1.3.1	A via em <i>Bacteria</i>	43
1.3.2	A via em <i>Archaea</i>	45
1.3.3	A via em <i>Eukarya</i>	48
1.4	Contextualização	50
1.4.1	Selenocisteína liase (CsdB) e Selenofosfato sintetase (SelD) de <i>E. coli</i>	50
1.4.2	Proteína interagente ao elemento SECIS (SBP2) de <i>N. gruberi</i>	51
2	OBJETIVOS	53
2.1	Objetivos gerais	53
2.2	Objetivos específicos	53
2.2.1	Interação entre CsdB.SelD de <i>E. coli</i> – CAPÍTULO 1	53
2.2.2	Interação entre SBP2 com o elemento SECIS de <i>N. gruberi</i> – CAPÍTULO II	54
CAPÍTULO 1	- ESTUDO DA VIA DE INCORPORAÇÃO DE SELENOCISTEÍNA EM BACTÉRIAS	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS – CAPÍTULO 1	59
3.1	Protocolos padrões	59
3.1.1	Transformação em bactérias quimiocompetentes	59
3.1.2	Confirmação da ligação nos vetores de interesse	59
3.1.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	60
3.2	Obtenção das amostras	60
3.2.1	Expressão homóloga das proteínas em estudo	60
3.2.2	Purificação das proteínas <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i>	61
3.2.2.1	Estabelecimento do protocolo de purificação da Selenocisteína liase (<i>EcCsdB</i>)	61
3.2.2.2	Purificação da Selenofosfato sintetase (<i>EcSelD</i>)	62
3.3	Caracterização biofísica das amostras	63
3.3.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico e estado oligomérico através de Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	63
3.3.2	Avaliação do perfil de estruturas secundárias e estabilidade térmica por Dicroísmo circular (CD)	63
3.3.3	Análise da estabilidade conformacional por Espectroscopia de	64

	fluorescência intrínseca (IFS)	
3.3.4	Determinação da cinética enzimática de <i>EcCsdB</i> na conversão Sec-seleneto	65
3.4	Caracterização biofísica da interação entre <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> <i>in vitro</i>	65
3.4.1	Determinação da constante aparente de interação entre <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> através de Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS), monitorando-se o comprimento de onda referente ao PLP covalentemente ligado ao sítio ativo de <i>EcCsdB</i>	65
3.4.2	Determinação das constantes de interação através de Sedimentação em equilíbrio por ultracentrifugação analítica (SE-AUC)	67
3.4.3	Análise da estabilidade térmica das proteínas na formação do complexo através de Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	67
3.4.4	Obtenção dos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo binário através de Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	68
3.4.5	Análise qualitativa da interação por co-eluição	69
3.4.6	Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação Analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)	69
3.5	Caracterização estrutural da formação do complexo binário	70
3.5.1	Análise da formação do complexo por Microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra por contraste negativo (NS-EM)	70
3.5.2	Obtenção do envelope molecular do complexo por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	70
3.5.3	Obtenção do modelo em alta resolução do complexo por Cristalografia de proteínas	71
3.5.3.1	Cristalografia de proteínas	71
3.5.3.1.1	Síntese do peptídeo correspondente ao fragmento N-terminal de <i>EcSelD</i>	71
3.5.3.1.2	Marcação dos peptídeos com isotiocianato de fluoresceína	72
3.5.3.1.3	Análise da interação <i>EcCsdB</i> .Pep-Cys por anisotropia de fluorescência (FAS)	72
3.5.3.1.4	Análise da interação <i>EcCsdB</i> .Pep-Cys por dicroísmo circular	73
3.5.3.1.5	Ensaio de co-cristalização e <i>soaking</i>	73
3.6	Demonstração da interação em sistema <i>in vivo</i>	74
3.6.1	Clonagem dos genes <i>csdB</i> e <i>selD</i> de <i>E. coli</i> nos vetores isca (pGBKCg) e presa (pGADCg)	74
3.6.2	Transformação em levedura dos clones de expressão	77
3.6.3	Teste de ativação do gene repórter <i>HIS3</i> para detecção da interação	77
4	RESULTADOS e DISCUSSÕES – CAPÍTULO 1	79
4.1	Obtenção das amostras	79
4.1.1	Purificação da Selenocisteína liase (<i>EcCsdB</i>)	79
4.1.2	Purificação da Selenofosfato sintetase (<i>EcSelD</i>)	81
4.2	Caracterização biofísica das amostras	84
4.2.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico e estado oligomérico através de	84

	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	
4.2.2	Avaliação do perfil de estruturas secundárias e estabilidade térmica por Dicroísmo circular (CD)	85
4.2.3	Análise da estabilidade conformacional por Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS)	87
4.2.4	Determinação da cinética enzimática de <i>EcCsdB</i> na conversão Sec-seleneto	90
4.3	Caracterização biofísica da interação entre <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> <i>in vitro</i>	92
4.3.1	Determinação da constante aparente de interação entre <i>EcCsdB</i> e <i>EcSelD</i> através de Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS), monitorando-se o comprimento de onda referente ao PLP covalentemente ligado ao sítio ativo de <i>EcCsdB</i>	92
4.3.2	Determinação das constantes de interação através de Sedimentação em equilíbrio por ultracentrifugação analítica (SE-AUC)	94
4.3.3	Análise da estabilidade térmica das proteínas na formação do complexo através de Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	98
4.3.4	Obtenção dos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo binário através de Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	99
4.3.5	Análise qualitativa da formação do complexo por co-eluição	101
4.3.6	Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)	102
4.4	Caracterização estrutural da formação do complexo binário	104
4.4.1	Análise da formação do complexo por Microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra por contraste negativo (NS-EM)	104
4.4.2	Obtenção do envelope molecular do complexo por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	106
4.4.3	Obtenção do modelo em alta resolução do complexo por Cristalografia de proteínas	111
4.4.3.1	Análise da interação do peptídeo sintetizado com <i>EcCsdB</i> por anisotropia de fluorescência (FAS)	111
4.4.3.2	Verificação de mudanças estruturais, por CD, na <i>EcCsdB</i> quando esta se liga ao peptídeo contendo o resíduo catalítico de <i>EcSelD</i>	113
4.4.3.3	Ensaios de co-cristalização e soaking utilizando o Pep-Cys	115
4.4.3.4	Obtenção da estrutura em alta resolução da Selenocisteína liase de <i>E. coli</i>	118
4.4.3.5	Obtenção do modelo de interação por cristalografia de proteínas	120
4.5	Demonstração da interação em sistema <i>in vivo</i>	123
4.5.1	Clonagem dos genes <i>csdB</i> e <i>selD</i> de <i>E. coli</i> nos vetores isca (pGBKCg) e presa (pGADCg)	123
4.5.2	Teste de ativação do gene repórter <i>HIS3</i> para detecção da interação	124
5	CONCLUSÕES – CAPÍTULO 1	127
6	PERSPECTIVAS – CAPÍTULO 1	129
	CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA VIA DE INCORPORAÇÃO DE SELENOCISTEÍNA EM EUKARIOTOS	130
7	MATERIAIS E MÉTODOS – CAPÍTULO 2	133

7.1	Obtenção dos genes de interesse	133
7.1.1	Determinação do truncamento da proteína NgSBP2	133
7.1.2	Clonagem dos genes <i>sbp2CT</i> e <i>sbp2NT</i> em vetores de expressão	133
7.2	Obtenção dos truncamentos da proteína NgSBP2 e elemento SECIS	134
7.2.1	Teste de expressão inicial	134
7.2.1.1	Confirmação da expressão proteica por <i>Western blot</i> (WB)	135
7.2.2	Expressão dos domínios CT e NT de NgSBP2	136
7.2.3	Estabelecimento de protocolo para a purificação dos truncamentos da NgSBP2	136
7.2.4	Obtenção do elemento SECIS	136
7.2.4.1	Amplificação do gene <i>secis</i> de <i>Naegleria gruberi</i>	136
7.2.4.2	Transcrição <i>in vitro</i> do elemento SECIS	137
7.2.4.3	Enovelamento do elemento SECIS monitorado por Dicroísmo circular (CD)	138
7.2.4.4	Marcação do elemento SECIS com fluoróforo específico	139
7.3	Caracterização biofísica das amostras	139
7.3.1	Avaliação do perfil de estruturas secundárias por Dicroísmo circular (CD)	139
7.3.2	Análise do conteúdo de estruturas secundárias por Espectroscopia de infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FTIR)	140
7.3.3	Determinação do diâmetro hidrodinâmico em solução através de Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	141
7.3.4	Análise da estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na desnaturação proteica por Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	141
7.4	Caracterização estrutural de NgSBP2	141
7.4.1	Análise em solução por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	141
7.4.2	Análise da polidispersividade por Microscopia eletrônica de transmissão em contraste negativo (NS-EM)	142
7.5	Caracterização biofísica da interação e reconhecimento do elemento SECIS <i>in vitro</i>	142
7.5.1	Determinação da interação por Espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)	142
7.5.2	Determinação das constantes de dissociação por Ultracentrifugação analítica em equilíbrio de sedimentação (SE-AUC)	143
7.5.3	Análise da variação do perfil de estruturas secundárias na interação NgSBP2-CT com o elemento SECIS por FTIR	144
7.5.4	Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)	144
7.6	Caracterização dos complexos macromoleculares de NgSBP2 <i>in vivo</i>	145
7.6.1	Produção de antissoros para identificação dos truncamentos de NgSBP2	145
7.6.1.1	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	145
7.6.2	Cultivo celular de <i>Naegleria gruberi</i>	147

7.6.2.1	Determinação da curva de crescimento celular	147
7.6.2.2	Ensaio de cultivo celular sob estresse oxidativo	147
7.6.3	Obtenção de extratos proteicos de <i>N. gruberi</i>	148
7.6.4	Identificação dos truncamentos em extrato de proteína total de <i>N. gruberi</i> através de <i>Western blot</i> (WB)	148
7.6.5	Identificação dos parceiros de interação dos truncamentos de NgSBP2 através de ensaios de <i>pulldown</i> seguido de espectrometria de massas	149
8	RESULTADOS E DISCUSSÕES – CAPÍTULO 2	151
8.1	Obtenção dos genes de interesse	151
8.1.1	Determinação do truncamento da proteína NgSBP2	151
8.1.2	Clonagem dos genes <i>sbp2CT</i> e <i>sbp2NT</i> de <i>N. gruberi</i> em vetores de expressão	153
8.2	Obtenção dos truncamentos da proteína NgSBP2 e elemento SECIS	154
8.2.1	Teste de expressão inicial	154
8.2.1.1	Confirmação da expressão proteica por <i>Western blot</i> (WB)	155
8.2.2	Estabelecimento de protocolo para a purificação dos truncamentos da NgSBP2	156
8.2.3	Obtenção do elemento SECIS	157
8.2.3.1	Enovelamento do elemento SECIS monitorado por Dicroísmo circular (CD)	158
8.3	Caracterização biofísica dos truncamentos de NgSBP2	159
8.3.1	Análise do perfil de estruturas secundárias e estabilidade térmica por Dicroísmo circular (CD)	159
8.3.2	Análise do conteúdo de estruturas secundárias através de Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	161
8.3.3	Determinação do diâmetro hidrodinâmico em solução através de Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	163
8.3.4	Análise da estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na desnaturação proteica por Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	164
8.4	Caracterização estrutural de NgSBP2	165
8.4.1	Análise em solução por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	165
8.4.2	Análise inicial por Microscopia eletrônica por contraste negativo (NS-EM)	169
8.5	Caracterização biofísica da interação e reconhecimento do elemento SECIS <i>in vitro</i>	170
8.5.1	Determinação das constantes aparente de interação por Espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)	170
8.5.2	Medidas de Ultracentrifugação analítica em equilíbrio de sedimentação (SE-AUC) para obtenção das constantes de interação	172
8.5.3	Análise da variação do perfil de estruturas secundárias na interação NgSBP2-CT com o elemento SECIS por FTIR	176
8.5.4	Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)	177
8.6	Caracterização dos complexos macromoleculares de NgSBP2 <i>in vivo</i>	179

8.6.1	Ensaio imunoenzimático (ELISA) para verificar a reatividade do antissoro produzido	179
8.6.2	Cultivo celular de <i>Naegleria gruberi</i>	180
8.6.2.1	Curva de crescimento celular	180
8.6.2.2	Análise da cultura sob estresse oxidativo	181
8.6.3	Identificação dos truncamentos em extrato de proteína total de <i>N. gruberi</i> através de <i>Western blot</i> (WB)	184
8.6.4	Identificação dos parceiros de interação dos truncamentos de NgSBP2 através de ensaios de <i>pulldown</i> seguido de espectrometria de massas	185
9	CONCLUSÕES – CAPÍTULO 2	189
10	PERSPECTIVAS – CAPÍTULO 2	191
	REFERÊNCIAS	193
	ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS	205
	ANEXO B – MANUSCRITOS EM PREPARAÇÃO	207
	ANEXO C – GRÁFICOS DE ABS_{280nm} X R (cm) OBTIDOS NAS ANÁLISES DE SEDIMENTAÇÃO EM EQUILÍBRIO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA	209
	ANEXO D - CURVAS DE ESPALHAMENTO EXPERIMENTAIS (SAXS)	215
	ANEXO E - SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS EM ESTUDO	217

1 INTRODUÇÃO

1.1 Selênio e sua importância para saúde humana e dos animais

O elemento químico selênio (Se) foi descoberto em 1817 por Jacob Berzelius no *Karolinska Institute*, em Estocolmo – Suécia.¹ Apesar de sua alta toxicidade, Se é um micronutriente essencial para diversas formas de vida, incluindo bactérias e mamíferos.²⁻⁴ O selênio pode ser encontrado na natureza nas formas inorgânicas como selênio elementar (Se^0), selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}).⁵ Além das formas orgânicas monoselenofosfato e dos aminoácidos selenocisteína (Sec) e selenometionina (SeMet).

As plantas são conhecidas como reguladoras da concentração de selênio no solo, e o absorvem principalmente na forma de selenato. Por não possuírem uma via de consumo deste elemento químico, elas acumulam diferentes concentrações de selênio em suas folhas, o que afeta diretamente as doses de selênio ingeridas por animais.⁵⁻⁶

Em animais, a deficiência de selênio provoca distrofia muscular nutricional ou doença do músculo branco.⁷ Essa doença provoca um acúmulo de cálcio nas fibras musculares, dando a coloração esbranquiçada. Os músculos mais afetados são músculos esqueléticos das pernas e costas e também músculo cardíaco. Em geral, os animais jovens apresentam dificuldade em andar e podem ficar incapacitados de levantar. No caso de afetar o músculo cardíaco, o animal tem o risco de um ataque cardíaco.⁷⁻⁸ O excesso de selênio também está relacionado à saúde dos animais, fato esse observado em porcos, em que o excesso de selênio provocou a paralisia do animal.⁹ (Figura 1)

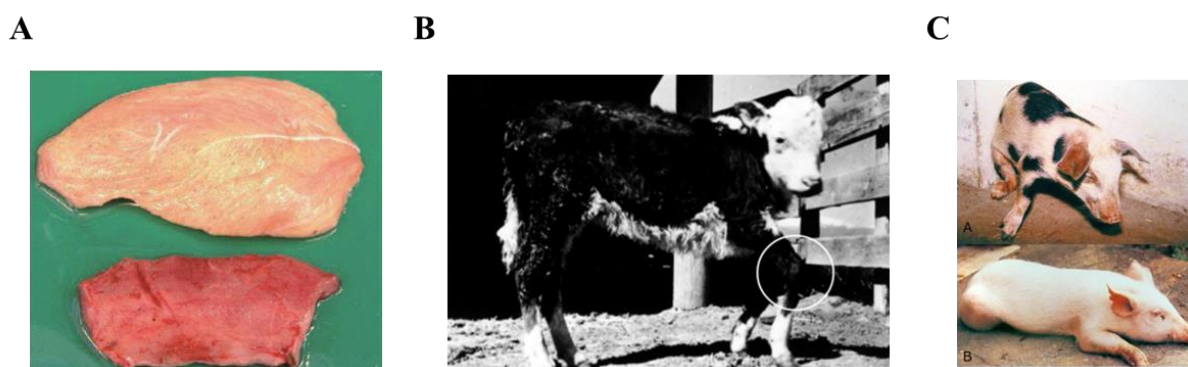


Figura 1 - Exemplos dos efeitos da deficiência e excesso de selênio em animais. (A) Músculo afetado pela doença do músculo branco (superior) em comparação ao músculo sadio (inferior). (B) Um bezerro demonstrando fraqueza para se manter em pé devido à deficiência de selênio no organismo. (C) Suínos apresentando paralisia (superior) e tetraplegia (inferior) após serem expostos a altas doses de selênio.

Fonte: Adaptada de HANSEN;⁷ ELGHANDOUR;⁸ PEIXOTO.⁹

Assim como o selênio é fundamental para a saúde dos animais, ele também é essencial à saúde humana.¹⁰ Tanto o seu excesso como o a deficiência estão relacionadas a algumas doenças e sintomas. Dentre as condições apresentadas em humanos, a selenose é conhecida pela condição na qual o organismo é exposto a altas doses de selênio, seja por ingestão de alimentos ou por vias aéreas. Os principais sintomas do excesso de selênio no organismo são a perda de cabelo e enfraquecimento das unhas (Figura 2A e 2B). Os outros sintomas como tremores, tonturas são encontrados, porém com menor frequência.¹¹

Já a deficiência do selênio provoca alterações bioquímicas que podem predispor ao desenvolvimento de algumas doenças, como as doenças de *Keshan* e *Kashin-Beck*¹² (Figura 2C e 2D). A doença de *Keshan* é endêmica do noroeste e sudoeste da China sendo caracterizada como uma cardiomiopatia severa, que provoca um aumento do coração, arritmias graves, sendo muitas vezes fatal. Descobriu-se que o solo continha baixas concentrações de selênio nas regiões endêmicas em comparação com a média de outras localidades. Após essa descoberta, o governo chinês começou a implementar uma dieta com maiores níveis de selênio na população e, em 1990, a doença foi praticamente erradicada.¹³ A doença de *Kashin-Beck* é caracterizada por uma deformação nos ossos, cartilagens e juntas, permitindo um aumento das juntas e diminuição dos movimentos. É uma doença comumente reportada no Tibet e outras áreas da China.¹⁴

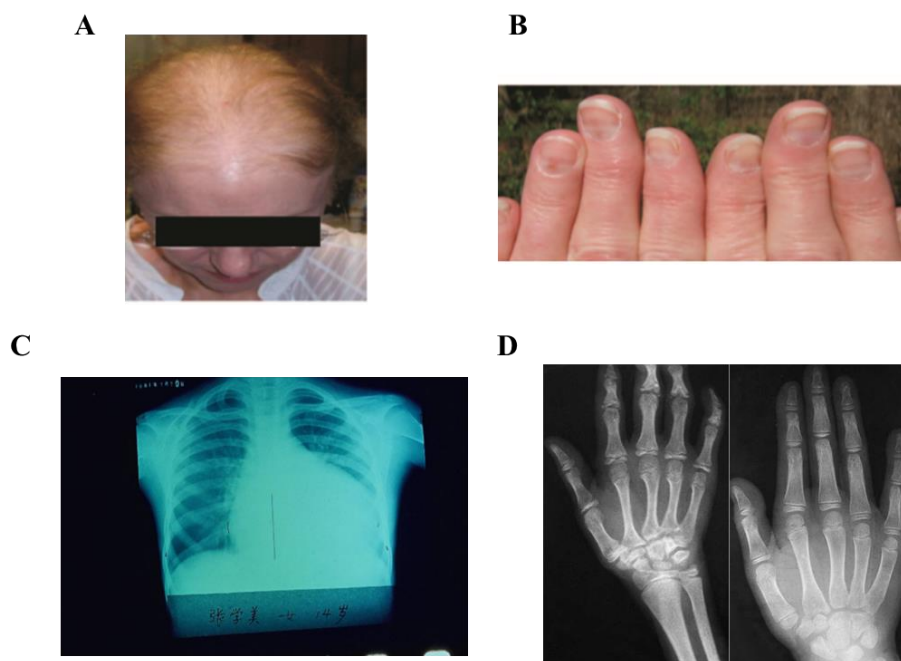


Figura 2 – Efeitos da deficiência e excesso de selênio em humanos. A selenose, ou excesso de selênio no organismo pode provocar (A) Alopecia e (B) Enfraquecimento das unhas, mostrado através das linhas de descoloração (leuconiquia). A deficiência do selênio no organismo está relacionada a algumas doenças como (C) Doença de *Keshan*, uma cardiomiopatia severa. Observa-se a radiografia de um coração aumentado devido à patologia. (D) Doença de *Kashin-Beck*, um distúrbio osteoarticular que provoca deformidade nas articulações e redução de mobilidade articular. À esquerda, uma radiografia de um menino de 14 anos saudável, à direita, uma radiografia de um menino de 14 anos com a doença de *Kashin-Beck*. Observa-se o estreitamento dos espaços articulares.

Fonte: Adaptada de PALMER;¹¹ CHEN;¹³ MORENO-REYES.¹⁴

Assim como a doença de *Keshan*, a doença de *Kashin-Beck* também não é causada simplesmente pela baixa concentração de selênio no organismo. Elas dependem de diversos fatores para se desenvolver e a baixa concentração de selênio predispõe o organismo a ter essas doenças.

Além disso, a deficiência do selênio pode estar relacionada com problemas na tireóide, em mulheres.¹⁵ Diversas selenoproteínas fazem parte da glândula da tireóide, auxiliando a regular a síntese do hormônio da tireóide e protegendo a glândula contra danos oxidativos.¹⁶

Evidencia-se, assim, a grande importância dos níveis de selênio para a saúde de humanos e animais. Portanto, o estudo dos mecanismos de incorporação de selênio, além de trazer conhecimentos para a ciência básica, pode trazer também conhecimentos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em algumas patologias.

Um dos principais mecanismos de incorporação do selênio é através da biossíntese do aminoácido denominado selenocisteína (Sec, U), que por sua vez, é co-traducionalmente incorporado ao polipeptídeo nascente em códons UGA na fase aberta de leitura. Este códon é canonicamente reconhecido como códon de parada ou *stop* códon. Esse mecanismo específico

de biossíntese e incorporação ocorre em três domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.¹⁷⁻¹⁸

1.2 Selenocisteína (Sec)

A presença de selenocisteína, conhecido como o 21º aminoácido, apresenta algumas diferenças em relação aos mecanismos de biossíntese e incorporação nos três domínios da vida. Esse aminoácido é análogo aos aminoácidos cisteína e serina, apresentando diferença do grupo selenol em relação a grupo tiol da cisteína e hidroxil da serina¹⁷ (Figura 3). No entanto, a estrutura eletrônica do átomo de selênio, dependendo do pH, gera o ânion selenolato, este corresponde à base conjugada de Sec, mais estável do que o correspondente tiolato do resíduo de Cys, implicando na diferença significativa dos valores de pKa de Sec (5,2) inferior à Cys (8,5), e portanto, com maior potencial de redução.¹⁹⁻²¹



Figura 3 - Esquema comparativo dos aminoácidos cisteína, serina e selenocisteína, evidenciada pela presença do elemento selênio (rosa) na posição do enxofre (verde) característico da cisteína e oxigênio (azul) característico da serina.

Fonte: Adaptada de YOKOYAMA.²²

A via específica de biossíntese e incorporação do aminoácido selenocisteína também pode ser compreendida como um mecanismo de controle das elevadas concentrações de selênio no ambiente celular.²³ Em *Escherichia coli*, evidências sugerem que este processo envolve o direcionamento do selênio comoceptor de elétrons na cadeia respiratória em situações anaeróbicas,²³ além do metabolismo de selenoproteínas²⁴ como as principais medidas de detoxificação celular, nas quais, em algumas bactérias, reduzirá selenito e selenato à selênio elementar que, por sua vez, será processado à forma biológica abundante, monoselenofosfato, para sua incorporação em proteínas (selenoproteínas), na forma dos aminoácidos selenocisteína ou selenometionina.²⁴ Tanto a selenocisteína como o selenito são reduzidos a seleneto, que é altamente tóxico por ser muito reativo e este, por sua vez, é convertido em monoselenofosfato.²⁵⁻²⁶

Diferente de outros aminoácidos, a selenocisteína é codificada por um mecanismo denominado decodificação traducional²⁷⁻²⁸ e utiliza um códon UGA que, usualmente, é interpretado como códon de parada. A interpretação para inserção de Sec utilizando o códon UGA é possível pela presença de um elemento com estrutura secundária no RNA mensageiro (mRNA) em forma de “grampo” denominado Sequência de Inserção de Selenocisteínas (do inglês, *SElenoCysteine Insertion Sequence*), ou SECIS.^{10,29-30} Assim, para incorporação de Sec, são necessárias as presenças: do elemento SECIS no mRNA, um tRNA específico (tRNA^{Sec}, que possui um anticódon UCA, além de um braço variável maior em comparação aos outros tRNAs²⁹) (Figura 4), fatores de alongação específico (eEFSec ou SelB), além das proteínas auxiliares denominadas de proteínas ligadoras do elemento SECIS (SBP2).

O Sec-tRNA^{Sec} de *E. coli* possui 95 resíduos, em vez de 75 (convencional para tRNAs), com um braço acceptor formando 8 pares de base e 5 pares de base no braço TΨC. A estrutura canônica de tRNAs entre braço acceptor e TΨC é do tipo “7+5” e a estrutura do Sec-tRNA^{Sec} de bactérias é da forma “8+5”. Já em arqueias e eucariotos o Sec-tRNA^{Sec} possui a estrutura do tipo “9+4”.¹⁸⁻²¹ A estrutura terciária do Sec-tRNA^{Sec} é importante para as interações ao longo da via, garantindo maior especificidade, sendo os braços acceptor (Figura 4 – vermelho) e variável (Figura 4 – amarelo) reconhecidos pela Seril-tRNA sintetase; acceptor e D-loop (Figura 4 – azul) reconhecidos pelas sintases; acceptor, variável e TΨC (Figura 4 – laranja) reconhecidos pelo fator de alongação específico. O braço anti-códon (Figura 4 – verde) contém a trinca UCA complementar ao códon de parada UGA.¹⁸⁻²¹

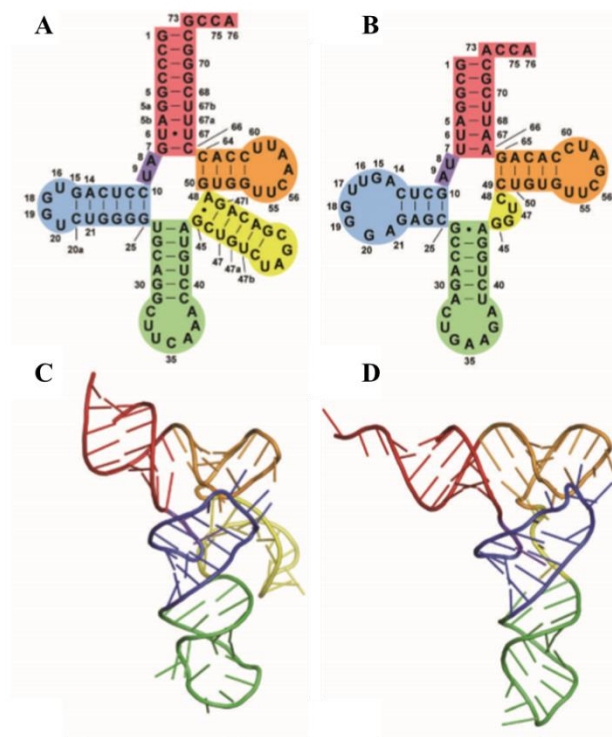


Figura 4 – Representação em trevo do (A) tRNA^{Sec} de humanos em comparação ao (B) tRNA^{Phe} de *S. cerevisiae*. Representação em cadeia dos tRNAs encontrados acima. As cores representam os braços do tRNA (verde: anticódon, vermelho: braço aceptor, azul: D-loop, amarelo: braço variável e laranja: TΨC). Observa-se a presença do anticódon UCA no tRNA^{Sec} bem como a extensão do braço variável, em comparação com o tRNA^{Phe} de leveduras e outros tRNAs.

Fonte: Adaptada de YOKOYAMA.³¹

Por sua vez, o elemento SECIS se difere nos 3 domínios da vida, sendo que em *Bacteria* é encontrado imediatamente após (*downstream*) o códon UGA e apresenta estrutura distinta quando comparada aos demais SECIS de *Eukarya* e *Archaea*²¹ (Figura 5). O SECIS de bactérias não possui o motivo não *Watson-Crick*, sendo as bases na alça apical importantes para o reconhecimento do fator de alongação específico, SelB. Em eucariotos e arqueias, o SECIS está presente em uma região não codificante, denominada 3'-UTR (*untranslated region*), o que distancia o códon UGA deste elemento, e permite um dobramento do elemento, em hipótese, sobre o códon UGA³⁰ para correta interpretação e inserção do resíduo de selenocisteína.

Neste domínio da vida, o elemento SECIS possui duas formas, sendo a forma 1 do correspondente à forma canônica eucariotos, a única existente até então. Entretanto, estudos mostraram que há uma variação na forma deste elemento (forma 2), a qual possui uma hélice adicional e uma região de alça apical menor, sendo que as outras regiões são conservadas. Ainda não há estudos que indiquem qual das formas é a mais frequentemente encontrada. O elemento SECIS de eucariotos também possui o motivo não *Watson-Crick*, o qual é importante para interação com a proteína interagente ao elemento SECIS, SBP2.²⁵⁻³⁰ Além

das diferenças no elemento SECIS, as maquinarias moleculares complexas responsáveis pela biossíntese e incorporação de Sec também são distintas entre os domínios da vida.

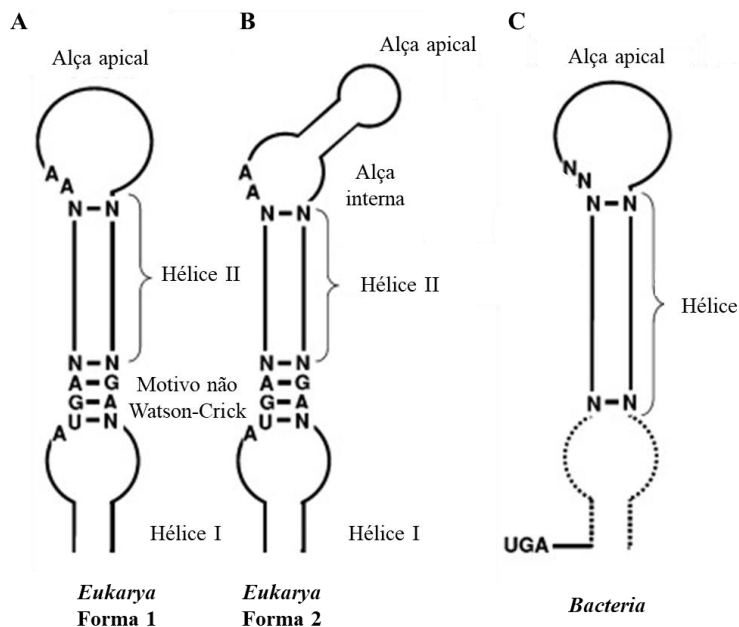


Figura 5 - Representação dos elementos SECIS de eucariotos e bactérias indicando as diferenças estruturais. (A) Eucariotos – Forma 1, conhecida como a forma canônica. (B) Eucariotos – Forma 2. (C) Bactérias. Em *Eukarya* e *Archaea* o elemento SECIS se localiza na região 3'-UTR e em bactérias está localizado logo após o códon Sec-UGA.

Fonte: Adaptada de HATFIELD.³²

1.3 Biossíntese de incorporação de selenocisteína

1.3.1 A via em *Bactéria*

As várias etapas da via específica de biossíntese de Sec se iniciam com a adenilação do aminoácido serina à L-serina (Ser), com o consumo de ATP (adenosina trifosfato), pela enzima Seril-tRNA sintetase (SerRS). SerRS reconhece os braços acceptor e variável do tRNA^{[Ser]Sec} e é responsável pela transferência do resíduo de L-serina ativado para o tRNA^{[Ser]Sec}, resultando em seril-tRNA^{[Ser]Sec} e liberação de AMP.³³ O tRNA^{Sec} carregado com um resíduo de L-serina (Ser-tRNA^{[Ser]Sec}) é entregue à Selenocisteína sintase (Sela),³⁴ responsável pela conversão do Ser-tRNA^{[Ser]Sec} à selenocisteil-tRNA^{Sec}, ou Sec-tRNA^{Sec}. A proteína Sela é uma enzima piridoxal 5'-fosfato (PLP) dependente e utilizando monoselenofosfato como doador de selênio.¹⁸

O monoselenofosfato é por sua vez sintetizado pela ação das enzimas Selenocisteína liase (CsdB), responsável pela redução de selênio a seleneto (Se²⁻).²⁵⁻²⁶ Este, por sua vez, é

substrato da enzima Selenofosfato sintetase (SelD), que produz monoselenofosfato ($\text{H}_2\text{PO}_3\text{SeH}$) através do consumo de ATP.³⁵ A entrega do monoselenofosfato à SelA foi caracterizada por Silva e seus colaboradores,³⁶ em que descreveram a interação entre SelD e SelA no funcionamento da via de incorporação de selenocisteína.

A conversão Ser-Sec é realizada em duas etapas pela SelA. A primeira etapa consiste na formação da base de *Schiff* entre o grupo α -amino de Ser com o grupo formil de uma molécula de PLP ligada covalentemente no resíduo de lisina catalítica de SelA. Esta reação resulta na desidratação de Ser e na formação do estado intermediário denominado aminoacrilil-tRNA^{Sec} covalentemente ligado a SelA.^{31,37} A segunda etapa consiste na transferência de selênio por substituição nucleofílica, formando o selenocisteil-tRNA^{Sec}.³⁷⁻³⁸ O Sec-tRNA^{Sec} é então carregado ao ribossomo pelo fator de alongação (SelB) para a incorporação de Sec nas cadeias polipeptídicas nascentes, produzindo selenoproteínas, enzimas especializadas e envolvidas em processos catabólicos e são utilizadas em várias reações do tipo redox.^{29,33,39} Vale ressaltar que SelB possui reconhecimento específico ao Sec-tRNA^{Sec} e ao elemento SECIS. Esse fator de alongação específico possui um domínio C-terminal único, em comparação a outros fatores de alongação, para reconhecimento do elemento SECIS somente no domínio *Bacteria*³⁹ (Figura 6).

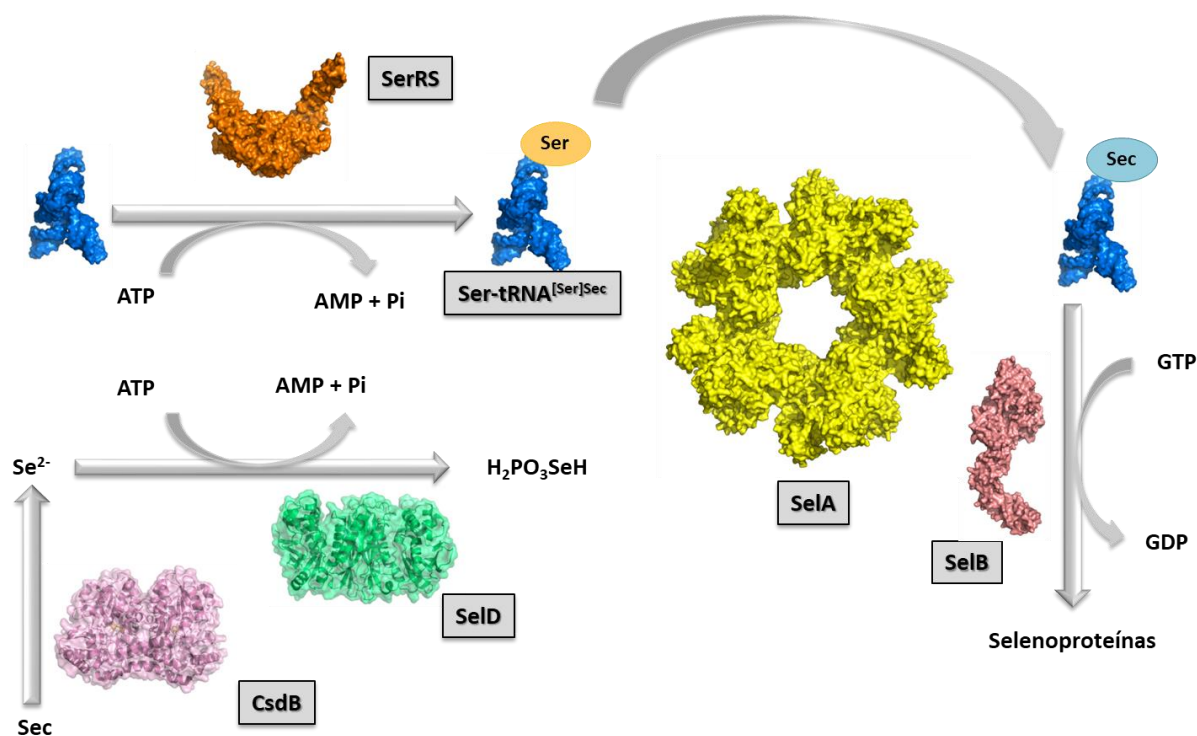


Figura 6 - Esquema descrevendo as etapas envolvidas na síntese de Sec em *Bacteria*, tendo como modelo o organismo *E. coli*. As diferentes proteínas envolvidas no processo de síntese estão representadas pelas suas estruturas. Em azul, tRNA^{Sec} (PDB ID 3A3A); em laranja, Seril-tRNA sintetase (SerRS – PDB ID 2DQ3); em amarelo, Selenocisteína sintase (SelA – PDB ID 3W1H); em rosa, fator de elongação específico (SelB – PDB ID 4ZU9); em verde, Selenofosfato sintetase (SelD – PDB ID 3U00), em violeta, Selenocisteína liase (CsdB – PDB ID 1JF9).

Fonte: Elaborada pela autora.

1.3.2 A via em *Archaea*

A via de *Archaea* apresenta diferenças em relação à via de *Bacteria*. A primeira etapa da via, assim como em bactérias é a aminoacilação do tRNA^{[Ser]Sec}, pela ação da SerRS. A principal diferença está na conversão Ser-Sec, pois esse processo ocorre em duas etapas tRNA-dependente.⁴⁰

Após ser carregado com Ser, o Ser-tRNA^{[Ser]Sec} passa por uma fosforilação catalisada pela O-fosfoseril-tRNA^{Sec} quinase (PSTK), formando o intermediário Sep-tRNA^{[Sep]Sec}. Em seguida, ocorre a conversão de Sep-tRNA^{[Sep]Sec} a Sec-tRNA^{Sec} pela enzima Selenocisteil-tRNA sintetase (SepSecS), também uma enzima PLP dependente. A SepSecS tem como homólogas as enzimas SepCysS (dímero) que é responsável pela biossíntese de Cys-tRNA^{Cys} em arqueias metanogênicas e a enzima SelA (decâmero) de bactérias (Figura 7). Diferentemente de suas homólogas, SepSecS apresenta uma estrutura tetramérica em solução a qual é mantida pelas interações entre os homodímeros e é regulada alostericamente.⁴⁰⁻⁴¹

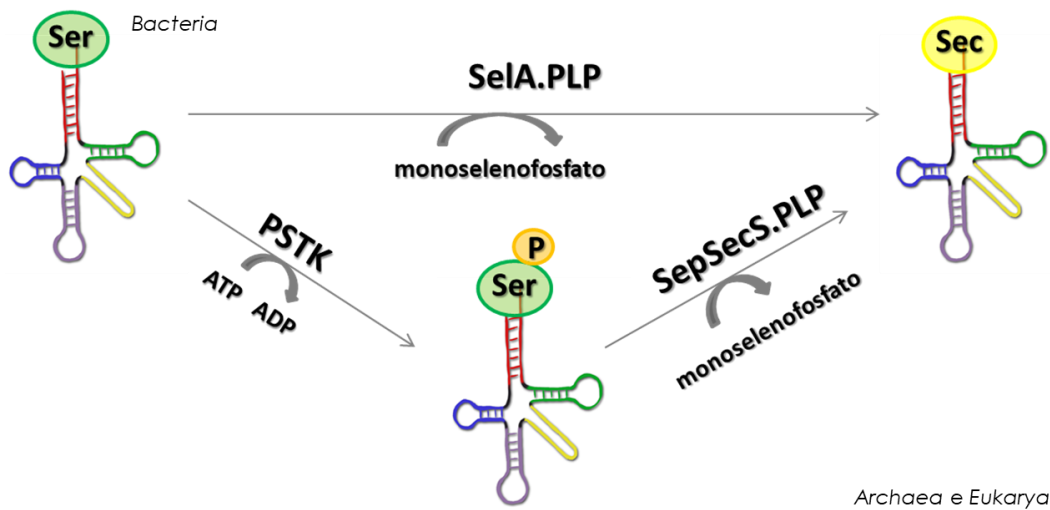


Figura 7 - Diferenças entre a conversão Ser-Sec-tRNA^{Sec} catalisada pelas enzimas SelA (*Bacteria*), PSTK e SepSecS (*Archaea* e *Eukarya*). Na via em *Bacteria* a enzima SelA (Selenocisteína sintase) faz a conversão Ser-tRNA^{[Ser]Sec} à Sec-tRNA^{Sec}. Já em *Archaea* e *Eukarya*, essa conversão é feita pelas enzimas PSTK (O-fosfoseril-tRNA^{Sec} quinase) que faz a fosforilação do Ser-Sec-tRNA^{Sec} formando o Sep-tRNA^{[Sep]Sec}, localizado ao centro da figura. A conversão de Sep-tRNA^{[Sep]Sec} à Sec-tRNA^{Sec} é feita pela SepSecS (Selenociteil-tRNA sintase), também uma enzima PLP dependente.

Fonte: Elaborada pela autora. Arte do tRNA pela aluna de doutorado Ana Laura Lima (IFSC/USP).

O selênio utilizado para biossíntese do aminoácido selenocisteína é provido na forma de monoselenofosfato pela ação das enzimas Selenofosfato sintetase (SPS2), assim como ocorre em bactérias em que esta etapa é catalisada pela enzima homóloga SelD. O substrato das SPS2 é o seleneto, assim como na via de biossíntese em *Bacteria*.⁴²

Uma vez realizada a conversão Ser-Sec, o Sec-tRNA^{Sec} é carregado para a maquinaria de síntese de proteínas através do fator de alongação específico para incorporação de selenocisteínas denominado EFSec, homólogo à SelB bacteriana. O fator de alongação em arqueias, cuja estrutura foi recentemente obtida por cristalografia de proteínas⁴³ (Figura 8A), possui domínios de interação com o Sec-tRNA^{Sec} na região C-terminal, além do domínio GTPase na região N-terminal, canônico em fatores de alongação. Entretanto, não possui um domínio responsável pela interação ao elemento SECIS (Figura 8B), sendo necessário o auxílio de proteínas específicas de reconhecimento e ligação ao SECIS, denominadas de *SECIS Binding Proteins* (SBP2s).⁴⁴

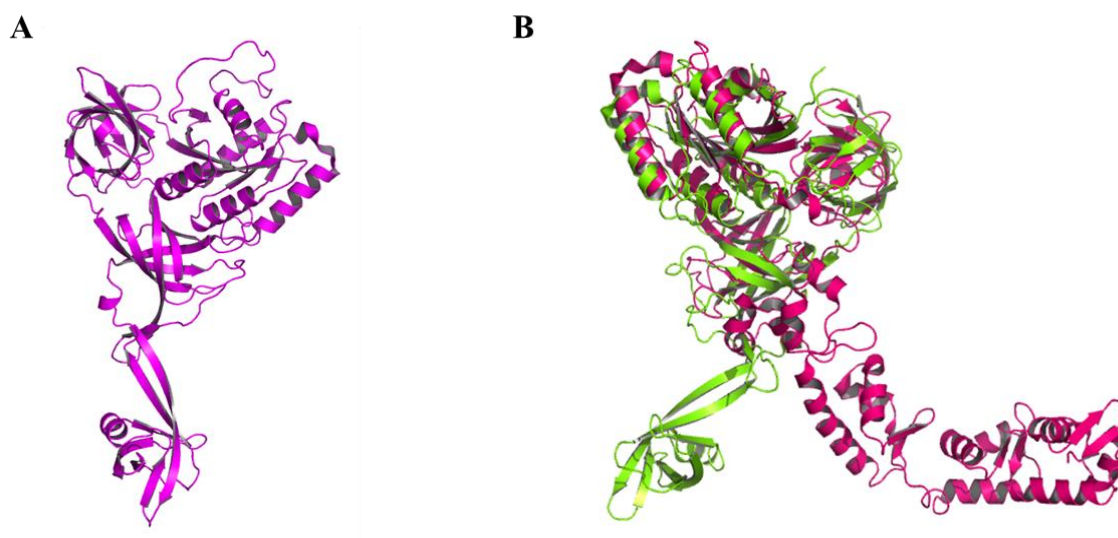


Figura 8 – Fator de alongação específico para a incorporação de selenocisteína nas cadeias polipeptídicas nascentes. (A) Estrutura cristalográfica do fator de alongação específico, EFSec de de *M. maripaludis*, uma arqueia metanogênica (PDB ID 4ACA). (B) Sobreposição do EFSec de arqueias (em verde) com o fator de alongação específico de bactérias, SelB (PDB ID 4ZU9, em magenta). Observa-se que a região carboxi-terminal de bactéria é mais extensa devido à região de reconhecimento e interação ao elemento SECIS. Assim, evidencia-se a ausência desta região em arqueias, sendo necessária uma proteína específica para ligação ao elemento SECIS (SBP2).

Fonte: Elaborada pela autora.

As SBP2s possuem a função de conectar o elemento SECIS ao EFSec de um modo direto ou indireto^{21,45} ou seja, reconhecem a estrutura do elemento SECIS, que em arqueias está localizada porção 3'-UTR (região não codificante) do mRNA e direcionam a interação do complexo eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} para o sítio A do ribossomo, onde é realizada a entrega no tRNA aminoacilado e incorporação de Sec na cadeia polipeptídica nascente, formando assim selenoproteínas que estão envolvidas em processos catabólicos e são utilizadas em várias reações do tipo redox.²⁹ Um esquema da via em *Archaea* está ilustrado abaixo (Figura 9). As SBP2s são previstas para arqueias, mas não foram identificadas e caracterizadas até o momento. Assim como em *Bacteria*, as selenoproteínas em *Archaea* estão envolvidas em processos catabólicos e são utilizadas em várias reações do tipo redox.

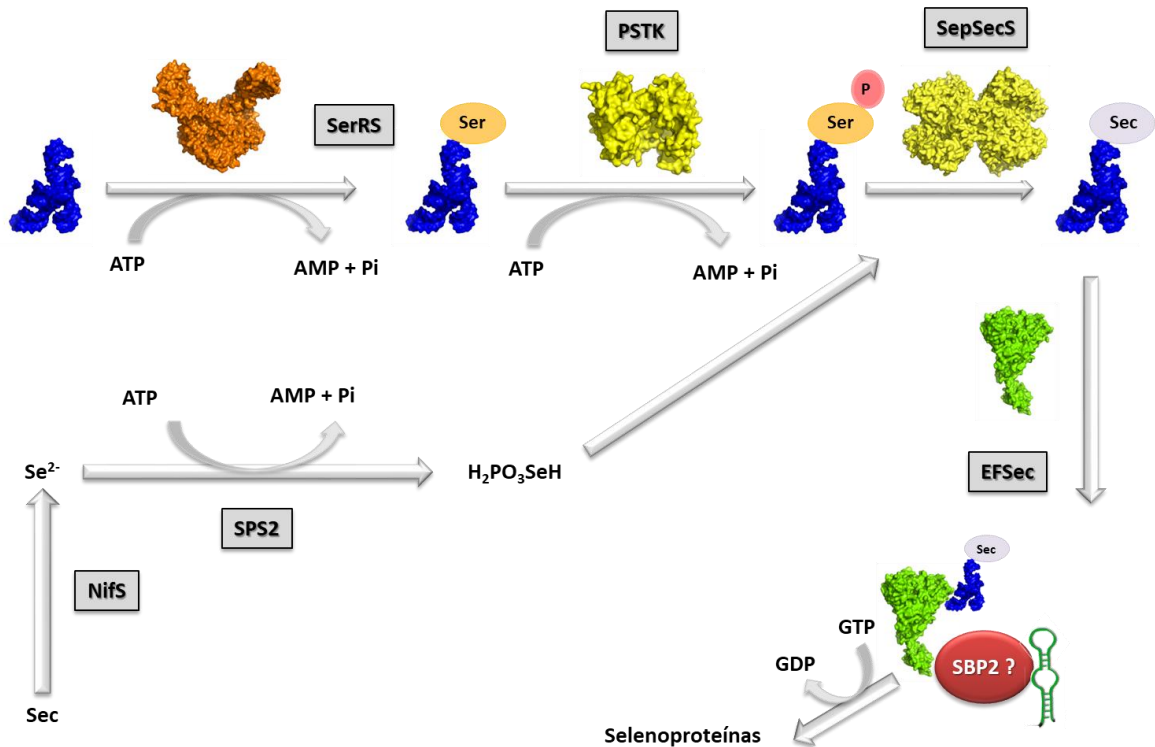


Figura 9 – Via de incorporação de selenocisteína (Sec) em *Archaea*. As diferentes proteínas envolvidas no processo de síntese estão representadas pelas suas estruturas. Em azul, tRNA^{Sec} (PDB ID 3A3A); em laranja, Seril-tRNA sintetase (SerRS – PDB ID 2ZR2); em amarelo, O-fosforil-tRNA^{Sec} quinase (PSTK - PDB ID 3AM1); em amarelo claro, Selenocisteil-tRNA sintetase (SepSecS – PDB ID 2Z67); em verde, fator de alongamento específico (EFSec – PDB ID 4ACA). Em processo análogo à *Bacterias*, a via de biossíntese de selenocisteína possui duas vias de entrada: uma contendo o tRNA e outra, o selênio, através da aminoacilação do tRNA específico e através da reciclagem de Sec-seleneto pela NifS, respectivamente. Em *Archaea* é previsto ter SBP2, mas até o momento não foi identificada.

Fonte: Elaborada pela autora.

1.3.3 A via em *Eukarya*

Neste domínio da vida, assim como para arqueias, as etapas de síntese e incorporação de Sec não contém a enzima Sela,⁴⁶ e as reações catalisadas por ela também ocorrem através da PSTK e SepSecS.⁴⁰⁻⁴¹ As demais etapas catalíticas são análogas ao observado para *Bacteria* e *Archaea*, com a diferenciação para o reconhecimento ao elemento SECIS, ocorrendo por meio de proteínas conhecidas como *SECIS binding proteins* (SBP2s)^{21,45} (Figura 10).

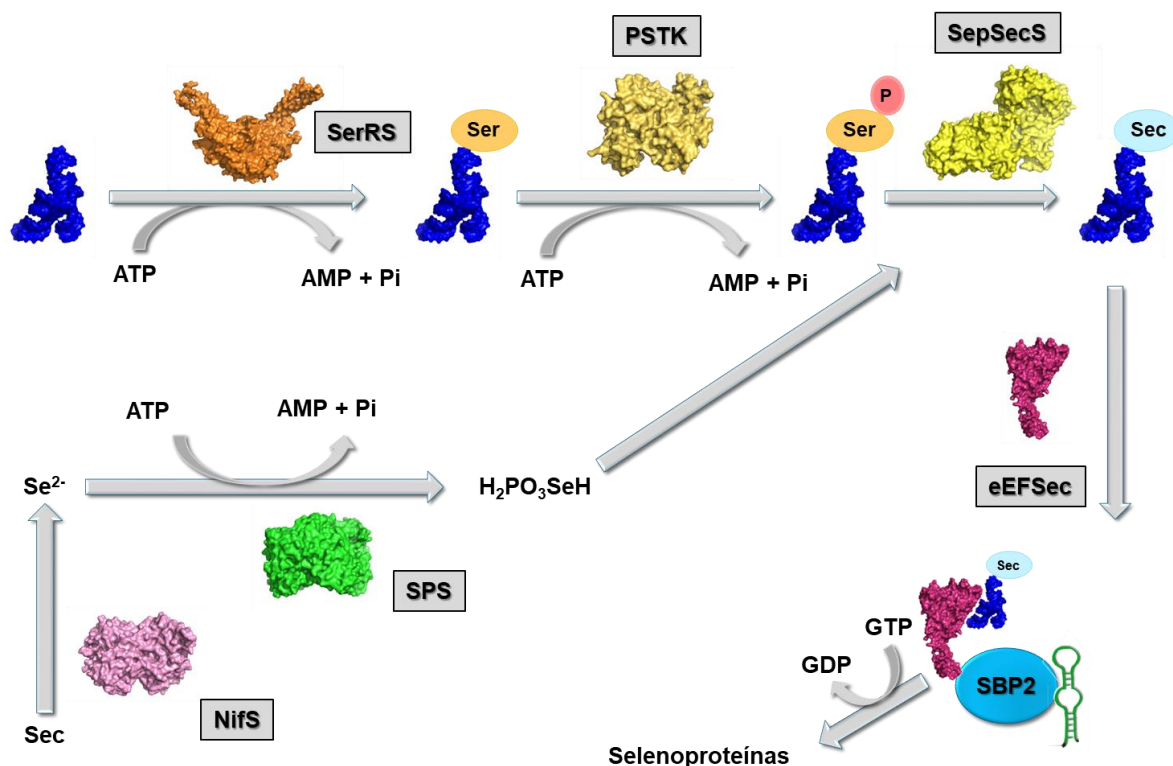


Figura 10 - Etapas envolvidas na síntese de selenocisteína (Sec) no domínio *Eukarya*. As diferentes proteínas envolvidas no processo de síntese estão representadas pelas suas estruturas. Em azul, tRNA^{Sec} (PDB ID 3A3A); em laranja, Seril-tRNA-sintetase (SerRs – PDB ID 4RQE); em amarelo, O-fosfoseril-tRNA^{Sec} quinase (PSTK - PDB ID 3BC8); em amarelo claro, Selenocisteil-tRNA sintase (SepSecS – PDB ID 3HL2); em pink, fator de alongação específico (eEFSec – PDB ID 5IZK); em verde, Selenofosfato sintetase 2 (SPS2 – PDB ID 5L16); em rosa, proteína do tipo NifS (NifS, PDB ID 4Q75). A via de biossíntese de selenocisteína é análoga ao descrito para a via em *Archaea*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como mencionado, a ligação SBP2.SEICIS direciona a interação do complexo quaternário eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} para o sítio A do ribossomo, para que ocorra a correta entrega do tRNA^{Sec} aminoacilado e incorporação de selenocisteína na cadeia polipeptídica nascente. Dessa forma, a ligação SBP2.SEICIS é fundamental para haver a ativação da maquinaria de incorporação de Sec.^{21,47} A função do elemento SEICIS ocorre através do recrutamento da SBP2 formando o complexo SBP2.SEICIS. Entretanto, ainda permanece a questão de como SBP2 e o elemento SEICIS reconhecem o eEFSec para a incorporação do selênio nas cadeias polipeptídicas.^{29,48} Vale destacar que em *Eukarya* as selenoproteínas participam de processos anabólicos e antioxidantes, o que sugere uma origem independente dos selenoproteomas procarióticos e eucarióticos.²⁹

1.4 Contextualização

1.4.1 Selenocisteína liase (CsdB) e Selenofosfato sintetase (SelD) de *E. coli*

Estudos preliminares mostram que a *EcCsdB* é compreendida como a porta de entrada de compostos de selênio na via de incorporação.⁴⁹ Essa enzima, em *E. coli*, possui 406 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 44,4 kDa, apresentando-se na conformação dimérica em solução e teve sua primeira estrutura determinada por cristalografia de proteínas em 2002.⁵⁰ É uma enzima PLP-dependente e possui um enovelamento semelhante a outras proteínas da via, como a SelA^{36,51} bacteriana e a SepSecS⁵² de arqueias e eucariotos (Figura 11A).

A enzima SelD de *E. coli* teve sua estrutura resolvida por cristalografia em 2012 (Figura 11C),³⁸ no entanto, o domínio N-terminal catalítico e altamente flexível foi truncado. Recentemente, um trabalho desenvolvido em nosso laboratório descreveu a interação entre as enzimas SelD e SelA de *E. coli*,³⁶ sendo um passo fundamental para a entrega do selenofosfato ao complexo binário SelA.tRNA^{Sec} e mostrando a importância da formação de complexos macromoleculares para a especificidade da via de biossíntese de Sec.

Apesar das estruturas resolvidas, pouco se sabe como é realizada a entrega de compostos de selênio para a inicialização da via de biossíntese de selenocisteínas. Como compostos de selênio são extremamente citotóxicos, acredita-se que devam existir interações entre os elementos proteicos de modo a evitar a contaminação do ambiente celular com esses compostos de elevada toxicidade. Um modelo de interação para a entrega de selênio à via de biossíntese de selenocisteínas foi proposto por Itoh e colaboradores em 2009⁵³ utilizando a estrutura de SelD de *Aquifex aeolicus*, com um modelo estrutural por homologia de CsdB para esse organismo (Figura 11B). No entanto, não existem evidências experimentais em bactérias que comprovassem essa interação até o momento.

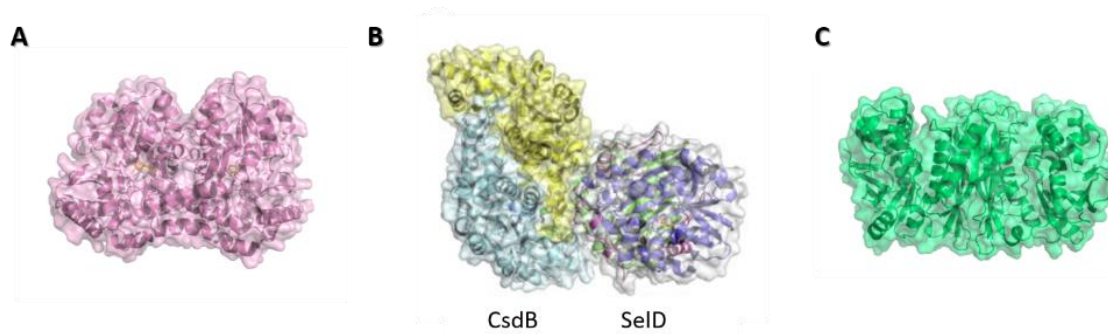


Figura 11 - Estado da arte para as enzimas *EcCsdB* e *EcSelD*. (A) Estrutura cristalográfica da enzima *CsdB*⁵⁰ de *E. coli*. (B) Modelo proposto por Itoh e colaboradores em 2009 sobre a interação entre *EcSelD* e *EcCsdB*.⁵³ (C) Modelo estrutural da enzima *SelD* de *E. coli* obtido por cristalografia de proteínas em 2012.³⁸

Fonte: Adaptada de LIMA;⁵⁰ NOINAJ;³⁸ ITOH.⁵³

1.4.2 Proteína interagente ao elemento SECIS (SBP2) de *N. gruberi*

Em relação à proteína ligadora ao elemento SECIS (SBP2), foi identificada, em mamíferos, uma SBP2 que possui 846 aminoácidos contendo um domínio predito para interação com RNA.⁵⁴ Além disso, estudos indicam que SBP2 pode já estar ligada diretamente ao elemento SECIS durante a formação do complexo de iniciação 48S e também que a proteína é responsável pela interação ao SECIS, permanecendo associada até a interação com o ribossomo.⁵⁵ Complementarmente, estudos mostraram a relação da SBP2 com a proteção contra danos celulares oxidativos.⁵⁶

As SBP2s eucarióticas possuem dois domínios preditos principais, domínio amino-terminal (NT) e o domínio carboxi-terminal (CT). O primeiro é reconhecido, até o momento, por não ter relação direta com a via de incorporação de selenocisteína. Entretanto, o domínio CT participa ativamente da incorporação de Sec, uma vez que se liga tanto ao mRNA quanto à unidade ribossomal 60S.^{44,54,57} O domínio carboxi-terminal da SBP2 possui duas regiões principais: a primeira, responsável pelo reconhecimento ao RNA, o qual compreende os domínios L7A e domínio de ligação ao RNA, além de uma região rica em lisinas (Lys), a qual é importante para ligação à unidade ribossomal 60S bem como com o elemento SECIS⁴⁰; a segunda região compreende o domínio de ligação ao ribossomo.^{44,58-59}

Estudos de interação SBP2.SECIS revelam uma constante de dissociação (K_D) na ordem de 250 nM, indicando uma especificidade da interação.²⁸ Um modelo proposto para interação do complexo eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} é suportado por Kinzy e colaboradores.⁶⁰ Nesse modelo, o elemento SECIS é reconhecido pela SBP2 quando há a pausa na tradução e este complexo SBP2.SECIS permite a entrada do eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} no sítio A do

ribossomo (Figura 12). Apesar desta hipótese, o mecanismo no qual esse processo ocorre ainda é desconhecido.

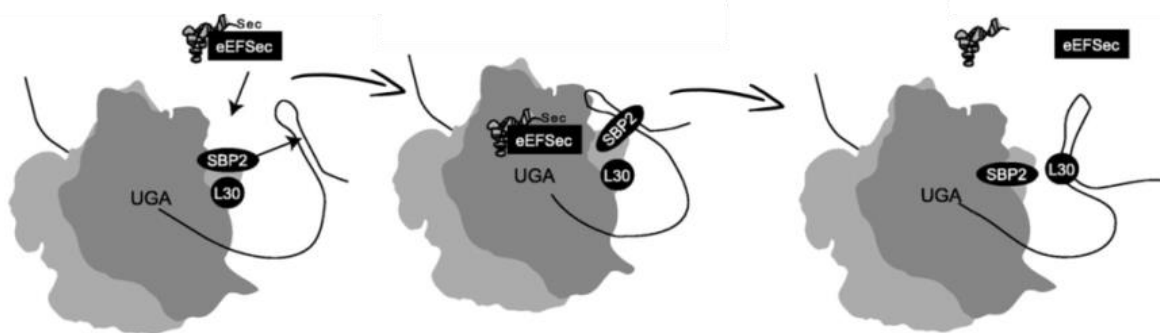


Figura 12 - Modelo de interação proposto no qual a SBP2 reconhece o elemento SECIS quando há uma pausa na tradução. Este complexo por sua vez, recruta o complexo eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} para o sítio A do ribossomo, permitindo a incorporação de selenocisteína na cadeia polipeptídica.
Fonte: Adaptada de KINZY.⁶⁰

Recentemente, o grupo do Prof. Otavio Thiemann identificou a sequência codificante para SBP2 putativa⁶¹ em *N. gruberi*, um eucarioto heterotrófico de vida livre pertencente à classe *Heterolobosea*.⁶² Teoricamente, essa proteína possui 483 resíduos, 54,8 kDa e 47% de identidade com a SBP2 de *Ectocarpus siliculosus*, uma alga marinha utilizada como modelo de estudos de filamentos de algas marrons.⁶³ Até o momento, não foram obtidas informações estruturais de SBP2s.

Desta forma, este estudo teve como objetivo principal caracterizar as interações macromoleculares da via de biossíntese de Sec em *E. coli* bem como em *N. gruberi*. Especificamente, as interações envolvendo as proteínas CsdB e SelD bacteriana e SBP2 com o elemento SECIS de *N. gruberi*. As análises de interação proteína-proteína e proteína-RNA foram realizadas através de diferentes técnicas biofísicas, como espectroscopia de fluorescência intrínseca, anisotropia de fluorescência e ultracentrifugação analítica. Medidas calorimétricas também foram realizadas como calorimetria de titulação isotérmica e calorimetria diferencial de varredura. Técnicas estruturais foram realizadas como espalhamento de raios-X a baixo ângulo, microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra em contraste negativo além de cristalografia de proteínas. Estudos *in vivo* também foram realizados, sendo o experimento de duplo híbrido dirigido para o sistema bacteriano e ensaios de estresse oxidativo para o sistema eucariótico. Os resultados obtidos apresentam um grande avanço para a área do conhecimento das interações macromoleculares pertencentes à via biossíntese e incorporação de selenocisteína. Além disso, contribuem para o melhor entendimento de interações do tipo proteína-proteína e proteína-RNA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este estudo tem como principais objetivos caracterizar a interação entre CsdB e SelD de *E. coli*, proposta em 2009, porém nunca demonstrada experimentalmente. Além disso, analisando a via em eucariotos, este estudo tem como objetivo verificar a existência de SBP2 em *N. gruberi* através da caracterização da interação entre essa proteína e o elemento SECIS. Para compreender as interações macromoleculares do tipo proteína-proteína e proteína-RNA foram realizadas abordagens biofísicas e estruturais para a compreensão dos parâmetros bioquímicos envolvendo a formação desses complexos macromoleculares.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Interação entre CsdB.SelD de *E. coli* – CAPÍTULO 1

Para caracterizar as interações é necessário obter as amostras com elevado grau de pureza. Dessa forma, um dos objetivos foi estabelecer um protocolo de purificação para *EcCsdB*, uma vez que a purificação de *EcSelD* já foi previamente estabelecida.

O segundo objetivo desta parte do projeto é caracterizar cada uma das amostras separadamente:

- Determinar o diâmetro hidrodinâmico através de espalhamento de luz dinâmico;
- Avaliar a estabilidade térmica bem como o perfil de estruturas secundárias através de dicroísmo circular;
- Verificar a estabilidade conformacional através de espectroscopia de fluorescência intrínseca monitorando-se os triptofanos presentes em cada uma das amostras;
- Verificar a atividade enzimática de *EcCsdB* na conversão Sec-seleneto através de medidas espectroscópicas.

O principal objetivo desta parte do projeto é caracterizar as interações entre Selenocisteína liase e Selenofosfato sintetase através de técnicas biofísicas estruturais. Dessa forma, para caracterização *in vitro* tem-se:

- Determinar a constante de interação através de espectroscopia de fluorescência intrínseca e de ultracentrifugação analítica por sedimentação em equilíbrio;
- Verificar a estabilidade térmica das amostras quando estão em complexo através de calorimetria diferencial de varredura;
- Obter os parâmetros termodinâmicos e hidrodinâmicos da interação através de calorimetria de titulação isotérmica e ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação;
- Obter o envelope molecular através de espalhamento de raios-X a baixo ângulo;
- Obter a estrutura cristalográfica do complexo através de co-cristalização e *soaking* utilizando um peptídeo contendo o resíduo catalítico de *EcSelD*;
- Demonstrar a interação *in vivo* através de duplo híbrido dirigido em sistema *S. cerevisiae*.

2.2.2 Interação entre SBP2 com o elemento SECIS de *N. gruberi* – CAPÍTULO 2

Ao início deste estudo, trabalhou-se com a construção inteira SBP2 de *N. gruberi*. Contudo, não foi possível obter a amostra em concentração suficiente para realizar os experimentos de interação. Com isso, decidiu-se em trabalhar somente com os truncamentos referentes as domínios amino e carboxi terminais. Assim como no caso anterior, é necessário obter as amostras com elevado grau de pureza para realizar os experimentos de caracterização da interação da SBP2 com o elemento SECIS. Dessa forma, como se partiu do DNA genômico de *N. gruberi*, primeiramente tem-se como objetivos:

- Realizar as etapas de biologia molecular para obtenção dos genes de interesse em vetores de expressão;
- Expressar e estabelecer um protocolo de purificação para as amostras;
- Obter o DNA molde do elemento SECIS através de PCR utilizando-se oligonucleotídeos sobrepostos e, em seguida, transcrever *in vitro* este elemento de RNA e acompanhar o enovelamento através de dicroísmo circular e realizar a marcação do elemento SECIS com fluoresceína utilizando-se um kit comercial.

Uma vez as amostras preparadas, parte-se para os ensaios de caracterização biofísica de cada um dos truncamentos, sendo:

- Verificar o perfil de estruturas secundárias através de dicroísmo circular e espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier*;
- Analisar os parâmetros termodinâmicos de desnaturação térmica através de calorimetria diferencial de varredura;
- Caracterizar as amostras estruturalmente, verificando a flexibilidade do sistema através de espalhamento de raios-X a baixo ângulo e determinar o tamanho destas através de microscopia eletrônica com preparo de amostra em contraste negativo;

Após a caracterização biofísica e estrutural de cada um dos domínios, tem-se que verificar a funcionalidade de SBP2. Essa verificação foi feita através de experimentos de interação *in vitro* e *in vivo*:

- Determinar as constantes de interação através de anisotropia de fluorescência utilizando-se o elemento SECIS que foi previamente marcado com um fluoróforo específico bem como SE-AUC;
- Verificar a formação dos complexos e obter os parâmetros hidrodinâmicos através de ultracentrifugação analítica por velocidade de sedimentação;
- Identificar os parceiros de interação de cada uma das amostras através de *pull-down* seguido por análise de espectrometria de massas;
- Verificar os efeitos do estresse oxidativo em uma cultura de *N. gruberi* não suplementada, bem como em uma cultura suplementada com seleneto ou selenocisteína;
- Verificar a presença dos truncamentos e analisar se estes sofrem algum tipo de processamento em *N. gruberi*.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA VIA DE INCORPORAÇÃO DE SELENOCISTEÍNA EM BACTÉRIAS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolos padrões

Alguns protocolos foram repetidos ao longo deste trabalho. Para facilitar, eles foram separados nesta seção.

3.1.1 Transformação em bactérias quimiocompetentes

Cerca de 50 μL de suspensão bacteriana previamente tratada com CaCl_2 foi descongelada em gelo por 20 minutos. À reação de ligação (reação a ser transformada em bactéria quimiocompetente) foi adicionado o tampão de transformação (0,1 M KCl , 0,03 M CaCl_2 , 0,05 M MgCl_2 , 15% (v/v) PEG 10%) e essa mistura foi adicionada à suspensão bacteriana. Após 30 min em gelo, a mistura passou por um choque térmico, sendo deixada por 2 minutos à 42 °C. Após essa etapa, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 50 minutos à 37 °C sob agitação de 80 rpm. Após esse período, a cultura foi centrifugada por 5 minutos, 3.000 rpm, e o sedimento foi ressuspensionado em 100 μL de LB líquido. As células foram plaqueadas em meio seletivo (Agar LB suplementado com antibiótico, sendo as concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$ para ampicilina (*csdB*-pUC118) e 30 $\mu\text{g/mL}$ para canamicina (*selD*-pET28a(+)) e incubadas à 37 °C por 16 horas.

3.1.2 Confirmação da ligação nos vetores de interesse

Para verificar se a ligação dos insertos no vetor de interesse ocorreram de forma eficiente, as colônias resultantes da transformação foram inoculadas em 10 mL de meio LB seletivo, por 16 h, sob agitação de 80 rpm e 37 °C. Após esta etapa, procedeu-se ao isolamento do DNA plasmidial através do kit comercial *Fast-n-easy plasmid miniprep kit* (CellCo). Com o DNA extraído, realizou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR) e o perfil eletroforético das amostras foi visualizado em gel de agarose 1% corado com *Sybr Safe*[®] (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e iluminação em 470 nm utilizando um transluminador *Gel Doc XR⁺ System* (Bio-Rad). Além disso, a confirmação da inserção do gene no vetor de entrada também é feita por sequenciamento. Dessa forma, é possível verificar e selecionar os clones nos quais continham os insertos de interesse.

3.1.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Na reação da PCR foram adicionados 10 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP (mistura de 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo), 10 pmol de oligonucleotídeo *forward*, 10 pmol de oligonucleotídeo *reverse*, solução tampão (Tris-HCl 10 mM pH 9,0 e KCl 50 mM) diluída 10 vezes, 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase e água milli-Q autoclavada para completar o volume de 50 µL.

As condições da reação em cadeia da polimerase realizada em termociclador *T100 Thermal Cycler* (Bio-rad), estão destacadas na Figura 13.

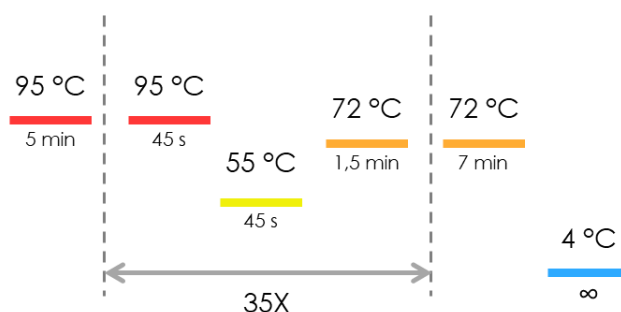


Figura 13 – Condições da reação em cadeia da polimerase. Desnaturação inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos consecutivos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento durante 45 segundos a 55 °C e extensão a 72 °C durante 1,5 minutos e, por fim, um ciclo final de extensão a 72 °C durante 7 minutos e estoque a 4 °C após o término da reação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os genes foram amplificados e o tamanho dos fragmentos resultantes da amplificação foi monitorado em gel de agarose 1% como previamente mencionado. Os genes com tamanho esperado foram selecionados, extraídos do gel e purificados, para continuidade dos experimentos.

3.2 Obtenção das amostras

3.2.1 Expressão homóloga das proteínas em estudo

O plasmídeo contendo o gene para a produção de *EcCsdB* (*csdB*-pUC118 modificado⁶⁴ para um sítio de reconhecimento ao ribossomo) foi gentilmente doado pelo Professor Dr. Hisaak Mihara, do *Institute for Chemical Research, Kyoto University*.⁶⁴ Já o plasmídeo contendo o gene para a expressão de *EcSelD* (*selD*-pET28a(+)) foi cedido pelo Dr. Ivan Rosa e Silva (*Medical Research Council, Inglaterra*).³⁶

Para a expressão da proteína Selenocisteína liase (*EcCsdB*), utilizou-se pré-inóculos de 10 mL de meio LB, contendo ampicilina (25 µg/mL) para a cepa *E. coli* BL21 (λDE3) quimiocompetente previamente transformada com o vetor *csdB*-pUC118. Após 16 h de crescimento, aumentou-se a escala dos inóculos, na proporção 1:100 em volume, mantendo-se sob agitação de 150 rpm à 37 °C até atingir a densidade óptica D.O._{600nm} 1,0, em que foi adicionado 1 mM de IPTG (β-D-1-isopropiltiogalactosídeo) mantendo sob mesma agitação e temperatura por 4 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min à 4 °C. Os *pellets* celulares foram suspensos em tampão fosfato de potássio - KPB (10 mM fosfato de potássio, pH 7,4).

A expressão da proteína Selenofosfato sintetase (*EcSelD*) consistiu primeiramente, do crescimento da cepa de expressão *E. coli* BL-21 (λDE3) quimiocompetente contendo o vetor *selD*-pET28a(+) em pré-inóculos de 10 mL de meio LB seletivo, contendo o antibiótico canamicina (30 µg/mL). Os pré-inóculos foram crescidos por 16 horas sob agitação de 80 rpm à 37 °C. Posteriormente, aumentou-se a escala dos inóculos, na proporção 1:100 em volume, sob agitação de 150 rpm à 37 °C por 3:30 h, até atingir a densidade óptica D.O._{600nm} 0,6, em que foi adicionado 1 mM de IPTG mantendo sob mesma temperatura e agitação por 6 horas. Após esse tempo de indução, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min à 4 °C. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol e 1 mM de DTT (DL-Ditiotreitol)).

3.2.2 Purificação das proteínas *EcCsdB* e *EcSelD*

3.2.2.1 Estabelecimento do protocolo de purificação da Selenocisteína liase (*EcCsdB*)

As células foram lisadas através de pulsos de ultrassom (pulsos de 20 s com intervalo de 45 s sendo realizados 7 ciclos) e, em seguida, foram submetidas a uma centrifugação 13.000 rpm, 45 min, 4 °C para clarificação dos extratos proteicos. Primeiramente, realizou-se uma etapa de precipitação seletiva com sais iônicos através da adição de 50% (m/v) de sulfato de amônio acrescido de 0,2% de piridoxal-5'-fosfato (PLP). Após a precipitação com sulfato de amônio, as amostras foram centrifugadas por 30 min, 13.000 rpm, à 4 °C. Os precipitados proteicos foram ressuspensos em 2 mL de KPB, suplementado com 100 µM de PLP. Em seguida, procedeu-se com uma cromatografia de dessalinização utilizando coluna *Desalting* (Hi-Trap Amersham) para remover o excesso de sal presente na amostra. Foram então

realizadas injeções de 1 mL no sistema de cromatografia líquida - Äkta (GE), monitorando-se o cromatograma em 280 nm e a condutividade durante a cromatografia.

Posteriormente, realizou-se uma cromatografia de troca iônica em coluna *DEAE Sepharose* (GE). A coluna foi previamente equilibrada com KPB e a proteína foi deslocada por meio de gradiente salino em KPB suplementado com 1 M NaCl, sendo eluída em aproximadamente 350 mM NaCl. A última etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna *Superdex 200 10/300* utilizando KPB suplementado com 150 mM NaCl (KPB-150 NaCl).

3.2.2.2 Purificação da Selenofosfato sintetase (*EcSelD*)

A lise celular também foi realizada através de pulsos de ultrassom (pulsos de 30 s com intervalos de 59 s *off*, sendo realizados 8 ciclos). As amostras foram submetidas à centrifugação 13.000 rpm, por 45 min à 4 °C, obtendo-se assim, os extratos proteicos brutos. A primeira etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de afinidade, em coluna de Ni²⁺-NTA (Hi-Trap, Amersham). Após a coluna ser carregada com extrato celular bruto e lavada com o tampão A (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol), aumentou-se linearmente a concentração de imidazol, utilizando tampão B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol). Após a primeira etapa de purificação, a amostra foi submetida à diálise, em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM DTT, por 16 h à 4 °C. Posteriormente, procedeu-se a clivagem da His-TAG através da adição de trombina (Sigma-Aldrich) (1 u/100 µg), 14 h à 18 °C. A clivagem foi interrompida pela adição de 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil). A última etapa de purificação foi cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 10/300* (GE), utilizando o tampão de diálise.

As amostras de cada etapa de purificação foram coletadas e submetidas a eletroforese em gel 15% para conferência do grau de pureza e rendimento.

3.3 Caracterização biofísica das amostras

3.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico e estado oligomérico através de Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para obtenção do diâmetro hidrodinâmico (D_H) das amostras, bem como análise do estado oligomérico, foram realizadas medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

Para as proteínas *EcSelD* e *EcCsdB* as medidas foram realizadas em concentrações constantes de 1 mg/mL no tampão de diálise e em KPB + 150 mM NaCl, respectivamente. Foram registrados 13 *scans* em triplicata durante 8 minutos mantendo a temperatura fixa em 25 °C. O tempo de incubação de 120 segundos no equipamento em cubeta de quartzo (caminho óptico 1,5 mm para volume de 2 μ L) foi realizado antes do início das medidas para garantir o equilíbrio térmico.

3.3.2. Avaliação do perfil de estruturas secundárias e estabilidade térmica por Dicroísmo circular (CD)

Para verificar o correto enovelamento e perfil de estruturas secundárias das proteínas purificadas, medidas de dicroísmo circular (CD) foram realizadas para cada uma das amostras envolvidas nesse projeto. Além disso, para análise da estabilidade térmica bem como obtenção do parâmetro temperatura de *melting* (T_m) foram realizadas medidas de CD em função da variação temperatura.

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas de 1 mm de caminho óptico. A concentração de amostra nesse experimento foi de 0,5 mg/mL para *EcSelD* e 0,2 mg/mL para *EcCsdB*, nos tampões de diálise e KPB + 150 mM de NaCl, respectivamente. Ensaios de desnaturação térmica (VT-CD) também foram realizados a fim de complementar esses dados e analisar as mudanças em estruturas secundárias em função da variação de temperatura.

O perfil de desnaturação térmica foi obtido através do monitoramento do comprimento de onda de 222 nm em função da temperatura. O ajuste dos dados foi feito através da função de *Boltzmann* no programa *Origin*[®] 8.6. Em todas as medidas, os espectros foram registrados em um intervalo de comprimento de onda (196-250 nm para *EcSelD*, 194-250 nm para *EcCsdB*), com uma média de 8 *scans* com resolução de 1 nm e velocidade de 50 nm/s. As contribuições dos tampões foram subtraídas dos seus respectivos espectros.

3.3.3 Análise da estabilidade conformacional por Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS)

A fim de se avaliar a estabilidade conformacional das amostras foram feitas medidas de fluorescência intrínseca (IFS) monitorando-se a fluorescência dos resíduos aromáticos, em especial a contribuição dos resíduos de triptofano (Trp). Mudanças no espectro de emissão do triptofano (Figura 14) usualmente ocorrem em função a transições conformacionais, associações de subunidade, ligação de substrato ou desnaturação.⁶⁵ Dessa forma, medidas de IFS foram feitas para análise de mudanças no espectro de Trp em duas temperaturas, com a finalidade de se observar a estabilidade conformacional dos resíduos de Trp na temperatura de análise da interação (25 °C) em comparação com a temperatura de 10 °C. O deslocamento do máximo de emissão do Trp (Figura 14 - esquerda) evidencia a exposição desses resíduos (Figura 14 – direita), e assim, é possível avaliar a estabilidade conformacional da proteína.⁶⁵

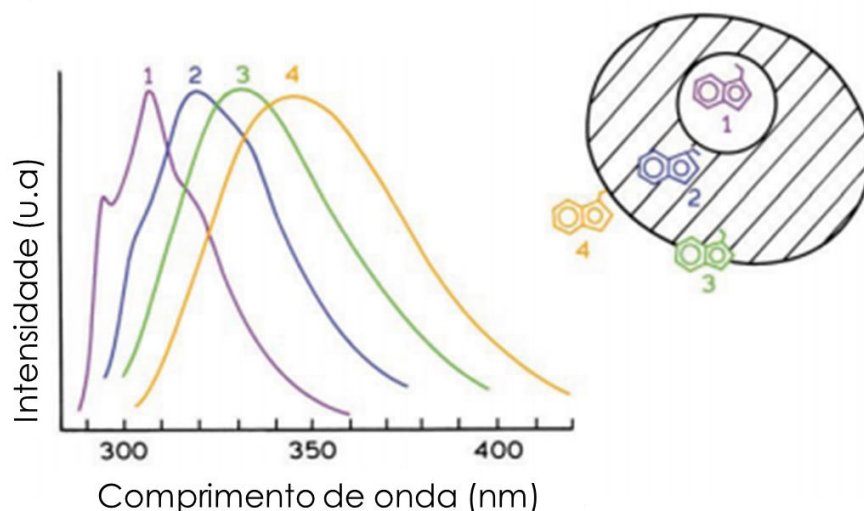


Figura 14 – Mudanças no espectro de emissão do Triptofano (Trp). Quando o máximo se desloca para comprimentos de onda maiores (frequências menores), observa-se, em geral, uma exposição dos resíduos de Trp presente em proteínas. Quando o deslocamento do máximo de emissão é deslocado para comprimentos de onda menores (maiores frequências), é comumente observado uma internalização dos resíduos de Trp.

Fonte: Adaptada de LAKOWICZ.⁶⁵

As medidas de fluorescência foram feitas em um fluorímetro K2 (ISS, fluorescence, Analytical Biomedical Instrumentation – Illinois/USA) a 10 °C e 25 °C em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Amostras da proteína *EcSelD* em tampão de diálise (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM DTT), com concentração de 1 mg/mL foram excitadas em 295 nm e a emissão monitorada de 303-510 nm utilizando filtro de 295 nm na

saída para o detector no módulo *photon-counter*. Para a proteína *EcCsdB*, a concentração de amostra também foi de 1 mg/mL (tampão KPB), com mesmo comprimento de onda de excitação e mesma configuração do aparato experimental. O monitoramento foi realizado entre 304-510 nm.

3.3.4 Determinação da cinética enzimática de *EcCsdB* na conversão Sec-seleneto

Os ligantes utilizados ao longo desse estudo são seleneto e selenocisteína. Sendo que o seleneto é produto de *EcCsdB* e substrato de *EcSelD*. Já a selenocisteína é substrato de *EcCsdB*, a qual faz a redução a seleneto. Dessa forma, ensaios de cinética enzimática foram realizados a fim de se obter os parâmetros cinéticos dessa enzima, bem como analisar a formação do produto.

Os ensaios foram feitos no *SpectraMax Plus* (Molecular Devices), utilizando placas transparentes UV-Star[®] de 96 poços. A concentração de proteína utilizada foi de 20 µM e a concentração de selenocisteína foi variada entre 0 e 3,7 mM em diluição seriada. As medidas foram realizadas em triplicata e o monitoramento de absorbância (Abs) foi feito em 423 nm, comprimento de onda relacionado ao PLP que está ligado covalentemente no sítio ativo de *EcCsdB*. O seleneto possui uma banda de absorbância,⁶⁶ e por isso, escolheu-se trabalhar dentro dessa banda avaliando o comprimento de onda que será utilizado nas próximas análises.

O início das reações foi marcado com a adição de selenocisteína nos poços e, após a adição de Sec, a Abs_{423nm} foi imediatamente monitorada pelo equipamento, por 30 min. O tampão utilizado foi KPB-150 NaCl e o tratamento dos dados para obtenção dos parâmetros cinéticos foi realizado no programa *Origin*[®]8.6.

3.4 Caracterização biofísica da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* *in vitro*

3.4.1 Determinação da constante aparente de interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* através de Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS), monitorando-se o comprimento de onda referente ao PLP covalentemente ligado ao sítio ativo de *EcCsdB*

O estudo da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* se baseou na emissão do cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP) presente na *EcCsdB*. Este cofator é um fluoróforo natural,

localizado no sítio ativo. O grupo funcional mais importante do PLP é o grupo aldeídico que pode formar uma base de *Schiff* covalente com os substratos aminoacídicos. Na ausência de substrato, esse grupo forma uma base de *Schiff* com o grupo ϵ -amino de uma lisina pertencente ao sítio ativo da proteína.⁶⁷

A absorvância máxima observada para o PLP ligado à lisina, formando a aldimina é usualmente em 423 nm.⁶⁷ Dessa forma, para confirmar este comprimento de onda no sistema em estudo, um espectro UV-Vis foi monitorado através do equipamento Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Verificou-se então 3 picos de maior absorvância: 220 nm, correspondente às ligações peptídicas, 280 nm, correspondente aos aminoácidos aromáticos e 423 nm, corresponde ao PLP ligado. Assim, utilizou-se essa sonda, excitando-se em 423 nm e monitorando-se no modo *single point* o máximo de emissão obtido (492 nm).

Para as medidas da interação, 100 nM de *EcCsdB* foi adicionada à cubeta e titulações crescentes da proteína *EcSelD* foram adicionadas na cubeta durante o experimento. Esses experimentos foram realizados em um fluorímetro K2 (*ISS, fluorescence, Analytical Biomedical Instrumentation* – Illinois/USA) a 25 °C em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, e a geometria utilizada foi do tipo “L”.

Todas as medidas foram realizadas no tampão KPB suplementado com 150 mM de NaCl. Entre uma medida e outra, o sistema foi deixado em repouso para atingir o equilíbrio térmico por 10 min. A proteína *EcSelD* foi dialisada para o mesmo tampão do experimento. As interações foram realizadas entre as duas proteínas sem nenhum dos ligantes, denominada interação *EcCsdB.EcSelD*, bem como interações entre elas na presença de seleneto (Se^{2-}), denominada interação *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻*, e selenocisteína (Sec), denominada interação *EcCsdB.EcSelD.Sec*. O seleneto é obtido através do selenito de sódio (Na_2SeO_3 - Sigma-Aldrich), o qual é ativado na presença de 0,5 mM de DTT.⁶⁸ Já a selenocisteína é obtida através da redução de selenocistina (Sigma-Aldrich), com a adição de 1 mM de DTT, 4 h, à 4 °C. A confirmação da redução foi feita através de análise de espectrometria de massas. As concentrações dos ligantes bem como as concentrações de ATP e MgCl_2 utilizadas foi de 1,5 μM em cada experimento.

O tratamento dos dados se deu através do programa *Origin*[®] 8.6 e o ajuste dos dados através da função de *Hill*, para obtenção da constante de dissociação aparente (K_{Dapp}). Todas as medidas foram realizadas em triplicata biológica e os erros estatisticamente analisados.

3.4.2 Determinação das constantes de interação através de Sedimentação em equilíbrio por ultracentrifugação analítica (SE-AUC)

Para corroborar e validar os valores de constante obtidos pela técnica de IFS, experimentos de Ultracentrifugação analítica – sedimentação em equilíbrio (SE-AUC) foram realizados.

A coleta de dados de SE-AUC foi adquirida no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas (LEC – CNPEM) com o auxílio das Dras. Ana Carolina Migliorini Figueira e Fernanda Heleno Batista (LEC – CNPEM). As medidas foram realizadas em equipamento Beckman Coulter Proteome Lab XL-I (Beckman Coulter) em rotor Proteome Lab XL-I (220-240 VAC, 50 Hz).

Para analisar as constantes de dissociação aparente do complexo *EcCsdB.EcSelD*, realizou-se as medidas dos complexos apo, na presença de seleneto, bem como na presença de selenocisteína. Para todas as amostras utilizou-se o mesmo tampão: KPB-150 NaCl. As medidas de sedimentação em equilíbrio foram obtidas em passos de 5.000 rpm; 17.000 rpm; 28.000 rpm e 32.000 rpm, sendo que em todas as etapas foram mantidas em rotação durante 14 horas para assegurar o equilíbrio. As medidas foram realizadas a 25 °C com monitoramento no comprimento de onda de 280 nm. As concentrações de proteínas foram distribuídas nas proporções molares de 0,5:1, 1:1 e 2:1, de *EcSelD* para *EcCsdB*. Assim como na interação por IFS, as concentrações de seleneto e selenocisteína foram mantidas em excesso bem como a concentração de ATP e MgCl₂ (10 µM). Para o tratamento do conjunto de dados do experimento de equilíbrio foi utilizado o software SEDPHAT.⁶⁹

Sabe-se da literatura que as proteínas *EcSelD* e *EcCsdB* se apresentam em forma dimerica em solução.^{38,50} Portanto, as análises de equilíbrio foram realizadas através do modelo $A + B = AB$, em que cada dímero foi interpretado como A ou B obtendo-se os valores de constante de dissociação aparente para cada complexo. Os valores teóricos dos parâmetros de viscosidade e densidade foram calculados pelo programa SEDNTERP.⁷⁰

3.4.3 Análise da estabilidade térmica das proteínas na formação do complexo através de Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas a fim de se analisar a estabilidade térmica bem como a obtenção dos parâmetros termodinâmicos da transição térmica do complexo binário *EcCsdB.EcSelD*. Para isso, analisou-se a temperatura de *melting* (T_m) de cada amostra

separadamente, para então verificar as variações na T_m para cada proteína no complexo formado. A determinação da variação de entalpia (ΔH) foi feita a fim de se quantificar a energia envolvida no processo de dissociação e desenovelamento do complexo. Essas medidas foram realizadas em colaboração com o Dr. Luis Guilherme Mansor Basso da Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD-EUA), utilizando o microcalorímetro VP-DSC (Microcal, Northampton, MA, EUA) do grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo).

Utilizou-se uma taxa de calor de 10 °C/h onde a temperatura foi variada de 10 °C a 65 °C em pressão constante de 1 atm. As linhas de base foram observadas antes da análise da formação do complexo. As amostras foram medidas a 30 μM isoladamente e o complexo foi preparado utilizando as estequiometrias 1:1,5 e 1:2 de *EcCsdB* e *EcSelD*, respectivamente.

Após a subtração da linha de base obtida pela medida do tampão utilizado, os termogramas resultantes foram normalizados com a concentração das amostras utilizadas e a deconvolução dos dados se deu através do programa *Microcal Origin*[®] *DSC*. O modelo utilizado para as análises foi o de não dois-estados através do programa *DSCFit*.⁷¹ Esse modelo é utilizado para processos irreversíveis e considera pequenos micro-estados reversíveis.

3.4.4 Obtenção dos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo binário através de Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os ensaios de interação por calorimetria de titulação isotérmica foram feitos com intuito de se obter os parâmetros termodinâmicos da interação *EcCsdB.EcSelD*. Esses ensaios foram realizados no equipamento ITC-200 (Microcal) do Instituto de Biociências (IBB) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Botucatu). Primeiramente, ensaios de injeção única foram realizados a fim de se obter a variação de entalpia aparente da interação (ΔH_{ap}). Para isso, as amostras foram primeiramente degaseificadas e então injetadas na cela e seringa. Na cela havia 25 μM de *EcSelD* e 247,4 μM de *EcCsdB* na seringa, sendo feita injeção única de 8 μL em monitoramento por 1200 s, a 25 °C. Os dados foram tratados no programa *MicroCal - ITC Origin Analysis Software* e a contribuição do calor de diluição, *EcCsdB* no tampão, foi subtraído do calor de interação obtido.

3.4.5 Verificação qualitativa da interação por co-eluição

Para obtenção qualitativa da interação, foram realizados ensaios de *pull-down* em que *EcSelD* foi imobilizada em um suporte em resina de Ni^{2+} -NTA (Clontech) e por ela passou-se uma solução contendo 1 mg de *EcCsdB* purificada. Uma vez que a *EcSelD* possui em sua porção amino-terminal uma His-TAG, os ensaios foram feitos sem a clivagem. Ambas as amostras foram dialisadas para o KPB-150 NaCl e a coluna foi previamente equilibrada neste tampão. Aproximadamente 0,5 mg de *EcSelD* foram imobilizadas na coluna, em seguida adicionou-se a solução contendo *EcCsdB* e então procedeu-se à uma cromatografia de afinidade, sendo o tampão de lavagem KPB-150 NaCl suplementado com 30 mM de imidazol e o tampão de eluição KPB-150 NaCl suplementado com 500 mM de NaCl. As frações de todas as etapas foram coletadas e submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE 8%.

3.4.6 Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)

Assim como a coleta de dados de SE-AUC, a coleta de SV-AUC foi realizada no mesmo local com os auxílios previamente mencionados. Foram medidas as proteínas *EcCsdB*, *EcSelD* isoladas, nas concentrações de 12,8 μM e 15,7 μM , respectivamente. O complexo binário *EcCsdB.EcSelD* foi medido em concentrações equimolares das proteínas (5 μM cada) com excesso de ATP e MgCl_2 (50 μM) e na presença de Sec. Optou-se em medir o complexo somente na presença de Sec pois este havia sido o complexo de maior afinidade visto nos experimentos de IFS.

Os experimentos de velocidade de sedimentação foram realizados a 28.000 rpm, 25 °C, em tampão KPB + 150 mM NaCl. A sedimentação em solução foi monitorada no comprimento de onda de 280 nm com o total de 136 varreduras para cada condição por 24 h. Os valores teóricos para as constantes relacionadas à densidade e viscosidade a partir do tampão experimental foram calculados pelo programa *SEDNTERP*.⁷⁰ Para a interpretação da absorção radial, todas as curvas resultantes foram ajustadas pelo programa *SEDFIT*⁷² utilizando o modelo de distribuição contínua $c(S)$.

3.5 Caracterização estrutural da formação do complexo binário

3.5.1 Análise da formação do complexo por Microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra por contraste negativo (NS-EM)

Para a visualização do complexo através da microscopia eletrônica por contraste negativo (NS-EM), amostras do complexo (0,5 mg/mL) em tampão KPB foram depositadas (~3 μ L) em grades de carbono (*Ultrathin Carbon film 400 mesh*, Ted Pella), com carga neutra por 30 s. Após secagem com papel filtro, procedeu-se com uma etapa de lavagem com tampão 10 mM HEPES, pH 7,0. Em seguida, foram cobertas com 3 μ L de 2% de acetato de uranila por 30 s, seguida posteriormente por outra secagem com papel filtro. As imagens foram coletadas em -5 μ m de *defocus* e magnificação 115 kX em microscópio FEI TECNAI G2F20 HRTEM (FEI) operando em 200 kV. As imagens foram gravadas utilizando a TIA-camera (FEI) e analisadas através do pacote de software IMAGIG 4D.⁷³ O tamanho médio e o desvio padrão das medidas foram obtidos a partir de 200 partículas únicas, previamente selecionadas e centralizadas.

3.5.2 Obtenção do envelope molecular do complexo por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Assim como foi feita uma caracterização biofísica da interação, uma caracterização estrutural se fez necessária com a finalidade de se obter os primeiros modelos estruturais de interação para o complexo *EcCsdB.EcSelD*. Para isso, medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram feitas para obtenção do modelo em baixa resolução, ou envelope.

A coleta de dados foi realizada na linha SAXS-1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – CNPEM) em colaboração com o Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto (IBB – UNESP Botucatu). Medidas de espalhamento das amostras isoladas bem como o complexo binário em razão estequiométrica de 1:1 foram realizadas em duas concentrações diferentes para diminuir o efeito de correlação, sendo as concentrações de 1 mg/mL e 10 mg/mL para a proteína *EcSelD*, 1 mg/mL e 3,5 mg/mL para *EcCsdB* e as concentrações de 2 mg/mL e 8 mg/mL para o complexo binário *EcCsdB.EcSelD*. Utilizou-se a configuração experimental de comprimento de onda de $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ e com distância de 1,033 mm em relação ao detector bidimensional Pilatus 300K (Dectris). As medidas de SAXS de *EcCsdB* e complexo binário

EcCsdB.EcSelD foram feitas em tampão KPB, a 25 °C e em tampão de diálise para a enzima *EcSelD*.

As amostras bem como os tampões a serem subtraídos foram colocados em sistema de vácuo numa cela de mica e obtidos em uma média de 5 frames de 30 segundos cada. O processamento inicial foi realizado através do programa *FIT2D*⁷⁴ no qual as contribuições dos respectivos tampões foram subtraídas das curvas de espalhamento de cada amostra, uma vez que a curva de espalhamento de uma amostra é a soma do espalhamento das macromoléculas em solução juntamente com o espalhamento do tampão utilizado. O tratamento dos dados foi realizado através do pacote de programas *ATSAS*.⁷⁵ Todas as amostras tiveram as intensidades corrigidas pela subtração da constante de *Porod*. Os raios de giro (R_g) e a função de distribuição dos pares $p(r)$ foram obtidas através da análise de *Guinier* e *GNOM*, respectivamente⁷⁶ Os modelos *ab initio* foram calculados através do *DAMMIN*,⁷⁷ sendo imposta a simetria P2 para *EcCsdB* e *EcSelD* e a simetria P1 para o complexo. Para fazer o alinhamento das estruturas cristalográficas de *EcCsdB*⁵⁰ e *EcSelD*,³⁸ foi utilizado o program *SUPCOMB*.⁷⁸ Em relação ao complexo, uma modelagem *in silico* para a construção do complexo binário foi feita através do servidor *HADDOCK*,⁷⁹ no qual as cisteínas catalíticas de *EcCsdB-Cys364* e *EcSelD-Cys17* foram utilizadas como restrições espaciais. Para essa análise, utilizou-se um modelo obtido por modelagem por homologia de *EcSelD* através do programa *I-TASSER*,⁸⁰ no qual o domínio N-terminal foi incluído junto às restrições espaciais do modelo cristalográfico dessa amostra. Assim, um modelo teórico da estrutura do complexo foi gerado e ajustado dentro do envelope molecular do complexo, utilizando o programa *SUPCOMB*.⁷⁸ Os envelopes moleculares obtidos foram analisados no *PyMOL 1.3*.⁸¹

3.5.3 Obtenção do modelo em alta resolução do complexo por Cristalografia de proteínas

3.5.3.1 Cristalografia de proteínas

3.5.3.1.1 Síntese do peptídeo correspondente ao fragmento N-terminal de *EcSelD*

Uma vez que ambas as proteínas possuem estrutura obtidas por cristalografia de proteínas, diversas tentativas de cristalização do complexo foram realizadas a fim de se obter a estrutura em alta resolução do complexo. Entretanto, não houve cristal que apresentasse

padrão de difração de raios-X. Dessa forma, um peptídeo referente ao domínio N-terminal de *EcSelD* foi planejado e sintetizado a fim de co-cristalizar juntamente com *EcCsdB*.

A síntese do peptídeo de *EcSelD* baseou-se na literatura,⁸² a qual mostra o resíduo Cys17 como o resíduo catalítico e, portanto, participante das interações com *EcCsdB*. Foi também sintetizado um peptídeo controle, no qual a Cys catalítica foi substituída por uma alanina (Ala, C17A), pelo colaborador Dr. Edson Crusca Junior do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Araraquara.

Pep-Cys (C17): HGAGCGCKI

Pep-Ala (Controle negativo, C17A): HGAGAGCKI

Para realização dos ensaios de interação entre *EcCsdB.Pep-Cys*, e *EcCsdB.Pep-Ala*, os peptídeos foram covalentemente marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC - Sigma-Aldrich), o qual possui um ótimo rendimento quântico e solubilidade em água. Posteriormente, realizou-se medidas de anisotropia de fluorescência, uma técnica amplamente utilizada na caracterização de interações macromoleculares.

3.5.3.1.2 Marcação dos peptídeos com isotiocianato de fluoresceína

Para a marcação dos peptídeos, utilizou-se o protocolo previamente estabelecido pela Dra. Livia Regina Manzine⁶⁸ (Grupo de Biotecnologia Molecular - IFSC/USP). Incubou-se 1,5 mg/mL de cada peptídeo em 5 µL de isotiocianato de fluoresceína (25 mM) por 14 h, à 10 °C. O complexo peptídeo-fluoresceína foi então submetido a uma *Desalting* (HiTrap GE) para remoção do excesso de fluoróforo não ligado. O monitoramento se deu em 280 nm e 495 nm para observação dos picos correspondentes ao complexo e fluoróforo livre, respectivamente.

3.5.3.1.3 Análise da interação *EcCsdB.Pep-Cys* por Anisotropia de fluorescência (FAS)

Os ensaios de anisotropia de fluorescência foram realizados em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico a qual continha 100 nM do peptídeo marcado. Todas as medidas foram realizadas em um fluorímetro K2 (*ISS, fluorescence, Analytical Biomedical Instrumentation – Illinois/USA*) a 25 °C, localizado no grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo). O comprimento de onda de

excitação foi de 492 nm, com a utilização do filtro 470-490 nm e monitoramento no modo *single point*, com aquisição na configuração “L”.

Para as interações com os peptídeos, titulou-se concentrações crescentes de *EcCsdB* na cubeta e entre as titulações o sistema foi deixado em repouso por 10 min para garantir o equilíbrio térmico. Foram realizados ensaios dos complexos: *EcCsdB.Pep-Cys*, *EcCsdB.Pep-Cys.Se²⁻* e *EcCsdB.Pep-Cys.Sec*, nas concentrações constante dos substratos em excesso de 1,5 μM . As mesmas condições foram realizadas para o controle negativo (Pep2). Os dados foram tratados no programa *Origin*[®] 8.6 e o ajuste dos dados foi obtido através da função de *Hill*. As medidas foram realizadas em duplicata biológica.

3.5.3.1.4 Análise da interação *EcCsdB.Pep-Cys* por dicroísmo circular

Medidas de CD foram realizadas para verificar as mudanças em estrutura secundária de *EcCsdB* quando esta interage com o peptídeo. Para isso, espectros dos seguintes complexos foram medidos: *Pep-Cys*, *EcCsdB.Pep-Cys*, *EcCsdB.Sec*, *EcCsdB.Sec.Pep-Cys*. As concentrações utilizadas foram 4,5 μM para *EcCsdB* e *Pep-Cys* e de 15 μM para *Sec* em tampão KPB + 150 mM NaCl. Os experimentos foram realizados no mesmo equipamento mencionado na seção 3.3.1. Em todas as medidas, os espectros foram registrados em um intervalo de comprimento de onda de 198-250 nm, com uma média de 8 scans com resolução de 1 nm e velocidade de 20 nm/s. As contribuições do tampão foram subtraídas de cada um dos espectros e os dados foram tratados no programa *Origin*[®] 8.6.

Para a deconvolução dos dados, foi utilizado programa *CDPro*.⁸³ Os arquivos de entrada foram modificados através do *CRDATA* e a base de dados utilizadas foi a mesma para todos os espectros.

3.5.3.1.5 Ensaios de co-cristalização e *soaking*

Os ensaios de co-cristalização foram realizados através do robô de cristalização *Crystal Gryphon* (*Art Robbins Instruments*) contendo 141,7 μM de *EcCsdB* e 425,4 μM de *Pep-Cys*. Foram testados os kits de cristalização comerciais *Crystal Screen HT* (*Hampton Research*), *Morpheus HT-96* (*Molecular Dimensions*) e *SG1 Screen HT-96* (*Molecular Dimensions*). Ensaios de cristalização de *EcCsdB* prévios evidenciaram a extrema facilidade dessa macromolécula em cristalizar. Contudo, os ensaios de co-cristalização não resultaram em cristais de *EcCsdB* nessas condições iniciais.

Por isso, a técnica de *soaking* foi empregada a fim de permitir com que o peptídeo adentrasse nos canais de solvente dos cristais de *EcCsdB* pré formado. Para isso, *EcCsdB* foi cristalizada a 12 mg/mL na condição 4 M de formato de sódio, à 18 °C. Uma solução de criopreservação foi preparada contendo 20% de glicerol e 1,4 mM a concentração de Pep-Cys. O sistema foi deixado em repouso por 1 h e os cristais foram resfriados em N₂ líquido. A coleta de dados foi realizada na linha MX-2 (LNLS, CNPEM) e o tratamento dos dados foi feito através dos programas: *XDS*⁸⁴ para integração dos dados, *CCP4*⁸⁵⁻⁸⁷ *Aimless/Pointless* para escalonamento dos dados. O processamento das fases foi realizado através de substituição molecular utilizando como modelo de busca a estrutura *EcCsdB* (PDB ID 1JF9:A) e o programa *Phaser* (CCP4). O refinamento dos dados foi feito no programa *Phenix*.⁸⁸ A visualização da estrutura em alta resolução foi observada no programa *Coot*.⁸⁹ e as figuras geradas no programa *PyMOL*.⁸¹

3.6 Demonstração da interação em sistema *in vivo*

Os ensaios de duplo híbrido dirigido (Y2H) da via de biossíntese de Sec de *E. coli* foram escolhidos para elucidar a interação entre as proteínas da via em um sistema *in vivo*. Além disso, *Saccharomyces cerevisiae*, organismo no qual os ensaios foram realizados, possui um tRNA^{Sec} predito porém não funcional, o que não afetaria as medidas dos eventuais *backgrounds* nas interações macromoleculares esperadas por não apresentar a via de biossíntese e incorporação de Sec.^{90,91}

3.6.1 Clonagem dos genes *csdB* e *selD* de *E. coli* nos vetores isca (pGBKCg) e presa (pGADCg)

Para a clonagem nos vetores isca (pGBKCg) e presa (pGADCg) foram desenhados oligonucleotídeos, para a amplificação dos genes codificantes para *EcCsdB* e *EcSelD*.

csdB-For: 5'-GCAGGCTTCACCATGATTTTTTCCGTCGACAAAGTG-3'

csdB-Rev: 5'-AAGCTGGGTCTCCCAGCAAACGGTGAATACG-3'

selD-For: 5'-GCAGGCTTCACCATGAGCGAGAACTCGATTTCG-3'

selD-Rev: 5'-AAGCTGGGTCACGAATCTCAACCATGGCACG-3'

attB-For: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC-3'

attB-Rev: 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC-3'

Esses vetores (pGBKCg e pGADCg) permitem com que a clonagem dos domínios do fator de transcrição (domínio de ligação ao DNA, DBD e domínio de ativação da transcrição, AD) ocorram ambos na porção carboxi-terminal, deixando livre para a interação a porção amino-terminal. Além disso, esses vetores foram otimizados para o sistema de clonagem Gateway⁹² (ThermoScientific). Nesse sistema o gene de interesse é flanqueado por uma sequência *attB*, a qual sofre um *crossing-over* com um vetor doador, no caso, pDONR 221TM, o qual possui uma sequência *attP* no cassette para clonagem. Assim, com a utilização da enzima BP clonase, há a formação do vetor de entrada, que possui o gene de interesse flanqueado por uma sequência *attL*.⁹³

Uma vez tendo o vetor de entrada, este pode ser utilizado para uma nova clonagem em qualquer vetor de destino que possua uma sequência *attR*. Assim, através de uma reação com a enzima LR clonase, permitindo o *crossing-over* entre o vetor doador (contendo o gene de interesse) e o vetor de destino (no caso, pGBKCg e PGADCg). O produto desta reação é o clone de expressão contendo o inserto de interesse.⁹³ Um esquema simplificado pode ser observado na Figura 15 a seguir.

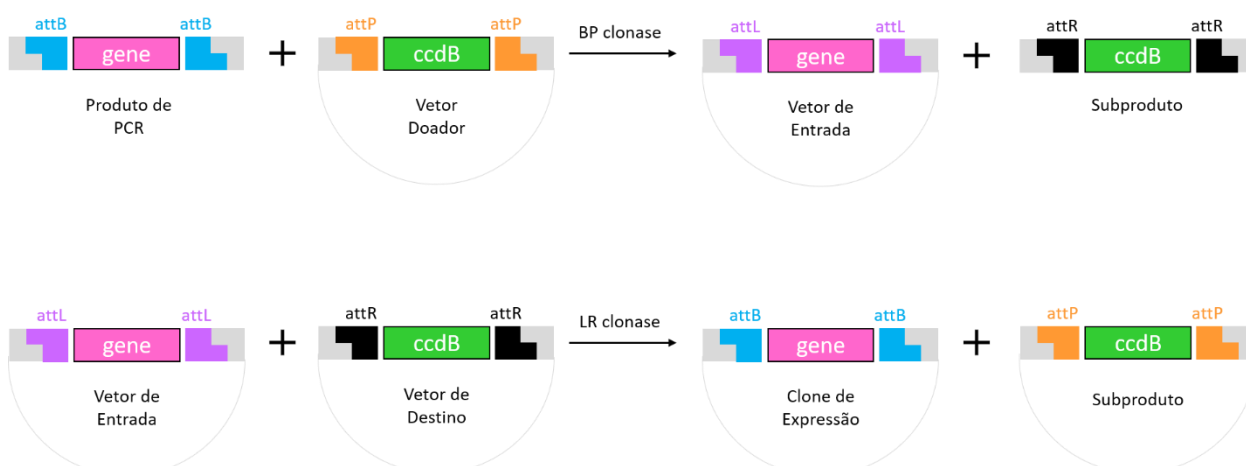


Figura 15 – Esquema simplificado para clonagem utilizando o sistema *gateway* (ThermoScientific). O gene de interesse é flanqueado por sequências *attBs*. O vetor doador possui em seu cassette de clonagem um gene para resistência *ccdB* flanqueado por sequências *attP*. A *BP clonase* faz a recombinação destes dois, gerando o vetor de entrada, que corresponde ao vetor doador com o gene de interesse ao invés do gene de resistência *ccdB*. Essa recombinação gera as sequências *attL* que flanqueiam o gene de interesse no vetor de entrada. Uma vez pronto o vetor de entrada, este pode ser utilizado para qualquer clonagem em vetores otimizados para o sistema *gateway*. Nesse caso, utiliza-se uma *LR clonase* para fazer a recombinação entre vetor de entrada e vetor de destino, gerando assim o clone de expressão. Essa recombinação é feita devido à presença de sequências *attRs* no vetor de destino, que recombina com as sequências *attLs*, gerando as sequências *attBs* que flanqueiam o gene de interesse no clone de expressão.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os genes de interesse foram amplificados através de PCR a partir de uma alíquota de DNA genômico de *E. coli*, seguindo protocolo previamente descrito na seção 3.1.3. Os fragmentos de DNA purificados foram então submetidos a uma segunda PCR, a qual tinha como objetivo completar a sequência *attB* para que o produto final desta segunda PCR pudesse ser utilizado no primeiro passo de clonagem no vetor de entrada. Assim, as condições da PCR foram as mesmas descritas acima, sendo o DNA correspondente ao produto da primeira PCR e os oligonucleotídeos utilizados foram os *attB-Forward* e *attB-Reverse*. O tamanho dos fragmentos foram novamente monitorados em gel de agarose contendo *Sybr Safe*[®] e a purificação dos DNAs se deu através do kit comercial *Agarose gel extraction kit* (CellCo).

O próximo passo foi a clonagem no vetor de entrada pDONR221 utilizando-se o kit comercial *BP Clonase Enzyme Mix II* (ThermoFisher Scientific). A reação continha 150 ng do produto da PCR, 150 ng do vetor pDONR221, 2 µL do mix de enzima BP clonase e tampão TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) para um volume final de 10 µL. Incubaram-se as reações a 25 °C, 16 h. Para finalizar a reação, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2 µg/µL), incubou-se a reação por 10 min a 37 °C para que ocorresse a degradação de proteínas na solução.

Em seguida, o produto da reação foi transformado em cepa *E. coli* DH5α conforme protocolo de transformação de bactérias quimiocompetentes (seção 3.1.1). No caso do pDONR221, a seleção é feita através de antibiótico canamicina. A confirmação da transformação foi feita conforme protocolo 3.1.2 e os clones contendo o gene de interesse foram submetidos à clonagem nos vetores de destino.

Para clonagem nos vetores isca pGBKCg, que contém o DBD (*DNA binding domain*) e o vetor presa pGADCg, que contém o AD (*activation domain*), utilizou-se o kit comercial *LR Clonase Enzyme Mix II* (ThermoFisher Scientific). A reação continha 150 ng do vetor de entrada (pDONR221 contendo o gene de interesse), 150 ng de um dos vetores, 2 µL do mix de enzima *LR clonase* e tampão TE para um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas *over night*, a 25 °C. Em seguida, adicionou-se 1 µL de proteinase K em cada reação, sendo novamente incubadas a 37 °C por 10 min. O produto desta reação foi transformado segundo protocolo mencionado acima. Os meios seletivos foram LB-ágar suplementado com canamicina 30 µg/mL para o vetor pGBKCg e LB-ágar suplementado com ampicilina 25 µg/mL para o vetor pGADCg.

A confirmação da recombinação foi novamente realizada conforme protocolo descrito na seção 3.1.2. Dessa forma, os clones nos quais continham os insertos de interesse foram

selecionados para clonagem em linhagem de levedura Mav203 (MAT α , *leu2-3,112*, *trp1-901*, *his3 Δ 200*, *ade2-101*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *SPAL10::URA3*, *GAL1::lacZ*, *HIS3_{UAS}* GAL1::*HIS3@LYS2*, *can1^R*, *cyh2^R*) de *S. cerevisiae*.

3.6.2 Transformação em levedura dos clones de expressão

Para transformação em *S. cerevisiae* linhagem Mav203, uma colônia isolada (2-3 mm de diâmetro) foi inoculada em 30 mL de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona, 2% de glicose), mantida sob agitação 250 rpm, 30 °C por 18 h. Em seguida, aumentou-se a escala do inóculo (50 mL) para uma D.O._{600nm} de 0,3 e as células foram mantidas sob mesma agitação e temperatura até D.O._{600nm} de 0,6. Em seguida, as células foram centrifugadas 4000 rpm, 7 min, 25 °C e lavadas com 30 mL de água estéril. As células foram novamente centrifugadas 4000 rpm, 7 min, 25 °C e então, ressuspensas em 1,5 mL de tampão 1,1X TE/LiAc (11 mM Tris, 1,1 mM EDTA, pH 7,5, 0,11 M Acetato de lítio). Em seguida, as células foram centrifugadas novamente, 15 s, 13000 rpm, temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ressuspensas-se as células em 600 μ L de 1,1X TE/LiAc.

Em um microtubo previamente gelado adicionou-se 10 μ L de esperma de salmão (SigmaAldrich) [10 μ g/ μ L], 2 μ g de DNA plasmidial (1 μ g de cada vetor), 50 μ L das células previamente preparadas e 500 μ L de PEG/LiAc (40% PEG 3350, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5, 0,1 M Acetato de lítio). A reação foi incubada por 30 °C em banho seco, 30 min, sendo homogeneizada a cada 10 min. Em seguida, a reação foi incubada a 42 °C por 15 min em banho úmido, sendo homogeneizada a cada 5 min. As células foram centrifugadas por 15 s, 13000 rpm, lavadas com 1 mL de água estéril e ressuspensas em 150 μ L de água estéril. As células foram plaqueadas em meio SD-WL (6,7 g/L YNB, 20 g/L glicose, 0,02 g/L adenina, 0,02 g/L histidina) e incubadas a 30 °C por 3-5 dias.

3.6.3 Teste de ativação do gene repórter *HIS3* para detecção da interação

Para o ensaio de ativação do gene repórter *HIS3*, cresceram-se 3 colônias dos controles (813: pEXPTM32/Krev1 + pEXPTM22/RalGDS-wt, 814: pEXPTM32/Krev1 + pEXPTM22/RalGDS-m1, 815: pEXPTM32/Krev1 + pEXPTM22/RalGDS-m2) em meio SD-WL, bem como 3 colônias da co-transformação *selD*-pGBKCg.*csdB*-pGADCg, 16 h, 30 °C, 150 rpm. Após esse período as células foram centrifugadas por 7 min, 4.000 rpm, 25 °C. O *pellet* celular foi ressuspendido em 1 mL de água mili-Q estéril e centrifugado novamente por 30 s,

13000 rpm, temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas com 1 mL de água mili-Q estéril e ressuspendidas em 600 μ L de glicerol 20% estéril. Esses passos de lavagens são importantes para remover a histidina presente no meio de cultura.

A D.O._{600nm} foi normalizada e então uma diluição seriada de cada uma das colônias foi preparada, sendo a D.O._{inicial} de 0,1, e a D.O._{final} de 10^{-8} . Com auxílio da multicanal as células foram pipetadas (4 μ L de cada D.O.) em placas SD-WLH sólido (6,7 g/L YNB, 20 g/L glicose, 0,02 g/L adenina, 15 g/L ágar) contendo concentrações crescentes (0 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM) de 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol - SigmaAldrich) e incubadas por 42 h a 30 °C.

4 RESULTADOS e DISCUSSÕES

4.1 Obtenção das amostras

4.1.1 Purificação da Selenocisteína liase (*EcCsdB*)

Como mencionado anteriormente, para a purificação da Selenocisteína liase, procedeu-se primeiramente pela precipitação seletiva com sais iônicos através da adição de 50% (m/v) de sulfato de amônio + 2% de piridoxal-5'-fosfato (PLP). Em seguida, o excesso de sal foi removido através de uma cromatografia de dessalinização em coluna *Desalting* (Amersham), acoplada ao sistema Åkta (GE), monitorando a absorvância em 280 nm e a condutividade (Figura 16).

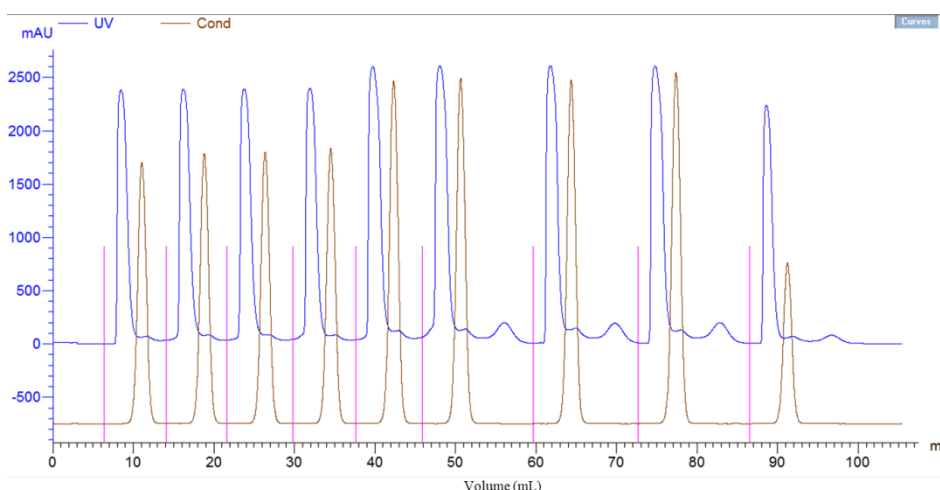


Figura 16 – Cromatografia de dessalinização utilizando coluna *Desalting* (Amersham). Monitorou-se a absorvância em 280 nm (linha em azul) para realizar a coleta do pico. A condutividade (linha em marrom) foi observada entre os intervalos das injeções (linhas em rosa). Os vários picos com mesmo perfil referem-se às múltiplas injeções sequencialmente utilizadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A próxima etapa utilizada na purificação da *EcCsdB* foi uma cromatografia de troca iônica, em coluna *DEAE Sepharose* (GE) também acoplada ao sistema Åkta (GE). O resultado obtido nesta etapa de purificação pode ser observado no cromatograma a seguir (Figura 17), em que a linha em verde corresponde ao aumento linear da concentração salina e a seta indica o pico correspondente às frações da amostra de interesse.

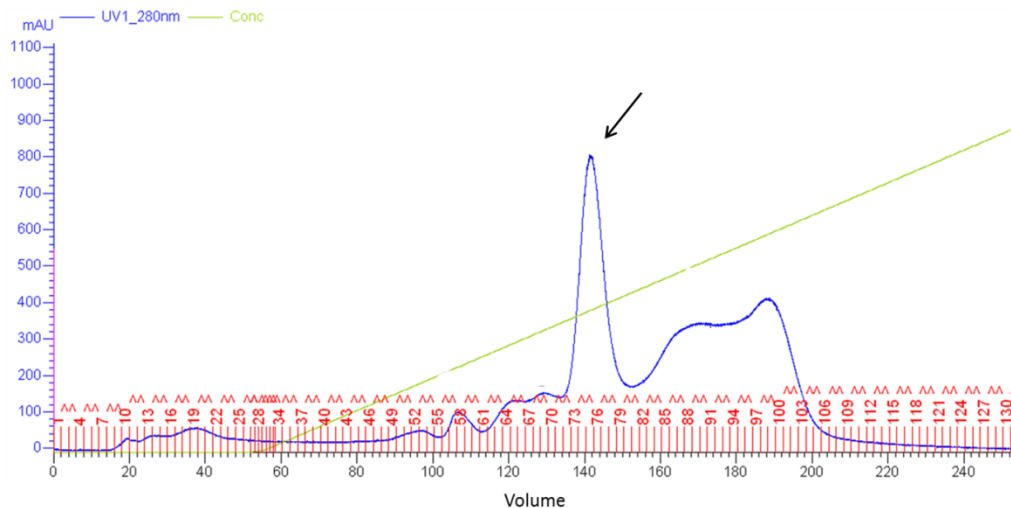


Figura 17 – Cromatografia de troca iônica utilizando a coluna *DEAE Sepharose* (GE). A linha em verde corresponde ao aumento linear da concentração salina entre 0 e 1 M. O pico indicado com o número 6 na figura corresponde à proteína *EcCsdB*, sendo eluída em aproximadamente 350 mM NaCl (Canaleta 6 da Figura 19).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a cromatografia de troca iônica permitiu a separação de alguns contaminantes. Por fim, como última etapa da purificação de *EcCsdB*, realizou-se uma cromatografia de exclusão molecular, em coluna *Superdex 200 10/300* (GE) com KPB suplementado com 150 mM NaCl. O cromatograma correspondente a essa etapa de purificação pode ser observado abaixo (Figura 18), em que as frações correspondentes à proteína de interesse estão indicadas pela seta.

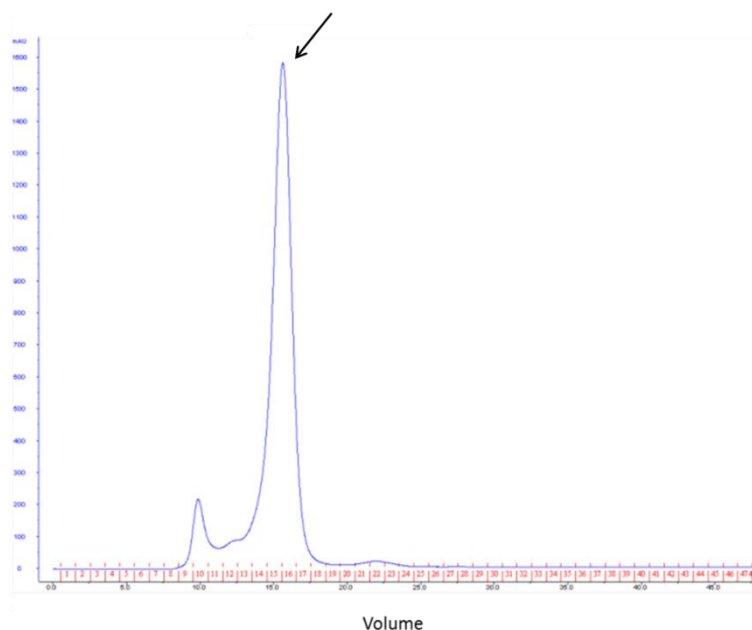


Figura 18 – Cromatografia de exclusão molecular de *EcCsdB* em coluna *Superdex 200 10/300* (GE). O pico indicado na figura corresponde à *EcCsdB* (Canaleta 7 da Figura 19).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se através deste cromatograma 3 picos majoritários, sendo o pico correspondente à *EcCsdB* estreito de maior valor de absorvância em 280 nm. As frações correspondentes às etapas de purificação de *EcCsdB* foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE 15% (Figura 19), sendo aplicados 10 μ L nas canaletas 1-6 e 15 μ L na canaleta 7.

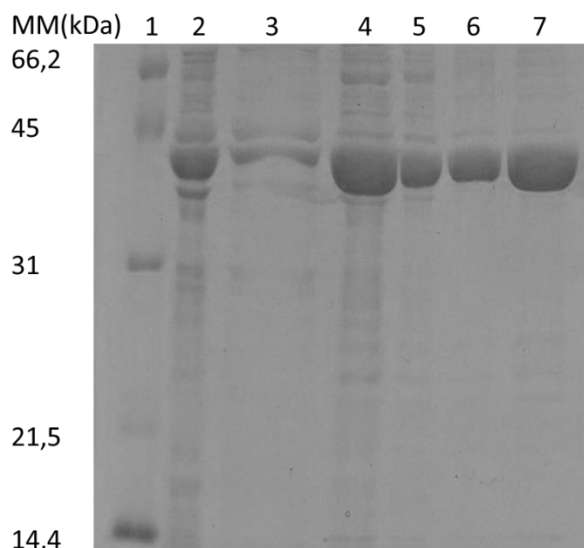


Figura 19 – SDS-PAGE 15% resultante das etapas de purificação de *EcCsdB*. Nas canaletas tem-se: (1) marcador molecular (kDa); (2) extrato proteico bruto; (3) sobrenadante após a precipitação com sais iônicos; (4) *pellet* proteico após a precipitação com sais iônicos; (5) amostra após a cromatografia de dessalinização utilizando coluna *Desalting* (Amersham); (6) amostra eluída da cromatografia de troca iônica utilizando coluna *DEAE Sepharose* (GE); (7) amostra eluída da cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna *Superdex 200 10/300*. Verifica-se que ao final de todo o processo de purificação a proteína *EcCsdB* encontra-se com elevado grau de pureza.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 19 observa-se o resultado de cada uma das etapas de purificação da *EcCsdB*. Ao final do processo, ou seja, após a cromatografia de exclusão molecular (canaleta 7), observa-se que a proteína *EcCsdB* foi obtida com elevado grau de pureza e com o massa esperada, aproximadamente 40 kDa (44,4 kDa pela predição teórica).

4.1.2 Purificação da Selenofosfato sintetase (*EcSelD*)

A purificação da enzima *EcSelD* foi realizada em 4 etapas: cromatografia de afinidade, diálise, clivagem da His-TAG e posterior cromatografia de exclusão molecular. Como primeiro passo da purificação, tem-se a cromatografia de afinidade (Figura 20) em Ni^{2+} -NTA (HiTrap – Amersham) através de um gradiente linear da concentração de imidazol, representado pela linha verde.

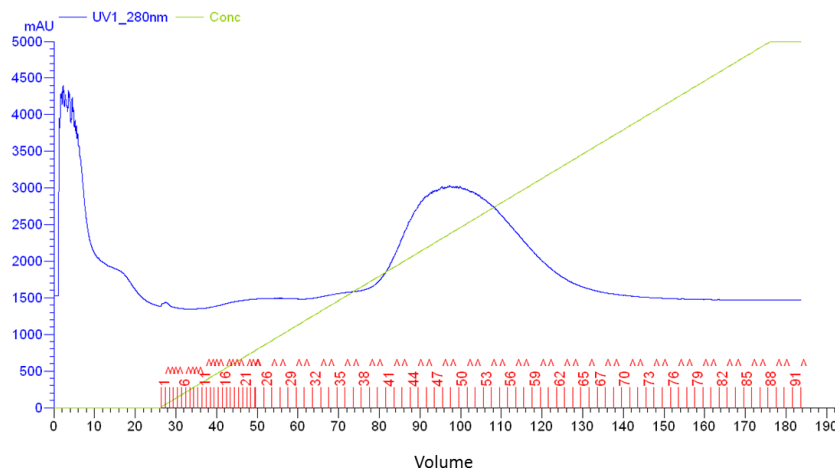


Figura 20 – Cromatografia de afinidade de *EcSelD* em coluna de Ni^{2+} -NTA (HiTrap – Amersham). A linha em verde corresponde ao aumento linear da concentração de imidazol, 10-500 mM. (Canaleta 4 da Figura 22).

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a coleta das frações correspondentes à *EcSelD*, a amostra foi submetida a um processo de diálise para a remoção do excesso de imidazol na solução. Este processo foi realizado a 4° C, por 16 h, sob baixa agitação.

Após a diálise, a clivagem da His-TAG pela adição de trombina (1 U – 100 µg/Sigma-Aldrich) foi realizada por 16 h, 18 °C. A proteólise foi interrompida pela adição de 1 mM de PMSF e a amostra foi então submetida a uma cromatografia de exclusão molecular (Figura 21), em coluna *Superdex 200 10/300* (GE). As frações correspondentes à proteína de interesse estão indicadas pela seta.

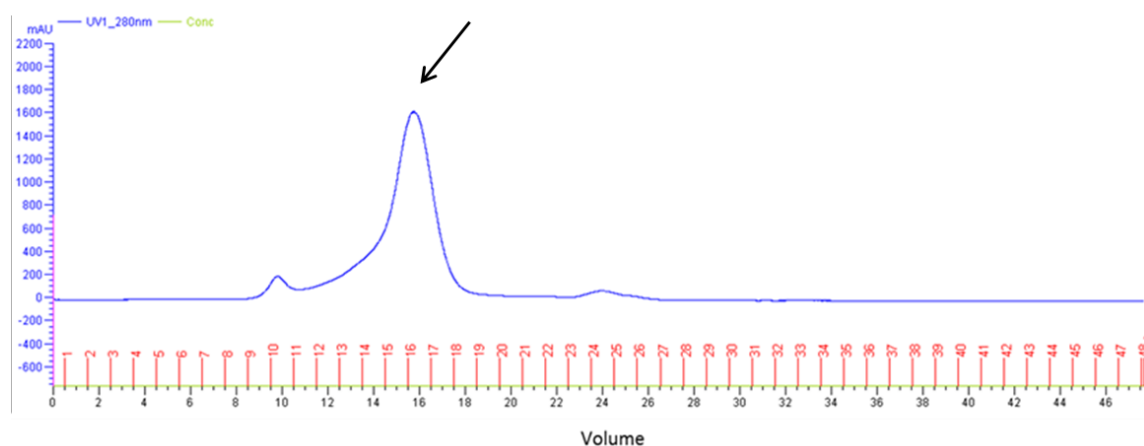


Figura 21 – Cromatografia de exclusão molecular de *EcSelD*, em coluna *Superdex 200 10/300*. O pico indicado corresponde à *EcSelD*. (Canaleta 7 da Figura 22).

Fonte: Elaborada pela autora.

Monitorando-se o comprimento de onda em 280 nm, em coluna *Superdex 200 10/300* (GE) foi possível verificar que *EcSelD* apresenta um significativo grau de pureza. Para

confirmar o grau de pureza, amostras dos processos de purificação, bem como de clivagem foram coletadas submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE 15% (Figura 22).

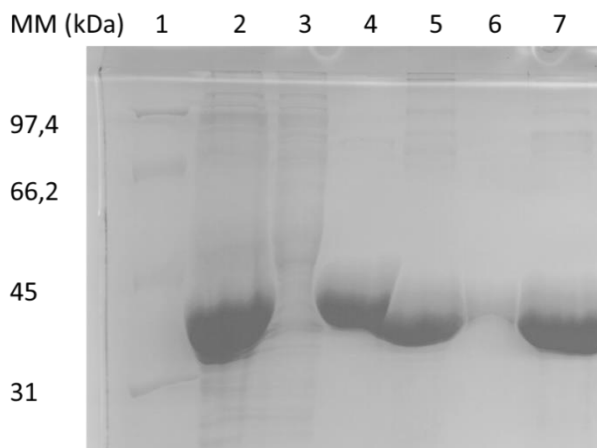


Figura 22 - SDS-PAGE 15% das amostras coletadas nas etapas de purificação da proteína *EcSelD*. As canaletas correspondem a (1) Marcador molecular (kDa); (2) Extrato proteico bruto; (3) Fração não interagente à coluna; (4) Fração de maior intensidade (maior absorvância em 280 nm) coletado da cromatografia de afinidade em coluna de Ni^{2+} -NTA (Hi-Trap – Amersham) ; (5) Amostra após proteólise (1 u/100 μg); (7) Fração do pico de maior absorvância em 280 nm resultante da cromatografia de exclusão molecular em *Superdex 200 10/300* (GE).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na canaleta 4 da Figura 22, tem-se o pico de maior intensidade da cromatografia de afinidade, no qual pode-se verificar a presença da proteína *EcSelD* com o tamanho esperado de aproximadamente 35 kDa (36,6 kDa pela predição teórica). Em comparação, a canaleta 5, apresenta a amostra após a clivagem com trombina (1 u/100 μg), na qual pode-se verificar que a clivagem ocorreu de maneira total, já que a banda correspondente à proteína diminuiu em relação ao tamanho. Por fim, na canaleta 7 tem-se o resultado da cromatografia de exclusão molecular, evidenciando o elevado grau de pureza do processo e com o tamanho esperado.

Após a purificação de ambas as enzimas procedeu-se aos experimentos de caracterização biofísica das proteínas *EcCsdB* e *EcSelD*, bem como experimentos para caracterização de interação.

4.2 Caracterização biofísica das amostras

4.2.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico e estado oligomérico através de Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Com a finalidade de se obter os diâmetros hidrodinâmicos das amostras em estudo, bem como analisar os seus respectivos estados oligoméricos, medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas (Figura 23).

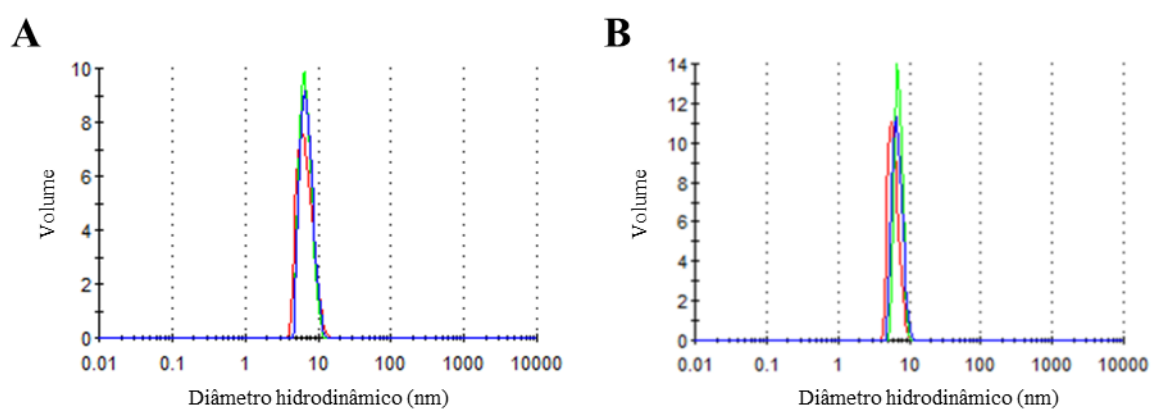


Figura 23 - Medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico a 25 °C para (A) *EcCsdB*, com diâmetro hidrodinâmico de $(7,9 \pm 1,6)$ nm e (B) *EcCsdB*, com diâmetro hidrodinâmico de $(6,6 \pm 1,2)$ nm. O experimento foi realizado em triplicata experimental e cada curva corresponde a cada uma das medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

As curvas observadas nos gráficos de DLS correspondem às três medidas realizadas. Assim, observa-se que a triplicata obtida possui relevância estatística, pois todos os picos apresentam-se com mesmo diâmetro e, centrossimétricos.

O resumo dos valores obtidos através das medidas de DLS pode ser observado na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Parâmetros em solução obtidos por DLS a 25 °C para *EcCsdB* e *EcSelD*.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Massa estimada (kDa)	Polidispersividade
<i>EcCsdB</i>	$7,9 \pm 1,6$	$85,2 \pm 16,9$	Monodispersa
<i>EcSelD</i>	$6,6 \pm 1,2$	$55,0 \pm 22,4$	Monodispersa

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado, a 25 °C tanto *EcSelD*, como *EcCsdB* apresentam-se na forma monodispersa, com um diâmetro hidrodinâmico de $(6,6 \pm 1,2)$ nm para *EcSelD* e de

($7,9 \pm 1,6$) nm para *EcCsdB*. Esses valores são esperados baseando-se na dimensão máxima das estruturas cristalográficas, de 8,7 nm para *EcCsdB* (PDB ID 1JF9) e de 7,2 nm para *EcSelD* (PDB ID 3U0O).^{38,50}

Além disso, tem-se que ambas as amostras encontram-se no estado dimerico em solução, conforme esperado pela literatura.^{38,50} O dímero da enzima *EcCsdB* tem massa aproximada de 88,8 kDa, o que é confirmado pela massa estimada obtida pelas medidas de DLS. Já a *EcSelD*, tem massa teórica de 73,2 kDa e tem-se um indicativa massa correspondente ao dímero.

A fim de se avaliar a estabilidade térmica das amostras, após a análise de DLS e obtenção do raio hidrodinâmico, ou raio de *Stokes* (R_S), foram feitas medidas de dicroísmo circular bem como espectroscopia de fluorescência intrínseca.

4.2.2 Avaliação do perfil de estruturas secundárias e estabilidade térmica por Dicroísmo circular (CD)

Para verificar o enovelamento das amostras e a estabilidade térmica das mesmas, foram realizadas medidas de dicroísmo circular (CD) em função da temperatura (Figura 24A). Os espectros de CD a 10 °C de *EcSelD* apresentam, um enovelamento típico do tipo α/β , como previsto pelo modelo estrutural.³⁸ Monitorando-se em função da variação térmica no comprimento de onda fixo de 222 nm, o ponto de mínimo usual da curva de CD para proteínas (mínimo global de sinal de CD para α -hélice), determina-se a curva de desnaturação (Figura 24B).

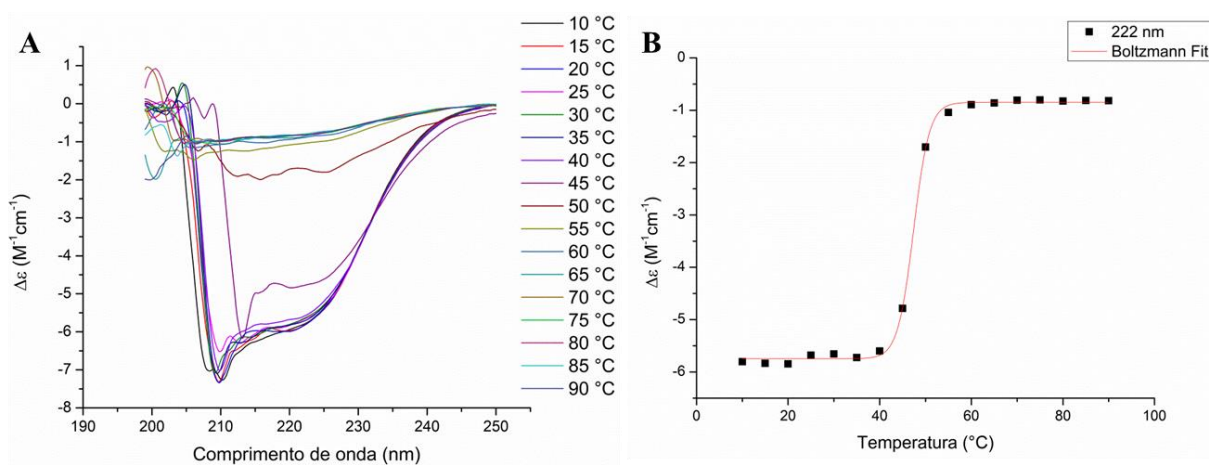


Figura 24 - Medidas de dicroísmo circular para *EcSelD*. (A) Espectros VT-CD da proteína *EcSelD*. Observa-se uma estabilidade até 45 °C e, a partir de 50 °C, há perda de estrutura secundária. (B) Curva de desnaturação térmica para *EcSelD*, monitorando-se o comprimento de onda em 222 nm. Em vermelho, o ajuste de *Boltzmann* indicando uma T_m de ($47,4 \pm 0,1$) °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos de dicroísmo circular com variação térmica mostram uma estabilidade térmica da amostra até 45 °C e conseqüente perda abrupta de estruturação secundária a partir desta temperatura. Observa-se que acima de 50 °C, há perda total de estrutura secundária da enzima *EcSeld* por agregação. A partir das curvas obtidas foi possível realizar um ajuste sigmoidal através do programa *Origin*® 8.6 utilizando a função de *Boltzmann*, e desta forma inferir o T_m da enzima ($47,4 \pm 0,1$) °C, que um parâmetro biofísico obtido no ponto de inflexão da curva e representa a temperatura na qual 50% das amostras estão enoveladas e 50% estão desenoveladas.

Da mesma maneira, para a *EcCsdB* também foram realizadas medidas de VT-CD, de 10 °C a 90 °C (Figura 25A). O espectro de CD da *EcCsdB* à 10 °C, reflete um espectro típico de proteínas com enovelamento do tipo α/β , sendo condizente com a estrutura resolvida por cristalografia de proteínas.⁵⁰ O perfil de desnaturação térmica pode ser observado na Figura 25B, na qual monitorou-se com comprimento de onda 222 nm em função da temperatura.

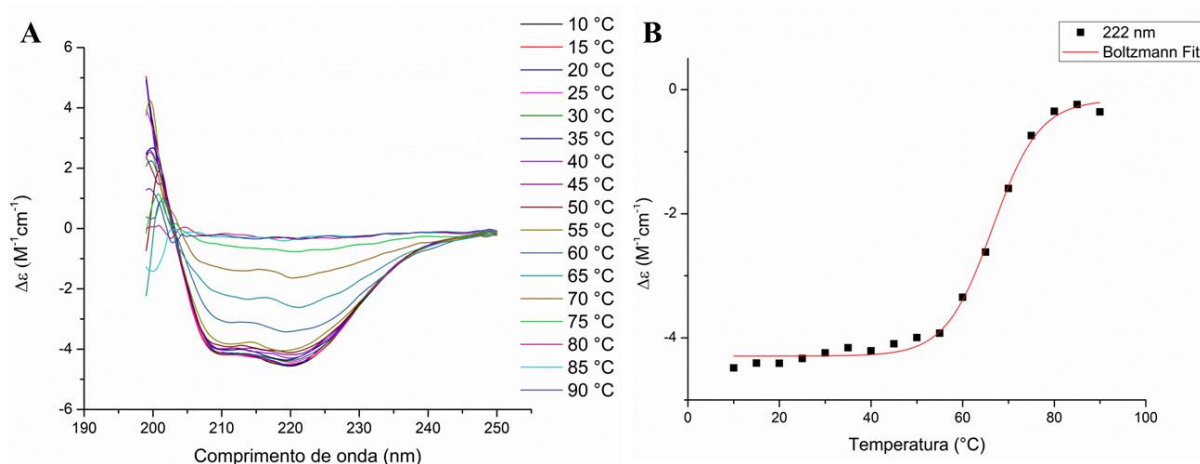


Figura 25 - Medidas de dicroísmo circular para a enzima *EcCsdB*. (A) Espectros de VT-CD da *EcCsdB* para diferentes temperaturas. Observa-se uma estabilidade até 55 °C e a partir de 60 °C há perda de estrutura secundária. (B) Curva de desnaturação térmica para *EcCsdB*, monitorando-se o comprimento de onda em 222 nm. Em vermelho, o ajuste de *Boltzmann* indicando uma T_m de ($66,5 \pm 0,5$) °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se que a proteína mantém sua estrutura secundária até 55 °C, indicando uma elevada estabilidade térmica da proteína. A partir da temperatura de 60 °C há uma perda gradual de estruturas secundárias e, acima de 70 °C ocorre perda total da estrutura secundária, por precipitação, como observado pela diminuição do sinal. Utilizando-se as curvas obtidas, foi possível inferir a temperatura de *melting* através do ajuste sigmoidal utilizando a função de *Boltzmann* no software *Origin*® 8.6, resultando em T_m de ($66,5 \pm 0,5$) °C.

Através das medidas de dicroísmo circular, observa-se que ambas as amostras possuem enovelamento coerente com a literatura.^{38,50} Mais ainda, como existe uma grande variação em comparação com as duas temperaturas de *melting*, tem-se que este parâmetro biofísico poderá ser utilizado para a análise de interação na formação do complexo binário *EcCsdB.EcSelD*.

Com as medidas de CD, verificou-se a conservação dos elementos de estrutura secundária até 35 °C, ou seja, para as temperaturas de análise de interação (25 °C) ambas as proteínas são estáveis. Para avaliar a conformação local e corroborar com os resultados de estabilidade térmica das amostras, medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca foram realizadas.

4.2.3 Análise da estabilidade conformacional por Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS)

A fim de se analisar a estabilidade conformacional das proteínas envolvidas na entrega de selênio na via de incorporação de selenocisteína, medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS) foram realizadas a 10 °C e a 25 °C. A escolha destas temperaturas se deve ao fato de que a 10 °C, há uma redução do movimento das moléculas em solução, e 25 °C é a temperatura em que serão realizados os experimentos de interação.

Os espectros de fluorescência intrínseca da *EcSelD* estão apresentados abaixo (Figura 26A), juntamente com um modelo em cadeia principal da sua estrutura cristalográfica, sendo destacados os triptofanos (Figura 26B).

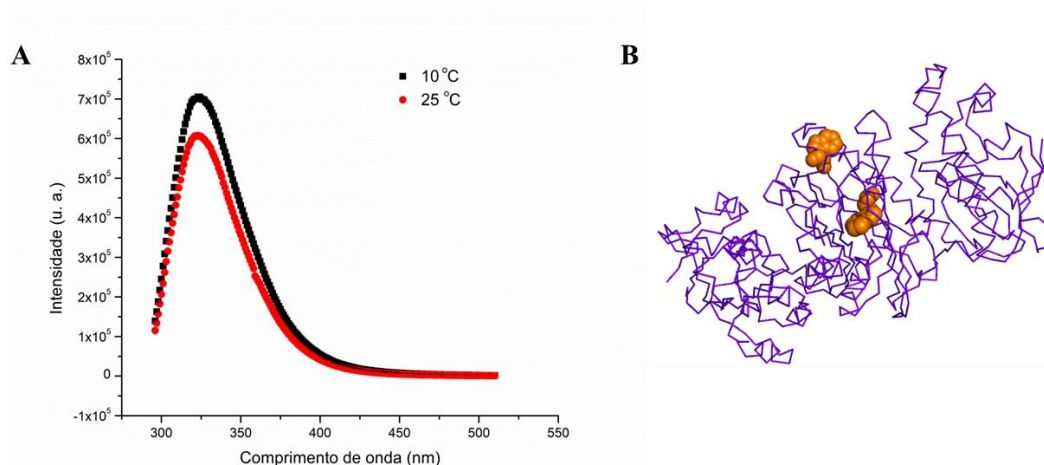


Figura 26 – Medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca da *EcSelD*. (A) Espectros de emissão obtidos para a proteína, com comprimento de onda de excitação de 295 nm, com filtro 295 nm e $\lambda_{\text{MAX-emissão}} = 322$ nm.. As medidas foram feitas a 10 °C (curva em preto) e a 25 °C (curva em vermelho). A excitação em 295 nm reflete a emissão dos resíduos aromáticos, em especial, os triptofanos. (B) Dímero de *EcSelD* (PDB ID 30UO) com estrutura em cadeia, com destaque para a localização dos triptofanos, em laranja. Observa-se que eles se localizam mais externamente à estrutura, sendo de fácil acesso ao solvente.

Fonte: Elaborada pela autora.

A enzima Selenofosfato sintetase de *E. coli* possui 2 triptofanos, 12 tirosinas e 24 fenilalaninas, sendo 5,5% de sua sequência composta por resíduos aromáticos. Além disso, observa-se na sua estrutura que os triptofanos localizam-se mais externamente, sendo de fácil acesso ao solvente. Por isso, a queda da intensidade com o aumento da temperatura está relacionada com a supressão do solvente, uma vez que moléculas de água atuam como supressores. O aumento da temperatura provoca uma maior agitação das moléculas e assim, ocorrem mais choques colisionais, quando comparada ao ambiente a 10 °C.

Em relação à posição dos máximos, observa-se um sutil deslocamento para a esquerda, no sentido de comprimento de ondas menores, indicando que a internalização dos resíduos de Trp talvez seja o mecanismo de agregação de *EcSelD* quando submetida a temperaturas maiores. Os efeitos observados na proteína indicam que ela não sofre mudanças conformacionais significativas que possam interferir nos resultados posteriores.

A mesma análise foi realizada para *EcCsdB* e os espectros de fluorescência intrínseca estão apresentados abaixo (Figura 27A), juntamente com um modelo em cadeia da sua estrutura cristalográfica, sendo destacados, novamente, os triptofanos (Figura 27C). Além disso, há também na Figura 27B, o espectro de emissão do PLP que está covalentemente ligado no sítio ativo da proteína.

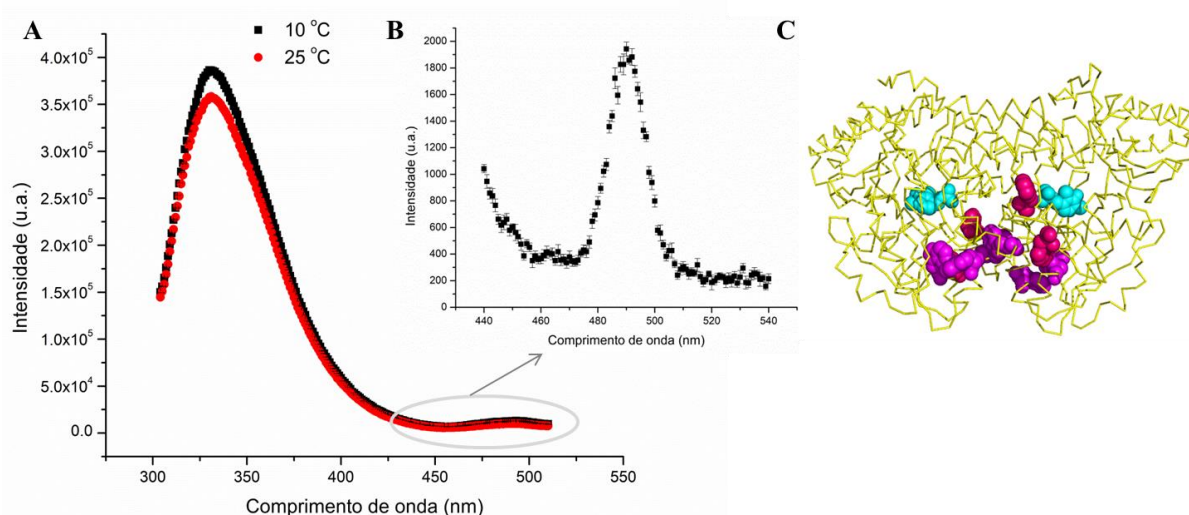


Figura 27 - Medidas de espectroscopia de fluorescência intrínseca da *EcCsdB*. (A) Espectros de emissão obtidos para a proteína, com comprimento de onda de excitação de 295 nm, com filtro 295 nm e $\lambda_{\text{MAX-emissão}} = 330$ nm. As medidas foram feitas a 10 °C (curva em preto) e a 25 °C (curva em vermelho). A excitação em 295 nm reflete a emissão dos resíduos aromáticos, em especial, os triptofanos. (B) Espectro de emissão do PLP, com comprimento de onda de excitação em 423 nm. (C) Dímero de *EcCsdB* (PDB ID 1JF9) com estrutura em cadeia, com destaque para a localização dos triptofanos, em rosa e roxo. O PLP está destacado em azul na estrutura. Observa-se que os triptofanos em rosa estão mais enterrados na estrutura e, aqueles em roxo estão mais externos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A enzima Selenocisteína liase de *E. coli* possui 10 triptofanos, 30 tirosinas e 22 fenilalaninas, sendo 7,6% de sua sequência composta de aminoácidos aromáticos. Observa-se que o aumento da temperatura promove um efeito da redução da intensidade. Assim como é o caso da *EcSelD*, o aumento da temperatura deve aumentar os choques colisionais, em comparação à temperatura de 10 °C, e assim promover este efeito de supressão. Mas apesar disso, verifica-se que não há mudanças conformacionais significativas que possa comprometer a estrutura em solução da amostra. Dos 10 triptofanos localizados na estrutura, tem-se que 4 deles estão mais expostos (em roxo), em comparação com os outros 6 triptofanos (em rosa). Por isso, observa-se efeito semelhante ao encontrado para *EcSelD*.

Além disso, observa-se que o aumento da temperatura para 25 °C promove um sutil deslocamento do pico para a direita, ou seja, no sentido de comprimentos de onda maiores. Isso sugere que a externalização dos resíduos de Trp possa ser o mecanismo no qual *EcCsdB* se agregue quando for submetida a temperaturas mais elevadas. Verifica-se então que a proteína não possui mudanças conformacionais significativas a 25 °C. Dessa forma, ambas as proteínas em estudo são estáveis na temperatura de análise, como pode ser visto pelas medidas de CD e IFS.

Ao se realizar as medidas de IFS de *EcCsdB*, observou-se um sinal de fluorescência no intervalo 450-540 nm. Devido a isto, um espectro de absorção UV-Vis foi monitorado no

equipamento *Nanodrop 2000* (ThermoScientific) e verificou-se que este sinal correspondia à emissão do PLP ligado no sítio ativo da *EcCsdB* (Figura 28).

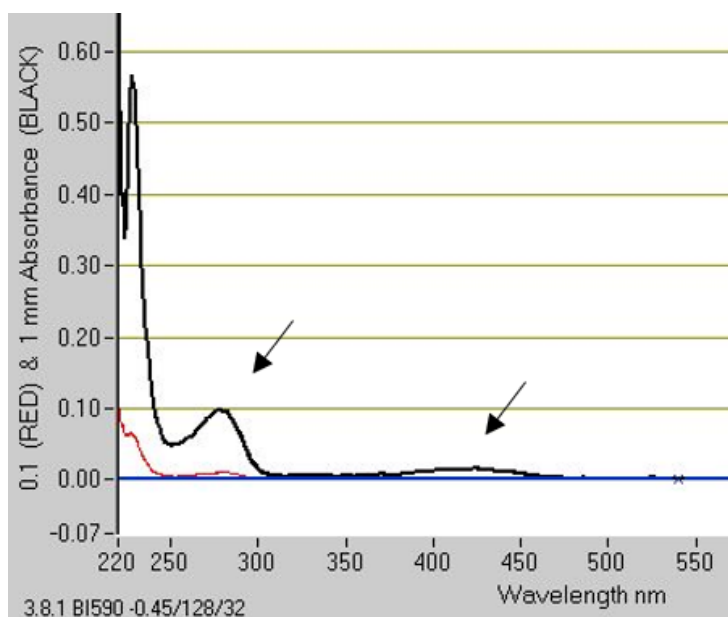


Figura 28 - Espectro de absorção UV-Vis da *EcCsdB* ligada ao PLP (em preto). As setas indicam a absorção dos resíduos aromáticos na *EcCsdB* (280 nm) e do PLP (423 nm). Em vermelho, espectro de absorção 10X menor.

Fonte: Elaborada pela autora.

Desta forma, foi feita uma excitação deste fluoróforo, em 423 nm e banda de emissão monitorada de 440-540 nm (Figura 27B). Assim, este fluoróforo nativo foi escolhido para realizar as medidas de interação, uma vez que ele se localiza no sítio ativo da *EcCsdB* e possui sinal de emissão de fluorescência.

Assim, todos os experimentos de caracterização biofísica realizados até aqui mostram que as amostras são estáveis, com enovelamento esperado e que não sofrem mudanças conformacionais significativas na temperatura de análise.

4.2.4 Determinação da cinética enzimática de *EcCsdB* na conversão Sec-seleneto

Com a finalidade de obter os parâmetros cinéticos da conversão Sec-seleneto pela ação da *EcCsdB*, ensaios de cinética enzimática foram realizados em triplicata utilizando o monitoramento da absorbância em 423 nm correspondente à formação de seleneto através do consumo de elenocisteína. A curva de velocidade por concentração de Sec pode ser visualizada abaixo (Figura 29).

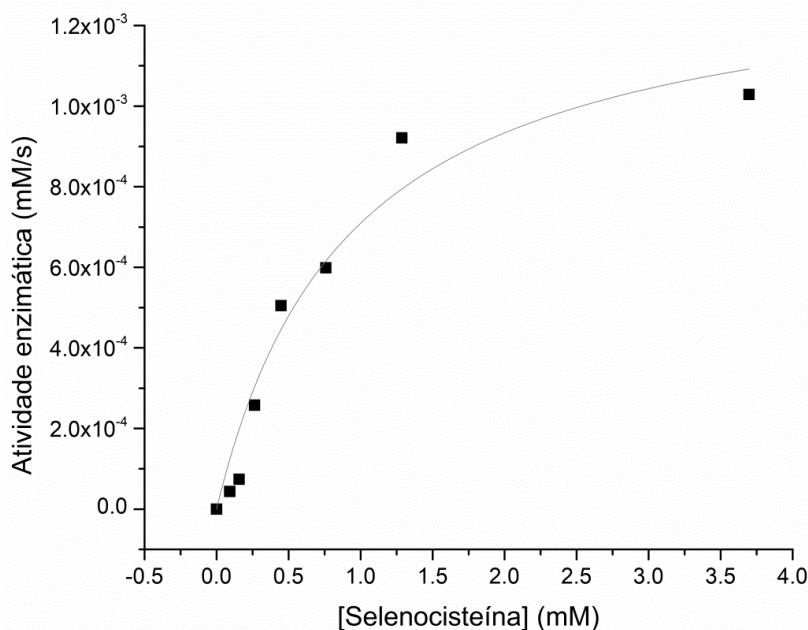


Figura 29 – Ensaio de atividade enzimática de *EcCsdB* na conversão Sec-seleneto. A concentração de enzima foi mantida constante de 20 μM e a concentração de selenocisteína variada entre 0 e 3,7 mM em diluição seriada. O monitoramento foi realizado em 423 nm, uma vez que o produto formado possui uma banda de absorção de 380-480 nm. O ajuste foi feito pela função de *Michaelis-Menten*, em triplicata, com desvio padrão de $4,15 \times 10^{-6}$, resultando em $K_M = 0,9$ mM e $V_{\max} = 1,4$ $\mu\text{M/s}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através do perfil, observa-se que *EcCsdB* possui uma curva característica de regulação alostérica pela concentração de substrato, uma vez que a função de primeira ordem não ocorre de modo exponencial, mas sim sigmoideal.⁹⁴

Os parâmetros cinéticos determinados pelo ajuste michaeliano são apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos obtidos para a conversão Sec-seleneto pela *EcCsdB*. K_M , contante de *Michaelis-Menten*; V_{\max} , velocidade máxima.

K_M (mM)	V_{\max} (mM/s)	Eficiência enzimática ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
$0,9 \pm 0,3$	$(14 \pm 2) \times 10^{-4}$	$0,77 \times 10^2$

Fonte: Elaborada pela autora

O ajuste dos dados experimentais utilizando a cinética de *Michaelis-Menten* resultou em $K_M = (0,9 \pm 0,3)$ mM e $V_{\max} = (14 \pm 2) \times 10^{-4}$ mM/s. Esses valores são coerentes com o encontrado para Selenocisteínas liase de outros organismos.⁹⁵ A cinética envolvendo *EcCsdB* já havia sido descrita anteriormente, apresentando um valor de $K_M = 2,6$ mM.⁹⁶ Entretanto, essa diferença está relacionada devido ao fato dos experimentos previamente descritos terem sido realizados à 37 °C e na presença de 1 mM de piruvato, em que Esaki e colaboradores monitoraram a formação de alanina.⁹⁶

A cinética caracterizada nesse projeto foi feita a 25 °C, na ausência de piruvato e monitorando-se a formação do produto direto de *EcCsdB*, ou seja, seleneto. Por isso, essa diferença nos valores de K_M . A NifS-like de mamíferos,²⁶ homologa à CsdB bacteriana apresenta um K_M de 9,9 mM, ou seja, 10 vezes acima do valor encontrado para *EcCsdB*. O K_M está relacionado diretamente com a afinidade da enzima pelo seu substrato, ou seja, *EcCsdB* apresenta maior afinidade por Sec se comparada à NifS-like de mamíferos.⁹⁷

Relembrando que uma das hipóteses da via de biossíntese de selenocisteínas em *Bacteria* está diretamente relacionada com a detoxificação do ambiente celular, uma vez que altas doses de selênio levam o organismo à morte. Dessa forma, a via em bactérias deveria ser altamente eficiente, o que pode ser observado para a primeira proteína da via, considerando-se a entrada pelo selênio (Figura 6). Em relação à eficiência, verifica-se que o valor encontrado para *EcCsdB* ($0,77 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) denota a elevada eficiência dessa enzima como já reportado para outras Selenocisteínas liases em diferente organismos.⁹⁸⁻⁹⁹

Analisando todos os experimentos de caracterização biofísica, nota-se que as proteínas são estáveis, e mais ainda, que *EcCsdB* é ativa para a conversão de Sec-seleneto. Essa conversão será importante para os experimentos de interação que são apresentados a seguir.

4.3 Caracterização biofísica da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* *in vitro*

4.3.1 Determinação da constante aparente de interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* através de Espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS), monitorando-se o comprimento de onda referente ao PLP covalentemente ligado ao sítio ativo de *EcCsdB*

Para determinação das constantes de dissociação aparente (K_{Dapp}) entre *EcCsdB* e *EcSelD*, medidas de fluorescência intrínseca (IFS) foram realizadas. Assim, utilizou-se de excitação no comprimento de onda do PLP ($\lambda_{exc} = 423 \text{ nm}$) que está covalentemente ligado na enzima *EcCsdB*. O monitoramento foi feito no máximo de emissão do PLP ($\lambda_{em} = 492 \text{ nm}$).

Para isso, 100 nM de *EcCsdB* foram colocados na cubeta e concentrações crescentes de *EcSelD* foram tituladas. Foram realizadas medidas na ausência de ligantes e também na presença de seleneto (Se^{2-}) e selenocisteína (Sec), em concentração de 1,5 μM para ambos. Para todos os experimentos também havia na cubeta concentrações saturantes (1,5 μM) de ATP e MgCl_2 . Através do ajuste de *Hill* para cada curva de IFS (Figura 30) foi possível determinar as constantes de dissociação aparente, sendo $K_{Dapp} = (19,8 \pm 2,2) \text{ nM}$ para

EcCsdB.EcSelD, $K_{Dapp} = (13,3 \pm 2,4)$ nM para *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻* e $K_{Dapp} = (1,8 \pm 0,4)$ nM para o complexo *EcCsdB.EcSelD.Sec*. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas biológicas e o valor normalizado apresentado corresponde ao valor médio obtido entre os experimentos.

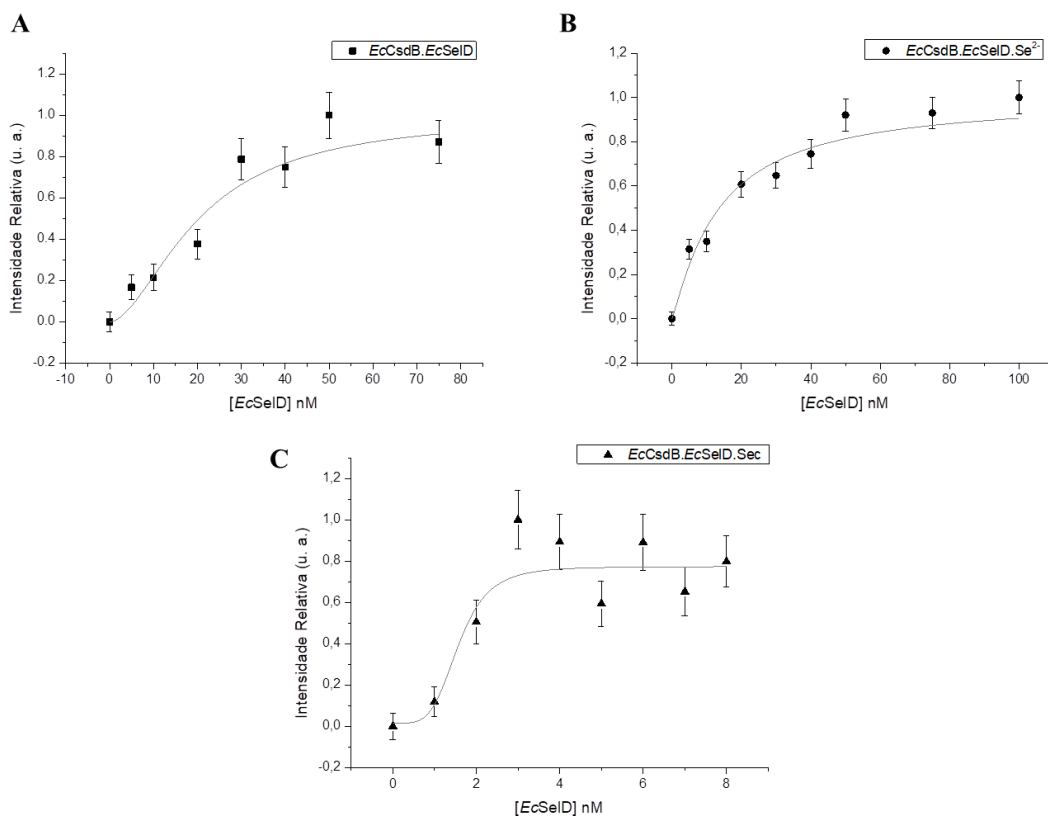


Figura 30 - Medidas de IFS, excitando-se em 423 nm, para a interação *EcCsdB.EcSelD*. Medidas para o complexo na ausência de ligantes (A), na presença de seleneto (B) e na presença de selenocisteína (C). O ajuste de *Hill* resultou em $K_{Dapp} = (19,8 \pm 2,2)$ nM, $(13,3 \pm 2,4)$ nM e $(1,8 \pm 0,4)$ nM, com R^2 de 0,93, 0,97 e 0,90 para os ajustes experimentais para as interações dos complexos *EcCsdB.EcSelD*, *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻* e *EcCsdB.EcSelD.Sec*, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e o resultado apresentado corresponde à média das medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se um aumento da afinidade da interação com a adição dos ligantes da via de selenocisteína, pois $K_D = (1/K_A)$, em que K_D é a constante de dissociação e K_A , a constante de associação. Além disso, observa-se pela primeira vez, a alta afinidade para a formação do complexo binário *EcCsdB.EcSelD* na presença de Sec. Como a selenocisteína é o substrato da *EcCsdB* e este ligante é convertido a seleneto, tem-se que a interação entre as duas proteínas ocorre a fim de proteger a célula em um ambiente com elevadas concentrações do elemento tóxico.

Como já mencionado, a interação *EcCsdB.EcSelD* havia sido proposta em 2009 por Itoh e seus colaboradores,⁵³ entretanto, nunca havia sido demonstrada experimentalmente, até então. As medidas de IFS validam a hipótese existente na literatura e, além disso, indica que a interação ocorre com elevada afinidade, protegendo o ambiente celular da alta reatividade do seleneto. Para corroborar com os valores de constante de dissociação obtidos, medidas de ultracentrifugação analítica foram realizadas.

4.3.2 Determinação das constantes de interação através de Sedimentação em equilíbrio por ultracentrifugação analítica (SE-AUC)

Para compreender melhor o sistema em estudo e validar os valores de constante obtidos pela técnica de IFS, foi realizada uma nova medida através de Ultracentrifugação analítica em equilíbrio de sedimentação (SE-AUC). As medidas de SE-AUC foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC-LNBio/CNPEM).

Três diferentes estequiometrias foram preparadas para os complexos na ausência de ligantes e na presença de seleneto e selenocisteína. Manteve-se constante na cela a enzima *EcCsdB* e foram adicionadas as razões estequiométricas de 0,5; 1,0 e 2,0 de *EcSelD*. Os ligantes foram adicionados em concentrações saturantes, bem como ATP e $MgCl_2$. Os valores das constantes de dissociação obtidos através do ajuste pelo modelo descrito podem ser observados na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – Valores de constantes de dissociação aparente para a interação entre as proteínas *EcCsdB* e *EcSelD* obtidas por Ultracentrifugação analítica – sedimentação em equilíbrio.

Complexos	K_D^1 (nM)	K_D^2 (nM)	K_D^3 (nM)	$K_{D-médio}$ (nM)
<i>EcCsdB.EcSelD</i>	25,1	24,5	23,7	24,4 ± 0,5
<i>EcCsdB.EcSelD.Se²⁻</i>	13,5	15,9	13,8	14,4 ± 0,9
<i>EcCsdB.EcSelD.Sec</i>	2,0	1,8	1,9	1,89 ± 0,07

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 3, os índices numéricos acima do K_D correspondem às diferentes estequiometrias medidas na interação, sendo 1 para razão 1:0,5 de *EcCsdB:EcSelD*, o número 2 para razão 1:1 e por fim, o número 3 para razão de 1:2. O $K_{D-médio}$ corresponde à média aritmética das três estequiometrias diferentes. Para todas as medidas realizadas o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) foi menor que 0,01, indicando um ajuste entre as medidas e o calculado pelo programa *SEDPHAT* utilizando o modelo de interação $A + B = AB$.⁶⁹

Os gráficos de Absorbância_{280nm} x raio (cm) referentes a cada condição analisada podem ser verificados na Figura 31, em que os termos 1, 2 e 3 representam cada uma das janelas de trabalho utilizadas, cada uma correspondendo a uma estequiometria específica.

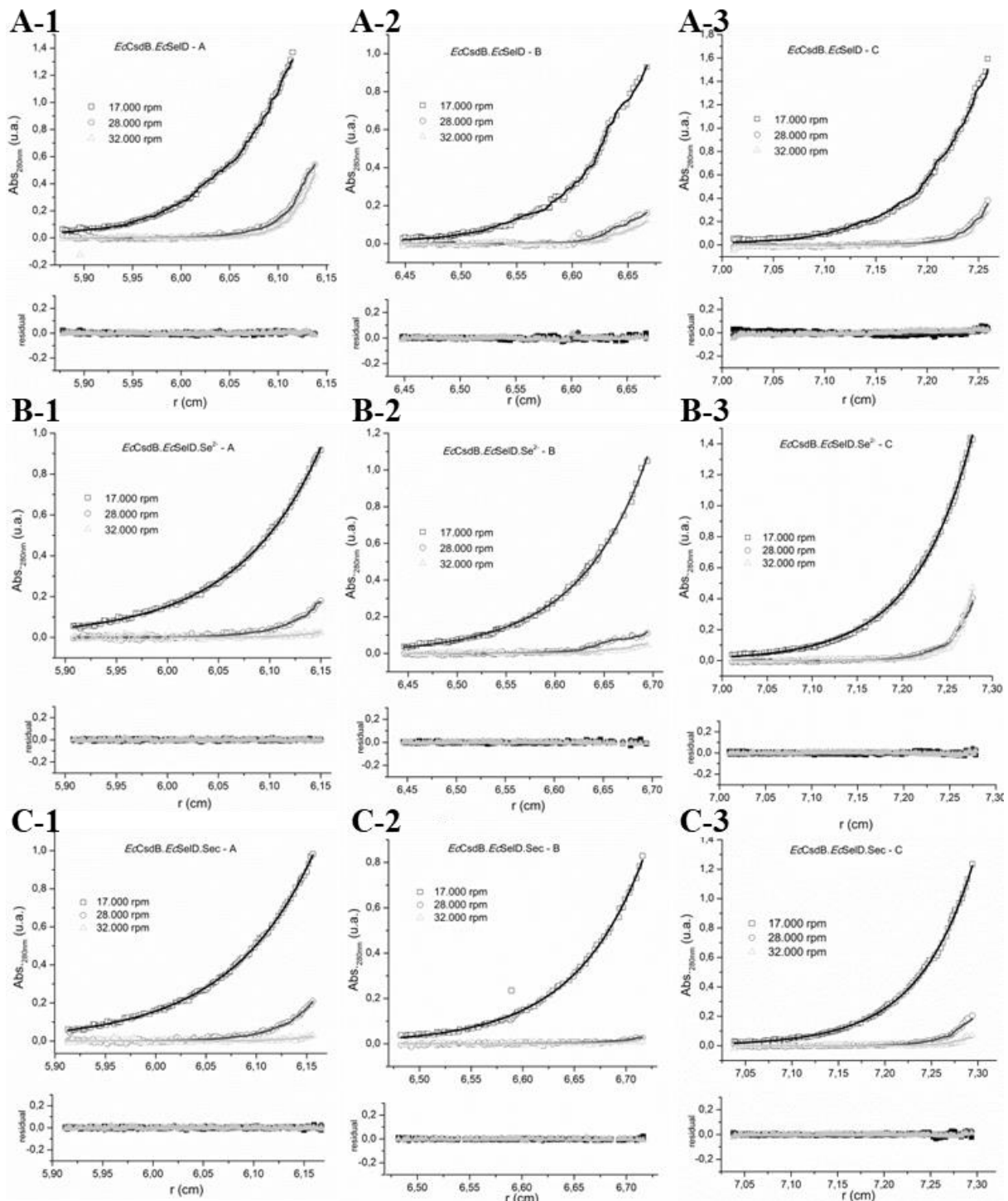


Figura 31 - Gráficos de $Abs_{280nm} \times r$ (cm) obtidos nas análises de Ultracentrifugação analítica em sedimentação em equilíbrio, monitorando-se o comprimento de onda de 280 nm (ANEXO 3). Valores residuais para cada medida podem ser observados na parte inferior de cada curva experimental. 1 corresponde à razão estequiométrica de 1 *EcCsdB*:0,5 *EcSelD*, 2, à razão 1 *EcCsdB*:1 *EcSelD* e por fim, 3, à razão 1 *EcCsdB*:2 *EcSelD* (A) Medidas para o complexo *EcCsdB.EcSelD*, (B) *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻*, e (C) *EcCsdB.EcSelD.Sec*, resultando em $K_{D-médio} = 24,4$ nM, 14,4 nM e 1,8 nM, respectivamente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, podem-se sumarizar na Tabela 4 as constantes obtidas pelas técnicas de IFS e SE-AUC, bem como a discrepância entre os valores determinados por diferentes métodos.

Tabela 4 – Comparativo entre as constantes de dissociação obtidas por diferentes técnicas para os complexos entre as proteínas *EcCsdB* e *EcSelD*.

Complexos	K_D^{IFS} (nM)	$K_{D-m\u00e9dio}^{SE-AUC}$ (nM)	Discrep\u00e2ncia (%)
<i>EcCsdB.EcSelD</i>	19,8 ± 2,2	24,4 ± 0,5	18
<i>EcCsdB.EcSelD.Se²⁻</i>	13,3 ± 2,4	14,4 ± 0,9	7
<i>EcCsdB.EcSelD.Sec</i>	1,8 ± 0,4	1,89 ± 0,07	2

Fonte: Elaborada pela autora.

Verifica-se que as t\u00e9cnicas de ultracentrifuga\u00e7\u00e3o anal\u00edtica e fluoresc\u00eancia intr\u00ednseca do PLP indicam alta afinidade para a forma\u00e7\u00e3o do complexo bin\u00e1rio, dado os valores de K_{Dapp} s observados serem inferiores a 50 nM. Al\u00e9m disso, verifica-se baixa discrep\u00e2ncia entre os dados obtidos por t\u00e9cnicas distintas, indicando a concord\u00e2ncia nos valores de constantes obtidos.

Recordando que o seleneto \u00e9 altamente citot\u00f3xico por ser extremamente reativo. \u00c9 poss\u00edvel observar uma diminui\u00e7\u00e3o no valor da constante de dissocia\u00e7\u00e3o para *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻* quando comparada ao complexo na aus\u00eancia de ligantes. Esse efeito pode ser compreendido pelo aumento da afinidade da intera\u00e7\u00e3o a fim de proteger o ambiente celular da elevada citotoxicidade apresentada por compostos selenados. Ademais, verifica-se que com a adi\u00e7\u00e3o de selenociste\u00edna, a constante de dissocia\u00e7\u00e3o aparente diminui na m\u00e9dia em 13 vezes quando comparada ao complexo sem adi\u00e7\u00e3o de ligantes, tamb\u00e9m indicando uma afinidade para a forma\u00e7\u00e3o desse complexo macromolecular.

Uma vez que a enzima *EcCsdB* catalisa a rea\u00e7\u00e3o de convers\u00e3o de Sec a seleneto, tem-se que, ao final da rea\u00e7\u00e3o a enzima *EcSelD* deva estar receptiva ao seleneto.²⁶ Deste modo, protegendo o ambiente celular contra o produto formado pela a\u00e7\u00e3o da Selenociste\u00edna liase. Como o seleneto \u00e9 o produto final da rea\u00e7\u00e3o catalisada pela *EcCsdB*, n\u00e3o h\u00e1 como saturar a rea\u00e7\u00e3o para que se ligue ao seu produto final, uma vez que este deve ser desligado desta prote\u00edna e ser transferido para *EcSelD*. Assim, explica-se a redu\u00e7\u00e3o do K_{Dapp} para o complexo na presen\u00e7a de seleneto al\u00e9m da redu\u00e7\u00e3o significativa no valor da constante de dissocia\u00e7\u00e3o que ocorre na presen\u00e7a de selenociste\u00edna.

4.3.3 Análise da estabilidade térmica das proteínas na formação do complexo através de Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas a fim de se avaliar a estabilidade térmica do complexo formado. A temperatura de *melting* de cada uma das amostras isoladas foi utilizada como referência para analisar a variação de temperatura de *melting* (ΔT_m) do complexo binário. A Figura 32 ilustra os termogramas das proteínas individuais e do complexo.

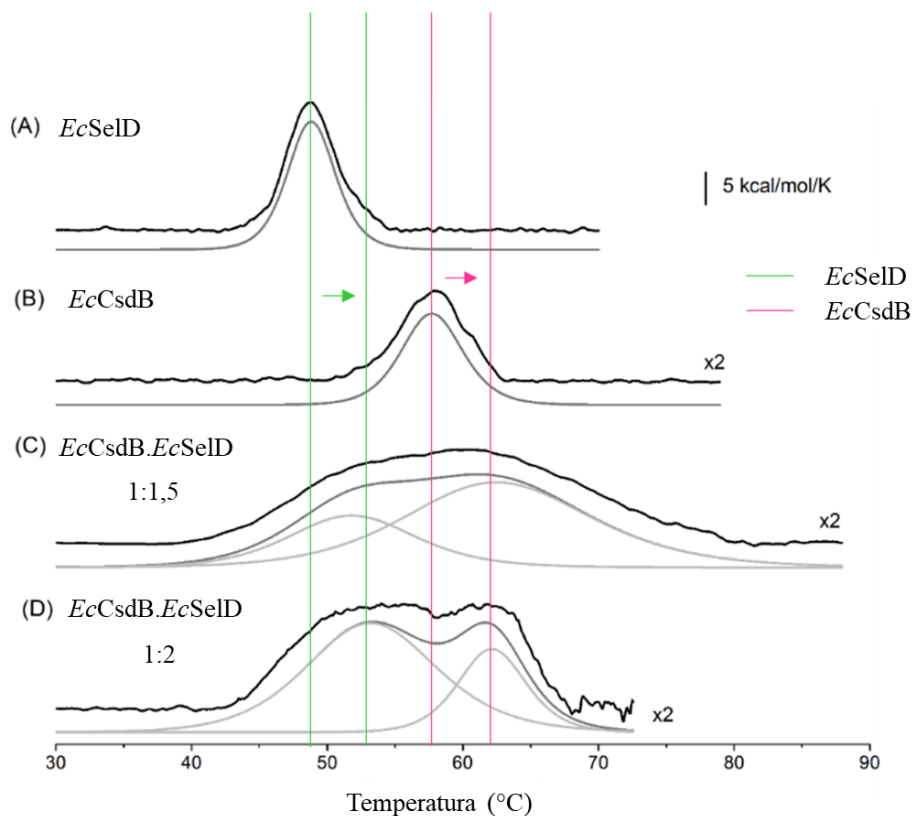


Figura 32 - Termogramas de DSC obtidos para (A) *EcSelD*, (B) *EcCsdB* e para o complexo binário na estequiometria de *EcCsdB* 1 : 1,5 *EcSelD* (C) e *EcCsdB* 1 : 2 *EcSelD* (D). Em preto, tem-se a curva experimental e, em cinza, o ajuste pelo modelo de não dois estados. A maior sobreposição do termograma para o complexo indica a formação do complexo. A linha em verde corresponde à T_m de *EcSelD* e a linha em rosa, de *EcCsdB*. As setas indicam um deslocamento da T_m , para temperaturas maiores, indicando maior estabilidade térmica. Os experimentos realizados em duplicata estão indicados com x2.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (UCSD-EUA).

A maior sobreposição do termograma para o complexo indica a interação proteína-proteína. Para investigar a contribuição de cada uma das amostras para a estabilidade térmica do complexo, foi realizada uma deconvolução dos termogramas utilizando o modelo não-dois-estados. Os valores experimentais e os melhores ajustes estão resumidos na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 – Parâmetros termodinâmicos associados às transições de desnaturação proteica. Temperatura de *melting*, T_m , variação de entalpia, ΔH_{cal} , obtidos da análise dos termogramas pelo programa *MicroCal DSC Origin*[®]. Os dados experimentais foram ajustados a uma das proteínas (*EcCsdB* ou *EcSelD*, individuais) ou às duas proteínas (complexo *EcCsdB.EcSelD*), considerando-se um modelo de desnaturação do tipo não-dois-estados.

Amostra	Razão Molar	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)
<i>EcSelD</i>	–	$48,8 \pm 0,1$	92 ± 7
Ajuste	–	$48,8 \pm 0,1$	92 ± 8
<i>EcCsdB</i>	–	$57,9 \pm 0,1$	53 ± 7
Ajuste	–	$57,9 \pm 0,1$	54 ± 8
<i>EcCsdB. EcSelD</i>	1:1,5	–	179 ± 13
<i>Ajustecomp 1</i>	–	$51,9 \pm 0,4$	54 ± 9
<i>Ajustecomp 2</i>	–	$62,7 \pm 0,3$	130 ± 10
<i>EcCsdB. EcSelD</i>	1:2	–	158 ± 12
<i>Ajustecomp 1</i>	–	$53,3 \pm 0,4$	118 ± 10
<i>Ajustecomp 2</i>	–	$62,2 \pm 0,4$	47 ± 8

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com o Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (UCSD-EUA).

Nota-se que a variação de temperatura de *melting* das proteínas aumenta por 3-4 °C na formação do complexo, indicando maior estabilidade térmica para os componentes individuais quando estes estão em complexo. A variação de entalpia, ΔH_{cal} , da transição do complexo mostra-se ser maior que a soma dos componentes individuais, independentemente da razão molar. Esse resultado indica que mais calor está envolvido no processo, o que pode estar relacionado com o calor de dissociação do complexo e o calor de desnaturação térmica de cada uma das amostras.

4.3.4 Obtenção dos parâmetros termodinâmicos da formação do complexo binário através de Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Para obter os parâmetros termodinâmicos da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD*, experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram realizados. Os ensaios de injeção única foram realizados a fim de se obter a variação de entalpia aparente da interação (ΔH_{ap}). O resultado do experimento de injeção única pode ser visualizado a seguir (Figura 33).

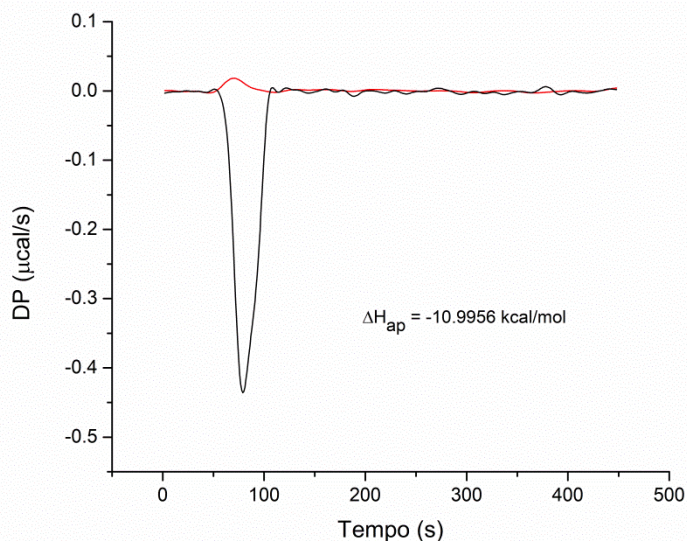


Figura 33 – Determinação da variação de entalpia aparente (ΔH_{ap}) da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD*, utilizando injeção única de 8μ L de *EcCsdB* na *EcSelD*. Em vermelho, tem-se o calor de diluição de *EcCsdB* no tampão KPB-150 NaCl. Este valor foi subtraído do valor da variação de entalpia, representada pela curva em preto. O tratamento dos dados resultou em $\Delta H_{ap} = -11$ kcal/mol.

Fonte: Elaborada pela autora.

A determinação da variação de entalpia aparente de interação resultou em $\Delta H_{ap} = -11$ kcal/mol. Observa-se, pela curva preta, uma variação exotérmica na interação entre *EcCsdB* e *EcSelD*. Além disso, tem-se que a titulação de *EcCsdB* em tampão possui uma contribuição endotérmica, curva em vermelho. Com os dados de interação obtidos, tem-se que $\Delta G_{ap} = -15,92$ kcal/mol para o sistema interagente à 25°C . De acordo com a equação termodinâmica da energia livre de Gibbs (Equação 1).¹⁰⁰

$$\Delta G_{ap} = \Delta H_{ap} - T\Delta S_{ap} \quad (1)$$

Em que ΔG_{ap} corresponde à energia livre de *Gibbs* aparente, ΔH_{ap} , a variação de entalpia aparente e ΔS_{ap} , a variação de entropia aparente. T é a temperatura na qual foram realizados os experimentos (298 K). A partir desta equação foi possível a determinação das seguintes contribuições para a formação do complexo binário (Figura 34).

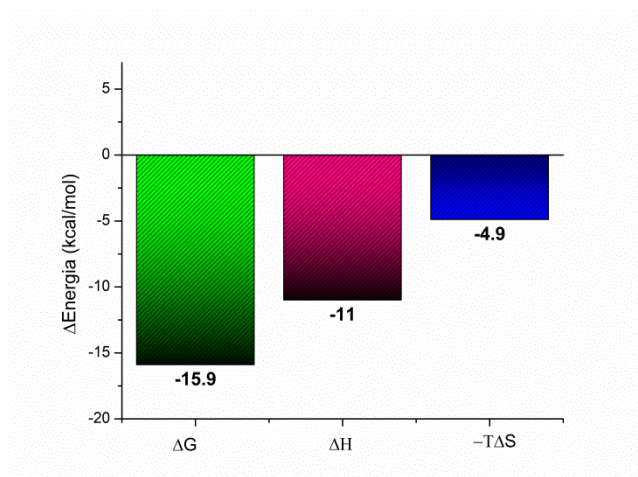


Figura 34 – Perfil termodinâmico da interação *EcCsdB.EcSelD*. Em azul, a variação da energia livre de *Gibbs* da interação, $\Delta G_{ap} = -15,9$ kcal/mol; em vermelho, a variação de entalpia da interação, $\Delta H_{ap} = -11$ kcal/mol; em verde a contribuição entrópica, sendo T a temperatura de análise e $T\Delta S_{ap} = 4,92$ kcal/mol a contribuição entrópica da interação. Observa-se que a interação é, portanto, favorável, uma vez que $\Delta G < 0$ e a maior contribuição é entálpica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como a energia livre de *Gibbs* é negativa, isso indica que a interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* é energeticamente favorável, além disso, a formação do complexo possui grande contribuição entálpica ($\Delta H = -11$ kcal/mol).¹⁰¹⁻¹⁰² Assim, os ensaios calorimétricos indicam há a formação do complexo de maneira favorável energeticamente além de evidenciar a maior estabilidade térmica quando estas estão em complexos.

4.3.5 Análise qualitativa da formação do complexo por co-eluição

Ensaio co-eluição em cromatografia de afinidade foram realizados com a finalidade de avaliar qualitativamente a interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* (Figura 35). Desta forma, a enzima *EcSelD* foi mobilizada na coluna de Ni^{2+} -NTA e após a imobilização passou-se uma solução contendo *EcCsdB* previamente purificada. Os controles de ambas as amostras foram submetidos a mesma eletroforese em gel.

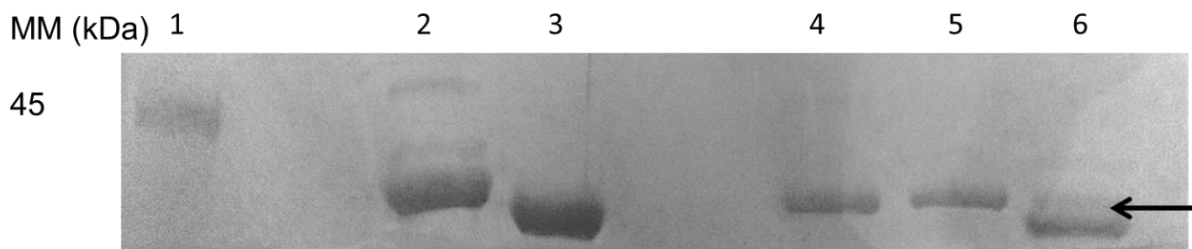


Figura 35 – Ensaio de *pull-down* para a interação *EcCsdB.EcSelD* em SDS-PAGE 8%. Imobilizou-se na coluna de Ni^{2+} -NTA a enzima *EcSelD* e por ela, passou-se uma solução contendo *EcCsdB*. Em seguida, realizou-se uma cromatografia de afinidade com aumento da concentração de imidazol. (1) Marcador molecular (kDa). Os controles foram submetidos a mesma eletroforese em gel, sendo *EcCsdB* (2) com 44,4 kDa e (3) *EcSelD* com 36,6 kDa. (4) fração não interagente à coluna. (5) lavagem com 30 mM de imidazol e (6) eluição com 500 mM de imidazol. Observa-se que grande parte de *EcCsdB* não interagiu, sendo eluída na lavagem. Apesar disso, verifica-se que uma fração de *EcCsdB* interagiu com a *EcSelD*, sendo ambas as amostras co-eluídas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através do gel analisado, verifica-se o tamanho esperado para os controles, sendo 44,4 kDa para *EcCsdB* (canaleta 2) e 36,6 kDa para *EcSelD* (canaleta 3). Nas canaletas 4-6 tem-se a cromatografia de afinidade que foi realizada a fim de se avaliar o complexo. Assim, na canaleta 4 tem-se a fração não interagente à coluna contendo *EcSelD* imobilizada. Na 5, a lavagem com 30 mM de imidazol e por fim, na 6, a eluição com 500 mM de imidazol.

Verifica-se que *EcCsdB* não interagiu totalmente, sendo eluída na fração não interagente e, além disso, uma fração foi eluída no processo de lavagem. Apesar disso, observa-se que uma pequena fração foi eluída juntamente com *EcSelD*, sugerindo que houve a formação do complexo. Acredita-se que parte da *EcCsdB* que foi adicionada ao sistema não interagiu devido ao fato de que a região de *EcSelD* imobilizada na coluna é a região amino-terminal da proteína. Isso é um indicativo de que essa região deva ser crucial para interação, uma vez que a Cys17 catalítica é localizada nesse domínio.

4.3.6 Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)

A fim de se avaliar os parâmetros hidrodinâmicos ao longo da formação do complexo macromolecular, medidas de ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação foram realizadas para *EcSelD*, *EcCsdB* bem como do complexo em razão equimolar foram realizadas. As análises do coeficiente de sedimentação podem ser observadas a seguir (Figura 35).

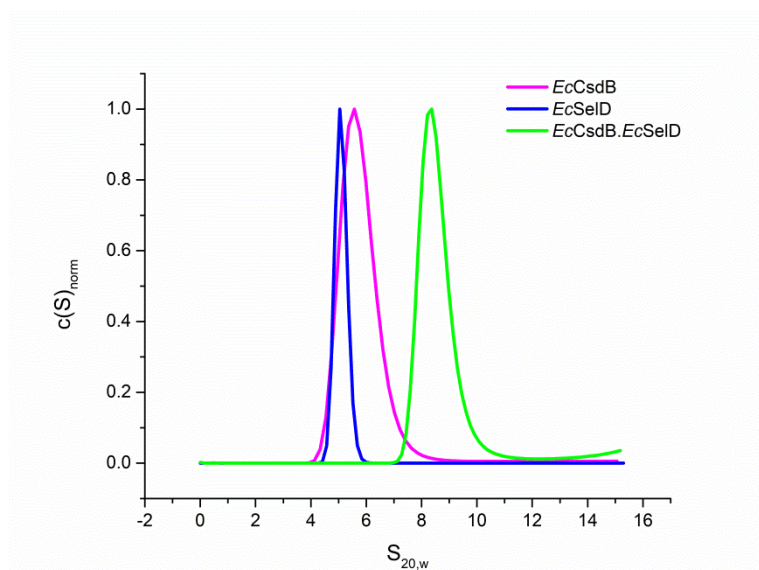


Figura 36 – Análise do coeficiente de sedimentação para *EcCsdB*, *EcSelD* e o complexo formado. O tratamento dos dados através da função de distribuição contínua $c(s)$ resultou em $S_w = 4,90$ S para *EcSelD*, $S_w = 5,64$ S para *EcCsdB* e $S_w = 8,39$ S para o complexo binário. Verifica-se então a formação do complexo, uma vez que ele possui maior coeficiente de sedimentação.

Fonte: Elaborada pela autora.

O ajuste dos dados pelo programa SEDFIT resultou nos parâmetros de coeficiente de difusão (S_w) de 5,64, 4,90 e 8,39 para *EcCsdB*, *EcSelD* e *EcCsdB.EcSelD*, respectivamente. Assim como S_w aumentou, nessa ordem, $S_{20,w}$ também aumentou, uma vez que $S_{20,w}$ é o coeficiente de sedimentação normalizado para o estado padrão da água (Tabela 6).

Tabela 6 – Parâmetros obtidos através da análise de SV-AUC. As variáveis representam: S_w , coeficiente de sedimentação, $S_{20,w}$, coeficiente de sedimentação padrão, MM, massa molecular, R_s , raio de Stokes

Amostra	S_w (S)	$S_{20,w}$ (S)	MM (kDa)	R_s (Å)
<i>EcCsdB</i>	5,64	5,76	89,0	35,6
<i>EcSelD</i>	4,90	5,10	75,6	33,8
<i>EcCsdB.EcSelD</i>	8,39	8,58	163,2	43,6

Fonte: Elaborada pela autora

Em relação à massa molecular obtida, verifica-se novamente que tanto *EcCsdB* como *EcSelD* são diméricas, com massas de 89 kDa e 75,6 kDa, respectivamente, ao se comparar com as massas teóricas dos dímeros de 88,8 kDa e 73,6 kDa.

Analisando o parâmetro R_s , ou raio de Stokes, tem-se que $R_s = 35,6$ Å para a Selenocisteína liase, $R_s = 33,8$ Å para Selenofosfato sintetase e $R_s = 43,6$ Å para o complexo. Comparando com os dados obtidos pelo DLS, tem-se $R_H = (39,5 \pm 8)$ Å para *EcCsdB* e $R_H = (33 \pm 6)$ Å para *EcSelD*, também corroborando com a formação do complexo e resultados em concordância com os obtidos anteriormente.

Além de corroborar com os dados já obtidos, o resultado visto nas medidas de SV-AUC indicam o provável tamanho do complexo, bem como a massa estimada, indicando a estequiometria de 1:1. Este fato será analisado nas medidas de SAXS, uma vez que ela traz informações da massa, tamanho máximo da partícula e raio de giro em solução.

4.4 Caracterização estrutural da formação do complexo binário

4.4.1 Análise da formação do complexo por Microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra por contraste negativo (NS-EM)

Até o momento, não existe um modelo estrutural do complexo binário *EcCsdB.EcSelD*. Por isso, algumas abordagens foram realizadas com a finalidade de compreender estruturalmente a interação entre essas duas proteínas, sendo a primeira delas a microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra em contraste negativo (NS-EM).

O complexo foi preparado na estequiometria 1:1 e as imagens foram coletadas no microscópio FEI TECNAI G2F20 HRTEM (FEI), 200 kV, sendo as imagens gravadas através da câmera TIA TF20. As 20 imagens coletadas foram tratadas utilizando o pacote de programas IMAGIC 4-D,⁷³ não sendo necessária a correção da função de transferência de contraste (*contrast transfer function*, CTF) devido ao baixo contraste e defocagem utilizada nessa coleta (Figura 37).

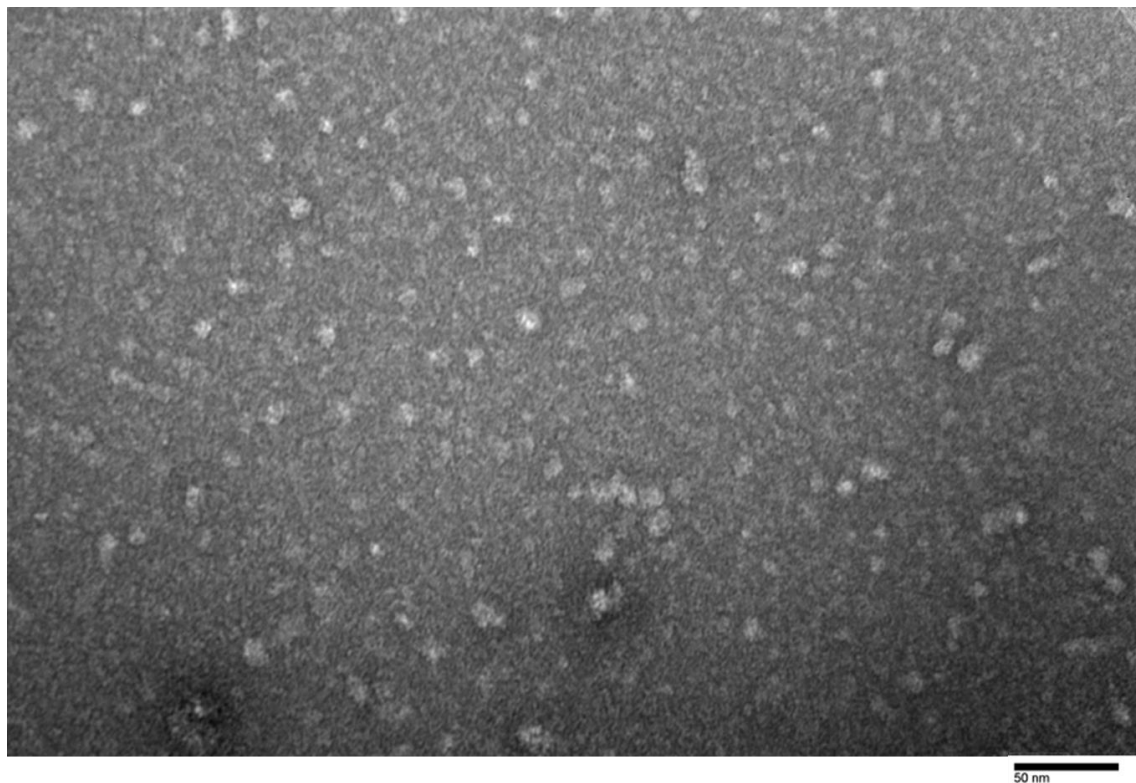


Figura 37 – Visualização do complexo macromolecular *EcCsdB.EcSelD* coletado por NS-EM.
Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com Dr. Vitor Hugo Serrão (*University of Toronto*, Canada).

As partículas foram selecionadas (Figura 38) e centralizadas para análise do tamanho do complexo montado através de método de correlação cruzada utilizando cinco referências selecionadas manualmente, resultando em $(12,7 \pm 0,9)$ nm.

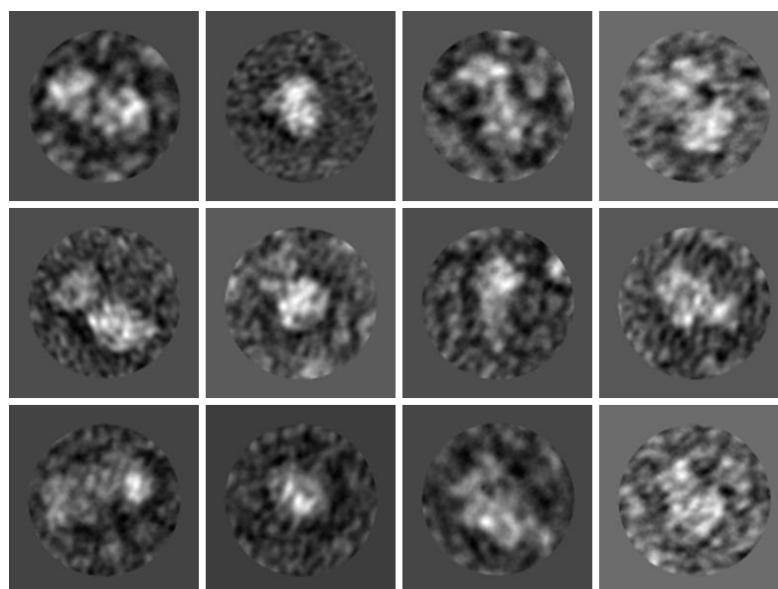


Figura 38 – Seleção de algumas partículas do complexo binário através de NS-EM. A seleção das partículas foi realizada através de método de correlação cruzada utilizando 5 referências manualmente selecionadas, resultando em um conjunto com aproximadamente 200 partículas únicas.
Fonte: Elaborada pela autora, em colaboração com Dr. Vitor Hugo Serrão (*University of Toronto* – Canadá).

Para obtenção do modelo em baixa resolução, mais coletas se fazem necessárias, aumentando assim o número de partículas a serem analisadas permitindo a criação de um modelo estrutural. Dessa forma, fica como perspectiva novas coletas de dados para se ter o processamento completo gerando o modelo por microscopia eletrônica de transmissão.

À fim de obter um modelo estrutural para o complexo binário, experimentos de SAXS foram realizados.

4.4.2 Obtenção do envelope molecular do complexo por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As medidas de SAXS foram conduzidas com a finalidade de se obter o modelo em baixa resolução do complexo *EcCsdB.EcSelD*. Dessa forma, medidas para cada uma das proteínas bem como para o complexo foram realizadas. As curvas de espalhamento experimentais se encontram no ANEXO 4.

Baseado nas curvas experimentais, os *plots* $I(q) \cdot q^4$ vs q^4 , em que $I(q)$ é a intensidade espalhada em função do vetor de espalhamento (q), foram gerados para cada conjunto de dados, permitindo assim a determinação do invariante, ou constante de *Porod*. Esse invariante foi subtraído do conjunto de dados, permitindo a análise de SAXS sem a contribuição da flexibilidade das moléculas em solução. A constante de *Porod* obtida para cada uma das amostras foi $1,2 \times 10^{-4}$ u.a. para *EcCsdB*, $6,1 \times 10^{-5}$ u.a. para *EcSelD* e $1,6 \times 10^{-3}$ u.a. para o complexo binário *EcCsdB.EcSelD*.

A análise da aproximação de *Guinier* (Figura 39) resultou em raio de giro (R_g) de 41,1 Å para o complexo, sendo consistente com os valores esperados para o complexo. Além disso, essas análises resultaram em $R_g = 30,4$ Å para *EcCsdB* e $R_g = 32,7$ Å para *EcSelD*.

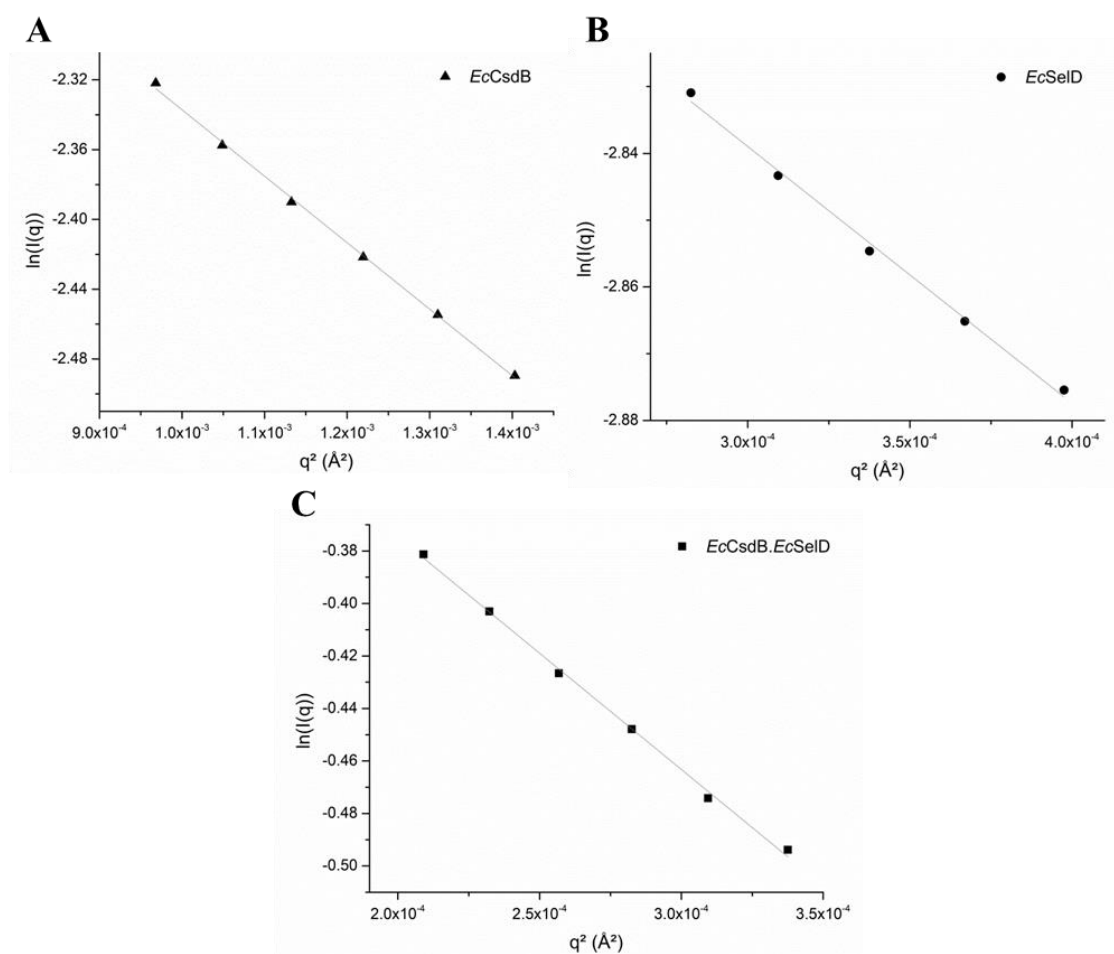


Figura 39 – Aproximação de *Guinier* para (A) *EcCsdB*; (B) *EcSelD* e (C) *EcCsdB.EcSelD*, resultando em $R_g = 30,4$ Å, $R_g = 32,7$ Å e $R_g = 41,1$ Å, respectivamente. Observa-se que o R_g obtido para o complexo é maior em comparação com os homodímeros, indicando formação do complexo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se uma boa aproximação de *Guinier*, pois a função para ângulos pequenos deve ser linear, o que é observado para todas as amostras analisadas.¹⁰³⁻¹⁰⁴ A função de distribuição dos pares, $p(r)$, para o heterocomplexo (Figura 40) apresenta perfil diferente em comparação com os homodímeros.

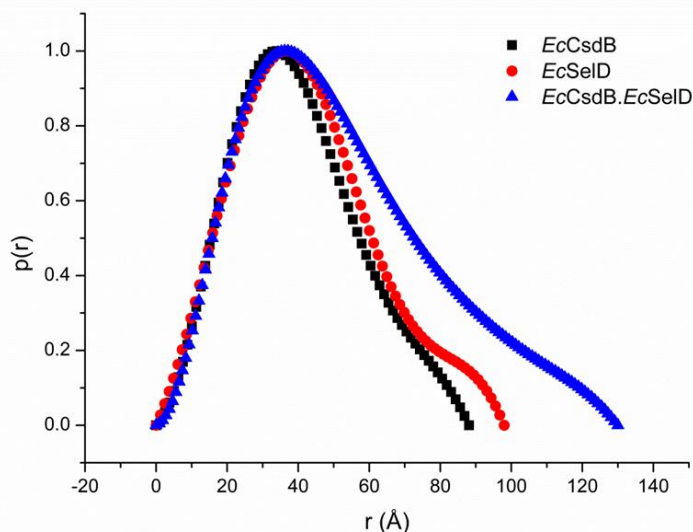


Figura 40 – Função de distribuição dos pares, $p(r)$ das amostras em análise. $p(r)$ obtida para *EcCsdB*, em preto, *EcSelD*, em vermelho e *EcCsdB.EcSelD*, em azul. Em comparação aos homodímeros, verifica-se que D_{max} do complexo binário é maior, indincado a formação do mesmo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se nas curvas de distribuição dos pares que a dimensão máxima da partícula, D_{max} , também se apresentou maior para o complexo em comparação com as proteínas individuais, como esperado. Os valores observados foram: complexo, $D_{max} = 130 \text{ \AA}$, *EcCsdB* $D_{max} = 88,1 \text{ \AA}$ e *EcSelD* $D_{max} = 98 \text{ \AA}$.

As análise em solução também permitiram a determinação da massa calculada pelo servidor SAXSMoW2,¹⁰³ resultando em $(163,2 \pm 1,0) \text{ kDa}$ para o complexo, $(98,7 \pm 25,3) \text{ kDa}$ para *EcSelD* e $(100,9 \pm 13,7) \text{ kDa}$ para *EcCsdB*. O resumo dos parâmetros obtidos por SAXS podem ser visualizados na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 – Parâmetros obtidos pelas medidas de SAXS. Sendo D_{max} , dimensão máxima da partícula e R_g , raio de giro da amostra em solução.

Amostra	D_{max} (Å)	R_g (Å)	Massa molecular (kDa)
<i>EcSelD</i>	98	32,7	$98,7 \pm 25,3$
<i>EcCsdB</i>	88,1	30,4	$100,9 \pm 13,7$
<i>EcCsdB.EcSelD</i>	130	41,1	$163,2 \pm 1,0$

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Tabela 7, resumem-se todos os parâmetros obtidos por SAXS. As massas calculadas pelo servidor SAXSMoW2¹⁰³ indicam que, assim como DLS, tanto *EcCsdB* como *EcSelD* são diméricas em solução, estando de acordo com a literatura,^{38,50} pois a massa teórica do dímero de cada uma delas é de 88,8 kDa e 73,2 kDa, respectivamente, A massa

calculada para o complexo corresponde à massa teórica do heterocomplexo na estequiometria 1:1, sendo de 162 kDa.

Finalmente, os modelos em baixa resolução foram gerados baseados na função de distribuição dos pares, utilizando o programa *DAMMIN*.⁷⁷ Como não existe ainda estrutura cristalográfica do heterocomplexo, um modelo *in silico* foi gerado. Para isso, primeiramente foi necessário obter o modelo de *EcSelD* com N-terminal, uma vez que este foi truncado para resolver a estrutura cristalográfica. Esse passo foi realizado através da ferramenta *I-TASSER*,⁸⁰ em que foi dado como entrada a sequência da proteína e o modelo inicial a estrutura de *EcSelD* (PDB ID 3U00). O modelo da interação foi construído no servidor *HADDOCK*,⁷⁹ em que foram fornecidos os modelos de *EcCsdB* e *EcSelD*, tendo como restrição espacial os resíduos catalíticos das proteínas (*EcCsdB*-Cys364 and *EcSelD*-Cys17). O modelo *in silico* obtido foi ajustado no envelope molecular do complexo (Figura 41A), assim como as estruturas cristalográficas existentes foram ajustadas nos envelopes gerados (Figura 41B e 41C).

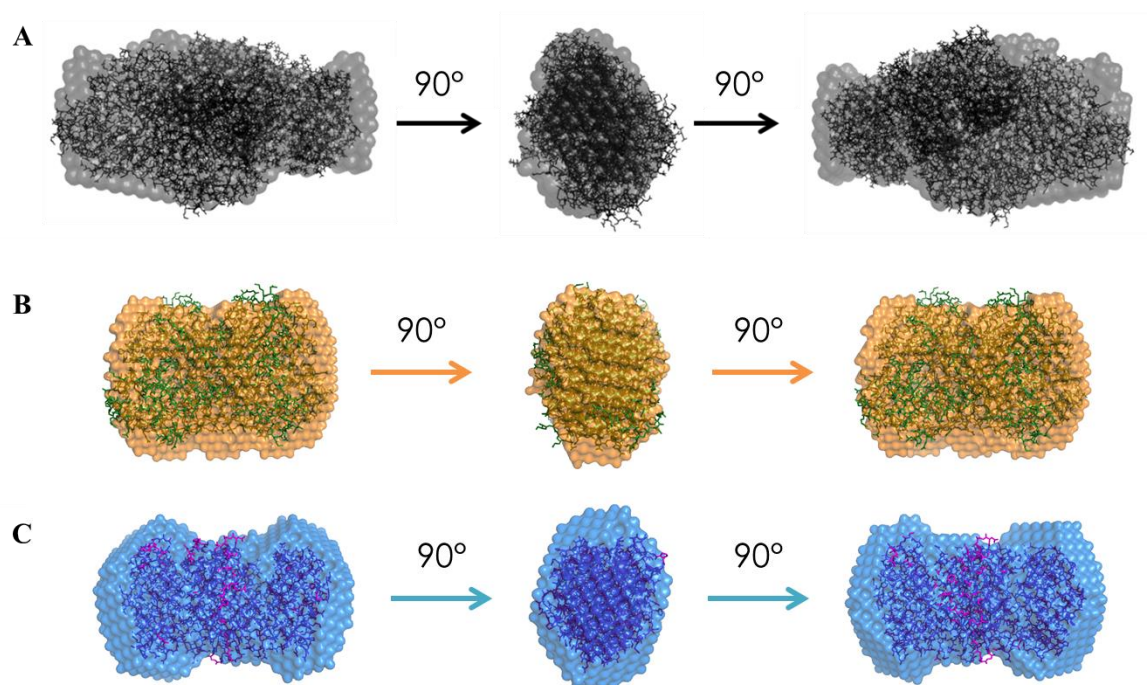


Figura 41 – Modelos *ab initio* de baixa resolução gerados por SAXS para: (A) O complexo binário *EcCsdB.EcSelD*; (B) *EcCsdB* e (C) *EcSelD*. No interior dos envelopes foram ajustados: (A) modelo *in silico* gerado para o complexo, (B) estrutura cristalográfica da Selenocisteína liase (PDB ID 1JF9) e (C) Selenofosfato sintetase (PDB ID 3U00). O envelope para *EcCsdB* e *EcSelD* estão de acordo com as estruturas já depositadas e apresentam-se com eixo de simetria de ordem 2. O modelo gerado para o complexo não apresenta simetria inerente à molécula.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os envelopes moleculares obtidos para cada uma das amostras estão de acordo com o que era esperado, como pode ser observado pelo ajuste satisfatório das estruturas cristalográficas dentro aos envelopes. Além disso, pode-se observar um eixo de simetria de ordem 2 inerente à conformação dimérica em solução para as amostras isoladas. O envelope gerado para o complexo não apresenta simetria interna à molécula, assim como foi visto para o modelo *in silico* previamente construído. Vale ressaltar que a assimetria observada está de acordo com as posições relativas dos sítios catalíticos de cada uma das amostras. Entretanto, para validar essa hipótese, é necessário a obtenção da estrutura em alta resolução do complexo.

A sobreposição dos envelopes moleculares obtidos pode ser visualizada na Figura 42 a seguir.

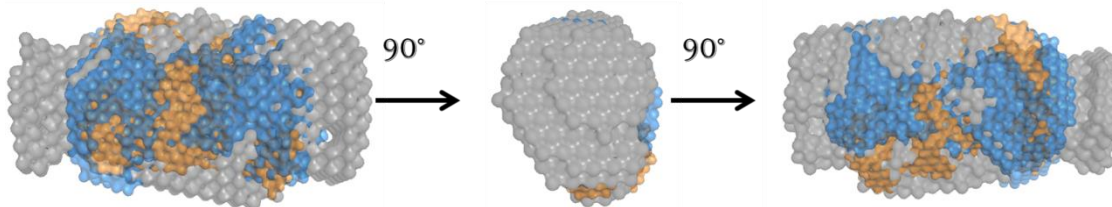


Figura 42 – Sobreposição dos envelopes moleculares obtidos por SAXS. Em cinza, o envelope do complexo binário *EcCsdB.EcSelD*; em laranja, *EcCsdB*; em azul, *EcSelD*. O envelope gerado para o complexo é maior em comparação com os envelopes dos homodímeros, além disso, observa-se que a forma do complexo é menos compacta.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando a sobreposição dos envelopes, é possível observar que o envelope correspondente ao do complexo (cinza) é maior em comparação com os homodímeros (*EcCsdB* em laranja e *EcSelD* em azul). Além disso, a forma do envelope do complexo não é tão compacta como o envelope obtido para as proteínas individuais.

Deste modo, pela primeira vez, tem-se a estrutura em baixa resolução do heterocomplexo formado pelas proteínas Selenocisteína liase e Selenofosfato sintetase. Um resumo de todos os parâmetros obtidos até aqui podem ser observados na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 – Resumo dos parâmetros obtidos através das técnicas de DLS, SV-AUC e SAXS.

Parâmetro	Amostras		
	<i>EcCsdB</i>	<i>EcSelD</i>	<i>EcCsdB.EcSelD</i>
R_s^{DLS} (Å)	39,5 ± 8	33 ± 6	-
R_s^{SV-AUC} (Å)	35,6	33,8	43,6
R_g^{SAXS} (Å)	30,4	32,7	41,1
D_{max}^{SAXS} (Å)	88,1	98	130
Tamanho ^{NS-EM} (Å)	-	-	127 ± 9
MM^{DLS} (kDa)	85,2 ± 16,9	55,0 ± 22,4	-
MM^{SV-AU} (kDa)	89,0	75,6	163,2
MM^{SAXS} (kDa)	100,9 ± 13,7	98,7 ± 25,3	163,2 ± 1,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos de caracterização biofísica realizados indicaram grande similaridade entre os valores obtidos para os parâmetros mostrados na Tabela 8. Sendo assim, encerra-se as análises de caracterização biofísica do complexo resultando em parâmetros com grande grau de confiabilidade e mostrando experimentalmente pela primeira vez a formação do complexo binário entre *EcCsdB* e *EcSelD*.

4.4.3 Obtenção do modelo em alta resolução do complexo por Cristalografia de proteínas

4.4.3.1 Análise da interação do peptídeo sintetizado com *EcCsdB* por Anisotropia de fluorescência (FAS)

Após a síntese dos peptídeos e marcação com fluoresceína, foram realizados ensaios de interação de *EcCsdB* com os peptídeos. Para isso, realizou-se espectroscopia de anisotropia de fluorescência, em que o monitoramento foi feito na sonda utilizada. Os perfis de interação podem ser observados a seguir (Figura 43).

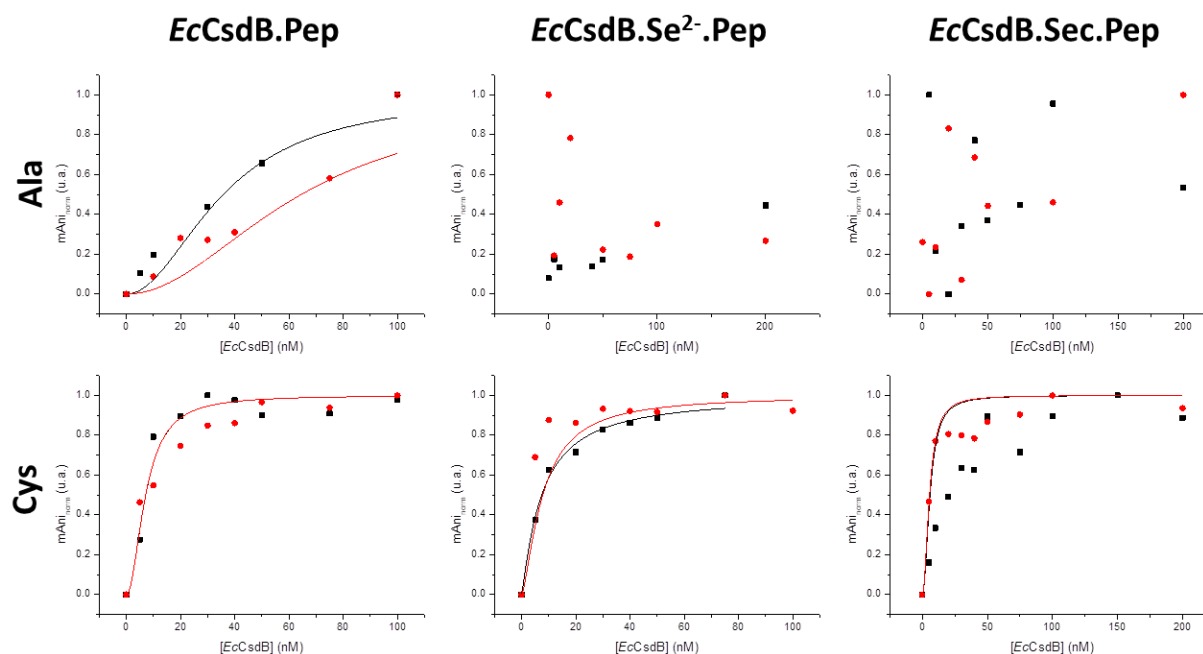


Figura 43 – Espectroscopia de anisotropia de fluorescência de *EcCsdB* com os peptídeos sintetizados. Cys corresponde ao peptídeo contendo a cisteína catalítica de *EcSelD* (Cys17) e Ala corresponde ao controle negativo da interação, no qual o resíduo Cys17 catalítico foi substituído por uma alanina. As medidas foram feitas para os complexos na ausência de ligantes, na presença de seleneto e de selenocisteína. O controle negativo apresentou interação inespecífica pra o primeiro caso (ausência de ligantes), enquanto que para o Pep-Cys, o ajuste de *Hill* revelou uma $K_{Dapp} = 7,2$ nM enquanto que o controle negativo não apresentou perfil de interação juntamente com os substratos de *EcCsdB*. O experimento foi realizado em duplicata biológica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que o controle negativo não apresentou perfil de interação para os complexos na presença de seleneto e selenocisteína. Em relação ao complexo na ausência de ligante, verifica-se um perfil de interação não específico. O peptídeo contendo a cisteína catalítica de *EcSelD* apresentou perfil de interação específica e os valores de constante aparente obtidos através do ajuste de *Hill* podem ser visualizados na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9 – Valores de constante aparente obtidos para interação dos peptídeos.

	K_{Dapp} (nM)		
	<i>EcCsdB.Pep</i>	<i>EcCsdB.Pep.Se²⁻</i>	<i>EcCsdB.Pep.Sec</i>
Pep-Cys (Cys17)	$7,2 \pm 0,2$	$7,6 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,9$
Pep-Ala (Ala17)	inespecífico	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Através dos valores das constantes obtidos, verifica-se que as interações com o peptídeo na ausência de ligantes e na presença de seleneto apresentam praticamente o mesmo valor de constante de dissociação aparente, $K_{Dapp} = (7,2 \pm 0,2)$ nM e $K_{Dapp} = (7,6 \pm 0,6)$ nM, respectivamente. Estes valores indicam alta afinidade, uma vez que ambos estão abaixo de 20

nM. Na presença de selenocisteína o valor da constante é levemente reduzido, $K_{Dapp} = (5,7 \pm 0,9)$ nM, indicando uma maior afinidade para o sistema.

Dessa forma, tem-se que a Cys17 é de grande importância para a interação com a EcCsdB. Como o peptídeo contendo a cisteína catalítica de EcSelD interagiu com elevada afinidade com EcCsdB, ele poderá ser utilizado nos ensaios de cristalização.

4.4.3.2 Verificação de mudanças estruturais, por CD, na EcCsdB quando esta se liga ao peptídeo contendo o resíduo catalítico de EcSelD

Uma vez que observada a interação entre EcCsdB.Pep-Cys por FAS, decidiu-se então por analisar a interação em relação a possíveis alterações no conteúdo de estrutura secundária das amostras. Para isso, experimentos de CD foram realizados para os diferentes complexos (Figura 44).

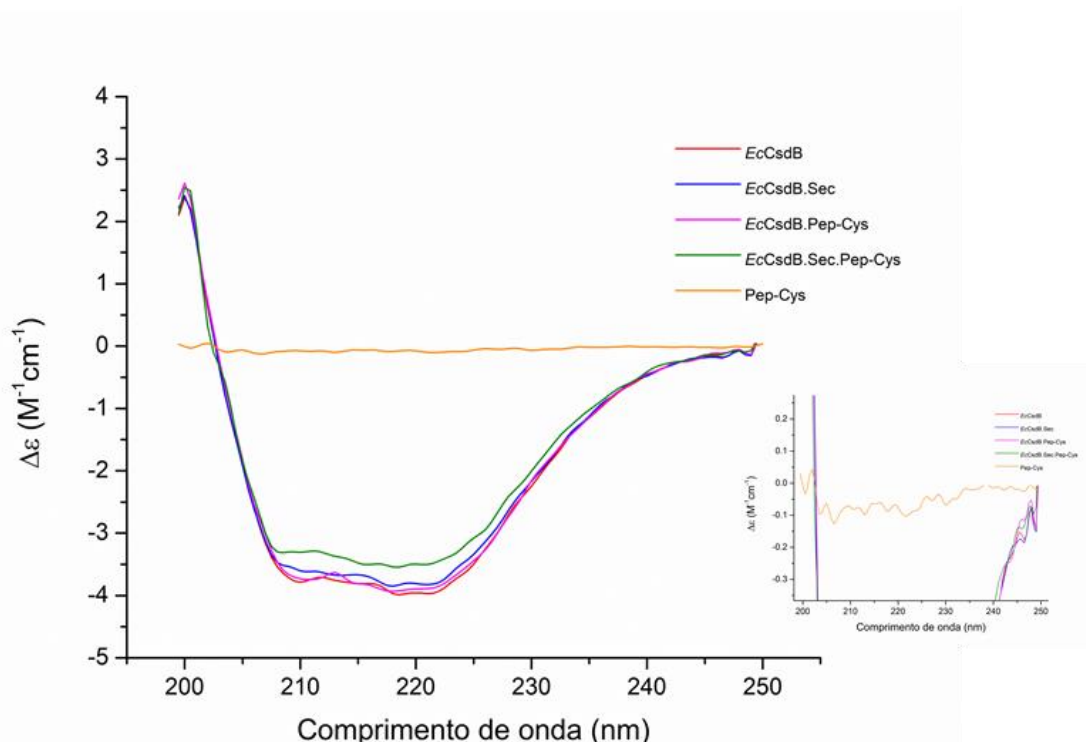


Figura 44 – Espectros normalizados de dicroísmo circular para a interação EcCsdB.Pep-Cys. O peptídeo construído não possui nenhum tipo de enovelamento. Já a proteína apresenta algumas diferenças no espectro quando interage com o peptídeo. Há diminuição do sinal relativo de CD bem como deslocamento dos mínimos, indicando que houve mudanças a nível de estrutura secundária. *Inset:* destaque para o sinal relacionado ao Pep-Cys.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado nos espectros, o peptídeo não apresenta sinal de estrutura secundária. Mesmo assim, ele foi subtraído dos valores obtidos para a proteína. Assim, a

variação do sinal de CD visto, refere-se somente às mudanças que a proteína sofre para poder acomodar o peptídeo em seu sítio ativo. Observa-se que existem algumas mudanças nos espectros de CD quando a proteína *EcCsdB* interage com o peptídeo.

Comparando-se os espectros de *EcCsdB.Sec* e *EcCsdB.Sec.Pep-Cys*, observa-se uma redução no sinal de CD relativo quando ocorre a formação do complexo *EcCsdB.peptídeo* e, além disso, o mínimo em 208 nm apresentar um deslocamento, indicando que está havendo uma mudança de estruturação secundária. Ao se comparar os espectros de *EcCsdB* e *EcCsdB.Pep-Cys*, não se observam mudanças tão significativas como as observadas para o complexo na presença de selenocisteína.

A predição de estruturas secundárias feitas pelo CDPro podem ser visualizadas na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10 – Predição de percentual de estruturas secundárias na interação *EcCsdB.Pep-Cys* na ausência e na presença de selenocisteína. Sendo unrd do tipo não estruturada.

Complexo	α-hélice (%)	fita-β (%)	voltas (%)	unrd (%)
<i>EcCsdB</i>	42,2	16,3	16,3	25,4
<i>EcCsdB.Pep-Cys</i>	42,9	22,3	14,5	20,5
<i>EcCsdB.Sec</i>	39,2	16,9	18,7	26,4
<i>EcCsdB.Sec.Pep-Cys</i>	42	23,6	14,3	19,8

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da predição de estruturas secundárias, é possível observar que na ausência de selenocisteína, o conteúdo de α -hélices não muda significativamente, com uma variação de 0,7%. Entretanto, há um aumento de 6% no percentual de fitas- β . Analisando o percentual de voltas e estruturas não ordenadas (unrd), verifica-se que ambas diminuem quando *EcCsdB* interage com *Pep-Cys*. Por isso, acredita-se que esses o ganho em fitas- β se deve ao ordenamento de parte das estruturas do tipo volta e de não ordenadas.

Analisando o complexo na presença de selenocisteína, verifica-se que *EcCsdB* perde cerca de 3% da estrutura do tipo α -hélice e há um pequeno aumento no percentual das outras estruturas. Entretanto, ao se analisar o complexo com *Pep-Cys* na presença de *Sec*, o percentual de α -hélices torna-se parecido com os outros sistemas. Por isso, acredita-se que a interação com *Pep-Cys* também traga ganho em percentual de α -hélices. Em comparação ao percentual de fitas- β , há um aumento de 6,7% quando *EcCsdB* interage com *Pep-Cys*.

Verifica-se novamente, uma diminuição do percentual de voltas e não ordenadas. Entretanto, essa variação é maior no sistema na presença de selenocisteína, de 11%, enquanto que a variação total no outro sistema é de 6,7%.

Dessa forma, tem-se que o peptídeo sintetizado mostra a importância da Cys catalítica se *EcSelD*. Além disso, ele interage com elevada afinidade com *EcCsdB*, com $K_{Dapp} < 10$ nM e provoca alterações em nível de estrutura secundária na proteína. Por isso ele poderá ser utilizado para os experimentos de co-cristalização e *soaking*.

4.4.3.3 Ensaio de co-cristalização e *soaking* utilizando o Pep-Cys

Após os ensaios de interação com o Pep-Cys e confirmação que o mesmo interage com alta afinidade com a proteína *EcCsdB*, os ensaios de co-cristalização e *soaking* foram realizados a fim de se obter um modelo do complexo binário em alta resolução. Para isso, primeiramente foi feito um *screening* de *EcCsdB* contendo Pep-Cys para avaliar quais condições teriam formação de cristais para otimizar a condição e tentar otimizar os cristais. Entretanto, não foi possível obter um cristal nas condições testadas.

Como foi visto nas medidas de CD, verifica-se que há uma sutil mudança em estruturas secundárias de *EcCsdB* quando esta liga-se ao Pep-Cys. Essa mudança pode alterar a ordem interna do cristal e, assim, dificultar o empacotamento. Dessa forma, é coerente a ausência de cristais formados na interação com Pep-Cys, Cys, mesmo que *EcCsdB* apresente alta cristabilidade.

Por isso, decidiu-se então, realizar o *soaking* utilizando o Pep-Cys.¹⁰⁵ Como o Pep-Cys é relativamente pequeno, contém 9 resíduos de aminoácidos, acredita-se que seja possível que ele adentre os canais do solvente para atingir o sítio ativo da proteína (Figura 45).

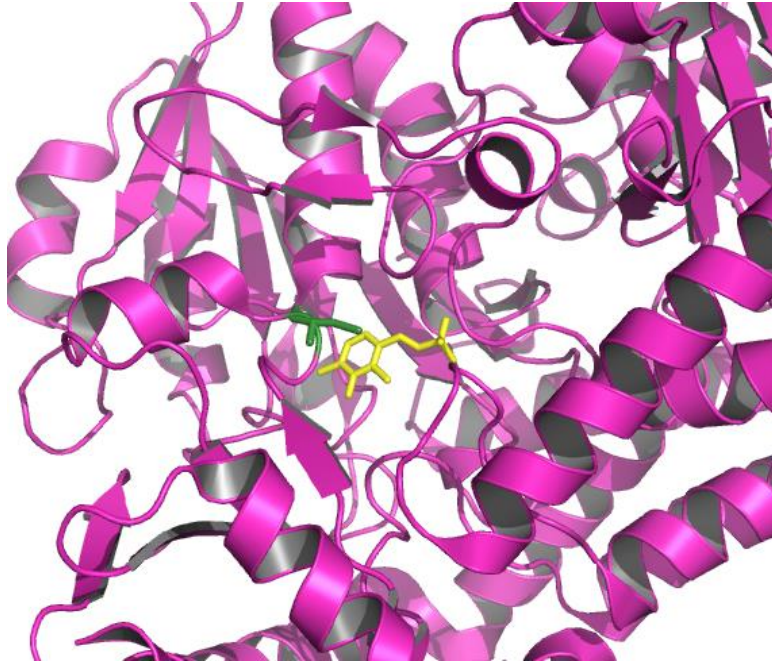


Figura 45 – Estrutura cristalográfica de *EcCsdB*, resolvida por cristalografia de proteínas (PDB ID 1JF9). Destaca-se o acesso ao sítio ativo, em amarelo o PLP ligado no sítio ativo da enzima e, em verde, a posição da Cys364 catalítica. Observa-se que o sítio não encontra-se internalizado na estrutura, sendo, portanto, permitido o acesso do Pep-Cys.

Fonte: Elaborada pela autora.

Desta forma, uma solução de crio-proteção contendo o Pep-Cys foi preparada para que os cristais de *EcCsdB* (Figura 46) fossem estocados em cada gota preparada. O sistema foi deixado em repouso por 1 h a 18 °C para posterior resfriamento em nitrogênio líquido para coleta na linha de luz MX2 (LNLS-Campinas).

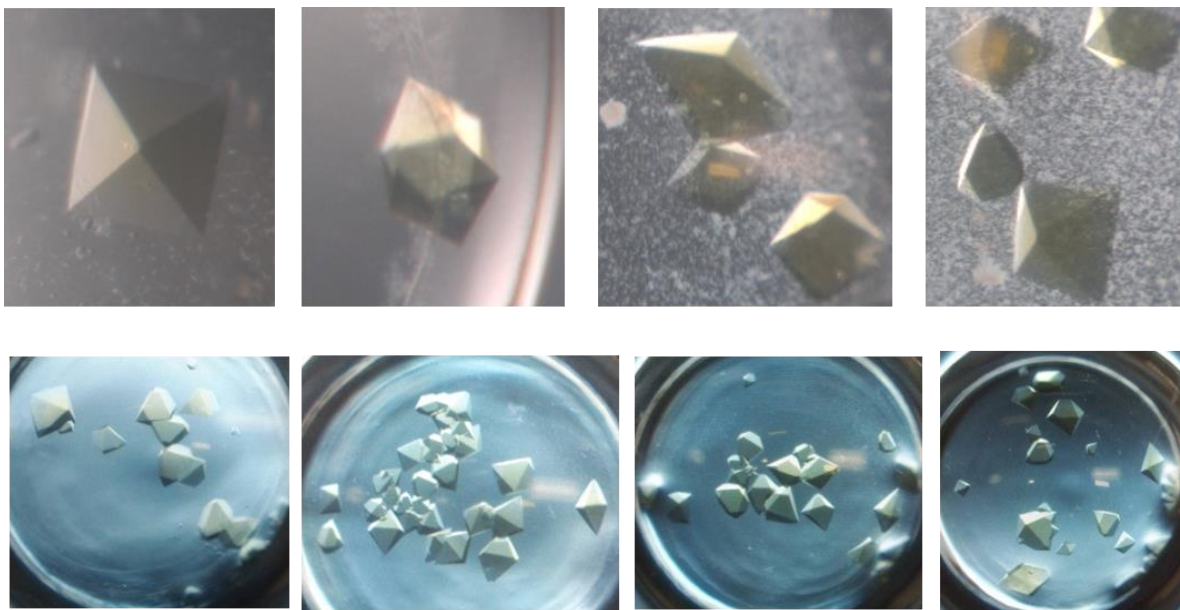


Figura 46 - Cristais de *EcCsdB* produzidos para realização do soaking com Pep-Cys. . Destaca-se a coloração amarelada dos cristais devido a presença do PLP covalentemente ligado à *EcCsdB*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Alguns conjuntos de dados foram obtidos nas resoluções entre 2,2 e 3,4 Å e, após o processamento de dados, verificou-se que não havia densidade correspondente ao Pep-Cys. Dessa forma, novas tentativas de *soaking*, variando-se o tempo e temperatura de incubação bem como a concentração de Pep-Cys adicionado foram realizadas. Após análises iniciais de substituição molecular seguida de um passo de refinamento observou-se uma densidade adicional que pode ser indício da presença do peptídeo junto ao sítio catalítico de *EcCsdB* (Figura 47). Entretanto, verifica-se que a densidade está com ocupância parcial, o que pode ser devido à alta flexibilidade do ligante.

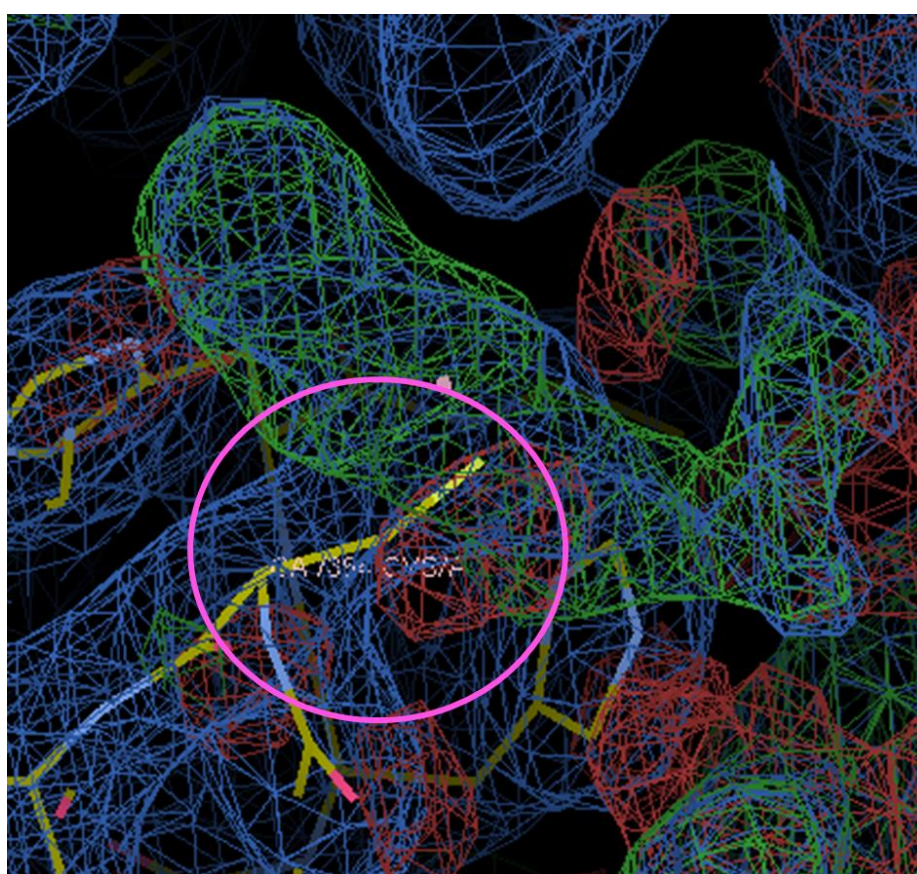


Figura 47 – Densidade eletrônica após primeiro ciclo de refinamento utilizando o programa Phenix. Em destaque a Cys 364 de *EcCsdB*. . Em verde, o mapa Fo-Fc e em azul, o mapa 2Fo-Fc.
Fonte: Elaborada pela autora.

Por isso, o programa PanDDA¹⁰⁶ será utilizado pois este permite um modelamento de regiões de baixa ocupância, como ligações fracas de ligante. É deixado como perspectivas futuras o processamento dos dados para obter o modelo em alta resolução do complexo binário *EcCsdB.EcSelD*.

4.4.3.4 Obtenção da estrutura em alta resolução da Selenocisteína liase de *E. coli*

Ensaio de *soaking* foram realizados e os cristais enviados para coleta na linha de luz I24-MX (*Diamond Light Source*, Inglaterra). Os dados foram processados com os programas XIA2-DIALS e, assim como anteriormente, as estruturas foram resolvidas por substituição molecular utilizando como modelo de busca a estrutura PDB ID: 1JF9 cadeia A.

Foram obtidas 3 estruturas com mesmo grupo espacial $P4_32_12$ e uma delas com a melhor resolução já encontrada no banco de dados. A estrutura foi depositada no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) sob o código de acesso 6DN6. Os dados do processamento podem ser visualizados na Tabela 11 a seguir.

Tabela 11 – Dados do processamento e refinamento da estrutura *EcCsdB* a 1,77 Å

Coleta / λ	I24 -MX DLS / 0,96863 Å
Faixa de resolução (Å)	57,2-1,77 Å
Grupo espacial	$P4_32_12$
Constantes cela a, b, c, α, β, γ	126,52 Å 90°
	126,52 Å 90°
	134,09 Å 90°
Multiplicidade	25,8 (24,7)
R_{pim} (%)	0,032 (0,482)
$CC_{1/2}$	0,999 (0,761)
Completeza	99,8
Reflexões totais	2738917
Reflexões únicas	106193
I/σ (I)	11 (1,0)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,160 / 0,173
B (Å²)	35

Fonte: Elaborada pela autora.

O conteúdo da unidade assimétrica pode ser observado na Figura 48 a seguir.



Figura 48 – Conteúdo da unidade assimétrica de *EcCsdB* colorido N-terminal (azul) para C-terminal (vermelho).

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a estrutura resolvida apresenta enovelamento idêntico ao de selenocisteínas liases, sendo um sanduíche do tipo $\alpha\beta$. Interessantemente, a estrutura resolvida apresentou um íon coordenando os ácidos glutâmicos E95 e E248 presentes na interface dimérica (Figura 49).

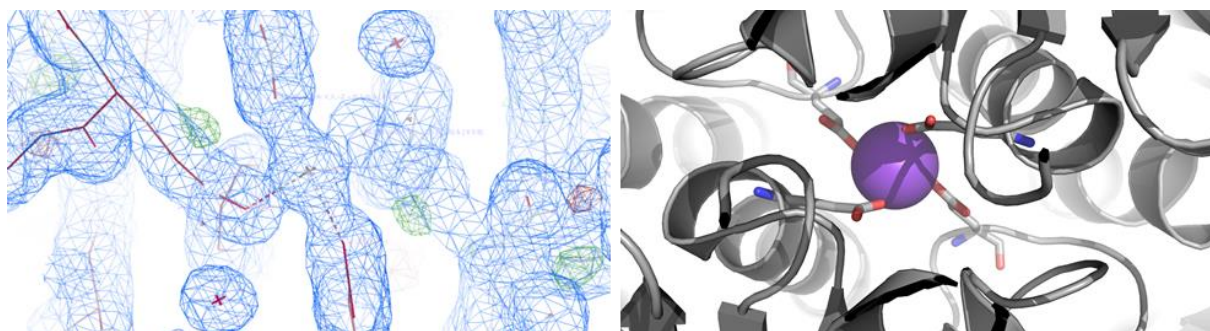


Figura 49 – Destaque para o íon sódio coordenando E 95 e E248. À esquerda: densidade eletrônica indicando a coordenação do íon. À direita: visualização da coordenação pelo programa PyMOL.⁸¹

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resíduos E95 e E248 são coordenados pelo íon Na^+ . A confirmação deste íon se deu através do programa *Check my metal*,¹⁰⁷ o qual avalia a valência bem como distância de ligação. Esse íon não foi reportado em nenhuma outra estrutura já depositada no banco de dados. Por isso, fica a questão se esse íon é importante para a estruturação da proteína ou se ele é um artefato provindo da condição de cristalização, de 4 M de formato de sódio.

A validação dos dados foi realizada através do servidor *MolProbity*¹⁰⁸ e o Diagrama de *Ramachandram* para a estrutura depositada pode ser observado na Figura 50 a seguir.

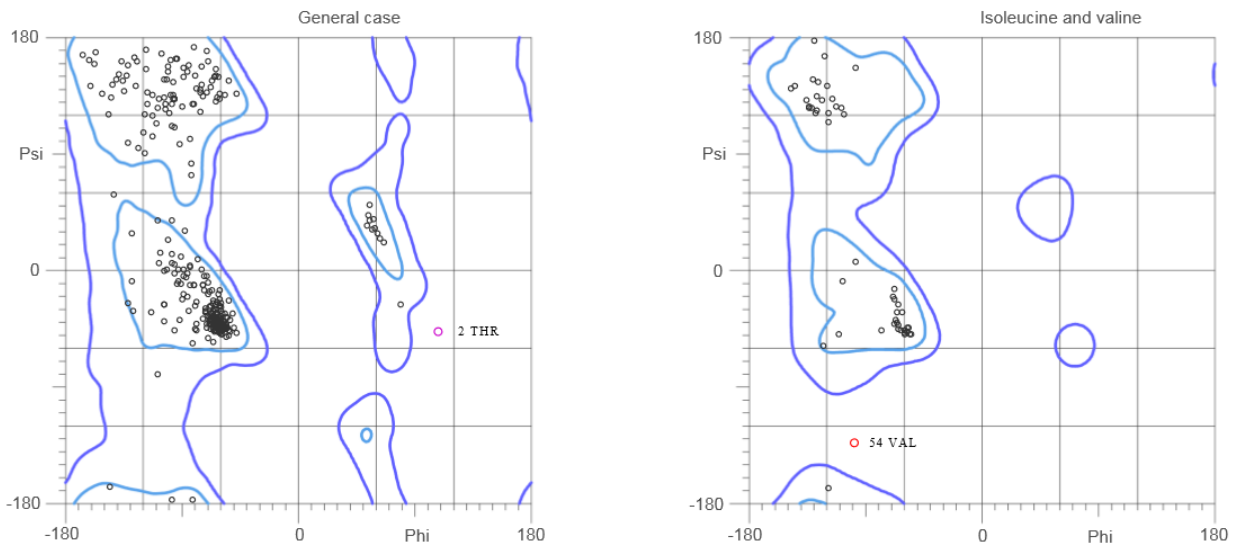


Figura 50 – Diagrama de *Ramachandram* da estrutura depositada no banco de dados (PDB ID 6DN6).
Fonte: Elaborada pela autora.

Através do diagrama de *Ramachandram*, verifica-se que 97,8% dos resíduos estão em regiões favoráveis e 99,5% estão em regiões permitidas. Existem apenas dois resíduos em regiões não permitidas que são Thr2 e Val54. Dessa forma, temos um modelo confiável em alta resolução, de 1,77 Å, sendo a melhor resolução até o momento para a Selenocisteína liase de *E. coli*.

4.4.3.5 Obtenção do modelo de interação por cristalografia de proteínas

Com a finalidade de se obter o modelo em alta resolução da *EcCsdB* contendo o peptídeo em seu sítio catalítico, novos ensaios de *soaking* foram realizados utilizando concentrações elevadas do peptídeo em até 10X acima à concentração de *EcCsdB* utilizada. Além disso, o tempo de *soaking* foi aumentado para 2-3 h e os cristais coletados na linha de luz MX2-LNLS (CNPEM).

Os dados foram tratados conforme descrito anteriormente, a uma resolução de 2,4 Å. A densidade correspondente ao peptídeo pode ser observada na Figura 51 a seguir.

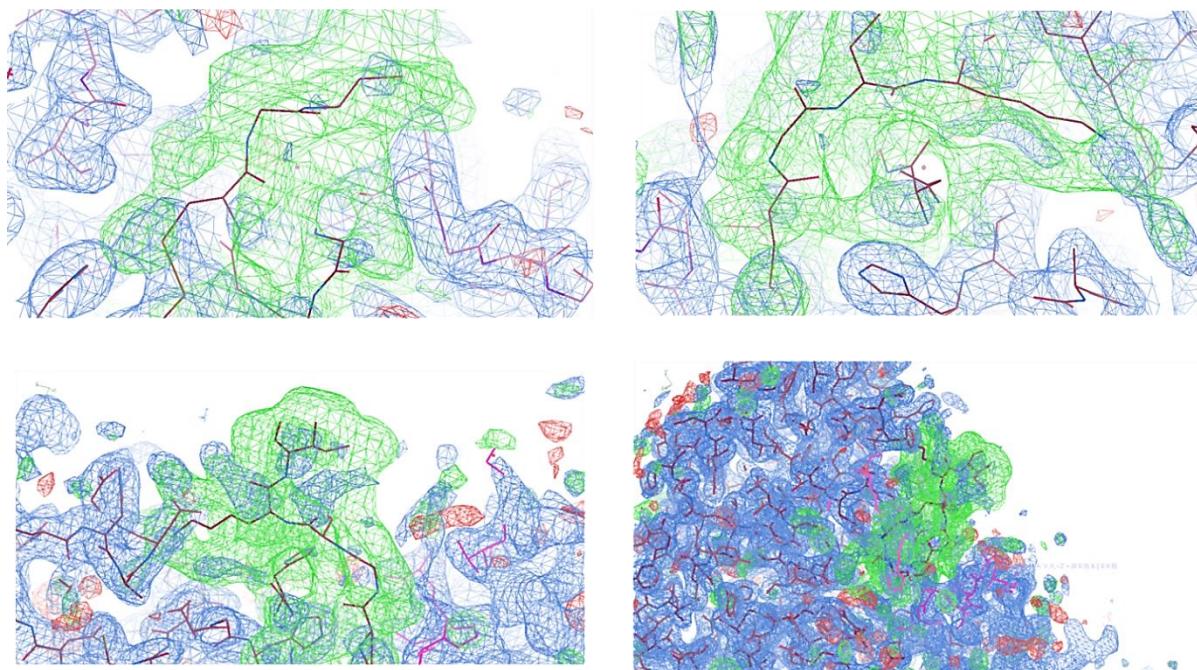


Figura 51 – Visualização da densidade correspondente ao peptídeo. Em verde, o mapa Fo-Fc e em azul, o mapa 2Fo-Fc.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através da densidade mostrada acima, observa-se, pela primeira vez, como é o posicionamento do peptídeo junto ao sítio catalítico de *EcCsdB*, representado pela densidade em verde. Conforme esperava-se pela literatura,³⁸ o domínio amino-terminal de *EcSelD* dobra-se a fim de encaixar no sítio catalítico de *EcCsdB*, aproximando assim, as cisteínas catalíticas, sendo C17 de *EcSelD* e C364 de *EcCsdB*. Os dados do processamento podem ser visualizados na Tabela 12 a seguir.

Tabela 12 - Dados do processamento e refinamento da estrutura *EcCsdB* contendo o peptídeo em seu sítio ativo.

Coleta / λ	MX2 - LNLS / 1,5406 Å
Faixa de resolução (Å)	46,12 – 2,40 Å
Grupo espacial	P4 ₃ 2 ₁ 2
Constantes cela a, b, c, α, β, γ	126,53 Å 90°
	126,53 Å 90°
	134,76 Å 90°
Multiplicidade	30,3 (18,4)
R_{pim} (%)	0,052 (0,642)
CC_{1/2}	0,997 (0,459)
Completeza	99,5
Reflexões totais	1308170
Reflexões únicas	43142
I/σ (I)	12,5 (1,2)
R_{work} / R_{free}	0,20 / 0,22
B (Å²)	40,8

O refinamento dos dados resultou em $R_{\text{work}} = 0,19$ e $R_{\text{free}} = 0,22$, indicando que os dados não estão tendenciosos. Além disso, o B-fator médio resultou em 40,8 Å², sendo este mais elevado para o peptídeo, como esperado, uma vez que o peptídeo apresenta elevada flexibilidade.

Devido a esta alta flexibilidade, observa-se uma densidade grande para o encaixe do peptídeo, não sendo possível afirmar de fato a posição atômica de cada um dos seus átomos. Apesar disso, temos pela primeira vez, a demonstração de como é o posicionamento do domínio amino-terminal de *EcSelD* para a entrega de compostos de selênio.

Uma alternativa para minimizar a flexibilidade é a utilização de ATP γ S, uma vez que este peptídeo, além de conter o resíduo catalítico, também contém o sítio de ligação ao ATP. Sendo assim, fica como perspectivas a otimização desta estrutura visando a minimização da flexibilidade do peptídeo.

4.5 Demonstração da interação em sistema *in vivo*

4.5.1 Clonagem dos genes *csdB* e *selD* de *E. coli* nos vetores isca (pGBKCg) e presa (pGADCg)

Uma das técnicas amplamente utilizada para caracterizar interações do tipo proteína-proteína *in vivo* é a técnica de duplo híbrido dirigido. Ao longo deste trabalho, diversas técnicas foram empregadas para a caracterização da interação *in vitro* e, para corroborar com os dados previamente estabelecidos, fez-se necessários experimentação *in vivo*.

Primeiramente, as amplificações ocorreram a partir de uma alíquota de DNA genômico e o resultado da PCR pode ser observado abaixo (Figura 52A). Após essa etapa, foi feita uma segunda PCR, utilizando como DNA molde o produto da PCR da primeira reação (Figura 52B). A segunda PCR é feita com a finalidade de completar as sequências *attB* que flanqueiam o gene de interesse para a posterior recombinação com o vetor de entrada, pDONR²²¹ (ThermoScientific).

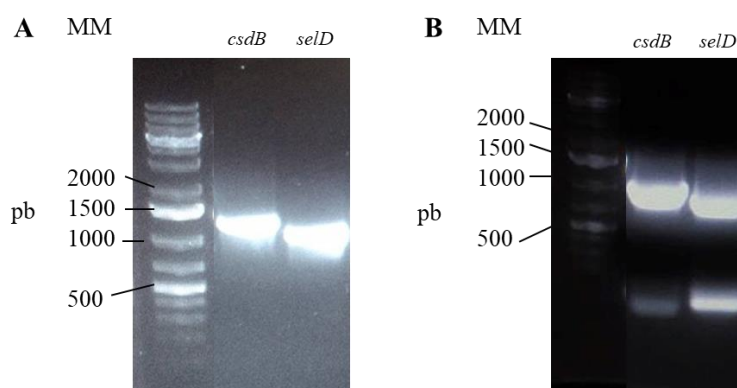


Figura 52 - Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da amplificação dos genes *csdB* e *selD* de *E. coli* para clonagem através de sistema *gateway*. (A) Amplificação a partir de uma alíquota de DNA genômico. (B) amplificação utilizando como DNA molde o produto da primeira PCR. Verifica-se que as bandas possuem tamanho esperado (1221 pb para *csdB* e 1044 pb para *selD*).

Fonte: Elaborada pela autora.

Como mencionado anteriormente, para a clonagem nos vetores de destino através do sistema *gateway*, é preciso realizar a clonagem no vetor doador. Para o sistema utilizado, o vetor doador foi o pDONR²²¹, o qual foi gentilmente cedido pela Prof. Dr. Maria Helena Goldmann (Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP Ribeirão Preto).

Desta forma, as clonagens no vetor de entrada foram realizadas conforme as instruções do kit *BP Clonase* (ThermoScientific). Após a clonagem e obtenção do DNA plasmidial, as amostras foram confirmadas por sequenciamento antes de serem clonadas nos vetores de

destino. Para clonagem nos vetores de destino (pGADCg e pGBKCg) foi utilizado o kit *LR clonase* (ThermoScientific). Como ambos os vetores possuem em seu cassete de clonagem um gene *ccdB*, este permite com que haja uma seleção negativa da recombinação, ou seja, quando crescem colônias, significa que a recombinação ocorreu. Os vetores fechados só crescem em cepa *ccdB* resistente.

Além da confirmação mencionada acima, as amostras foram analisadas por sequenciamento e uma PCR também foi realizada com finalidade de verificar os clones contendo os genes de interesse (Figura 53A e 53B).

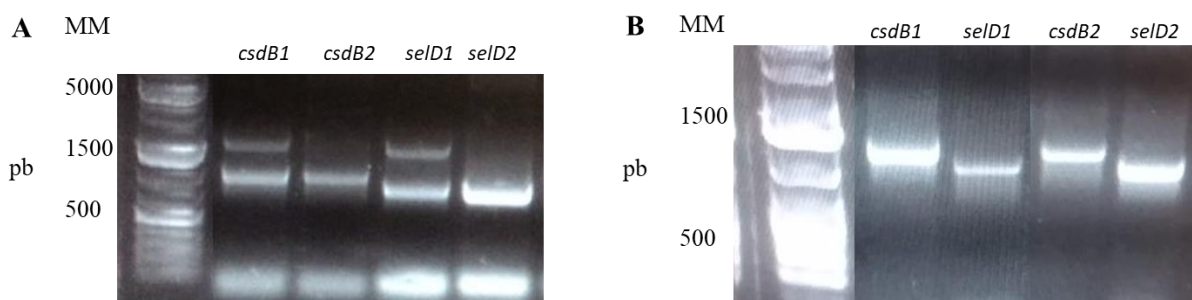


Figura 53 – Gel de agarose 1% para confirmação da recombinação dos vetores de entrada com os vetores de destino, gerando os clones de expressão. (A) PCR de confirmação dos genes *csdB* e *selD* no vetor pGBKCg. (B) PCR de confirmação dos genes *csdB* e *selD* no vetor pGADCg. Os números acompanhando o nome dos genes correspondem a cada uma das colônias testadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observam-se em ambos os géis de agarose as bandas correspondentes a cada um dos genes com o tamanho esperado (1221 pb *csdB* e 1044 pb *selD*). Verifica-se, também, que ambos os genes de interesse foram recombinados no clone de expressão. Dessa forma, eles podem ser utilizados para os ensaios em levedura utilizando o sistema *S. cerevisiae*.

4.5.2 Teste de ativação do gene repórter *HIS3* para detecção da interação

A técnica do duplo híbrido dirigido se baseia no princípio de que o fator de transcrição pode ser separado fisicamente nos seus domínio de ativação e domínio de ligação ao DNA. Assim, quando há a interação entre duas proteínas, os domínios são aproximados fisicamente e ocorre a transcrição do gene repórter. A linhagem *S. cerevisiae* Mav203 possui 3 genes repórteres: *lacZ*, *HIS3* e *URA3*. Para interação *csdB.selD* de *E. coli* avaliou-se a transcrição do gene repórter *HIS3*.

Para isso, concentrações crescentes de 3-AT foram adicionadas nas placas contendo meio SD-WLH. O 3-AT atua como inibidor competitivo da proteína his3p, reduzindo o

escape da expressão e converte fosfato glicerol imidazol em um intermediário na rota de síntese de histidina, o fosfato acetol imidazol.

Os resultados para os controles, bem como para a interação de interesse podem ser observados na Figura 54 e na Tabela 13 a seguir.

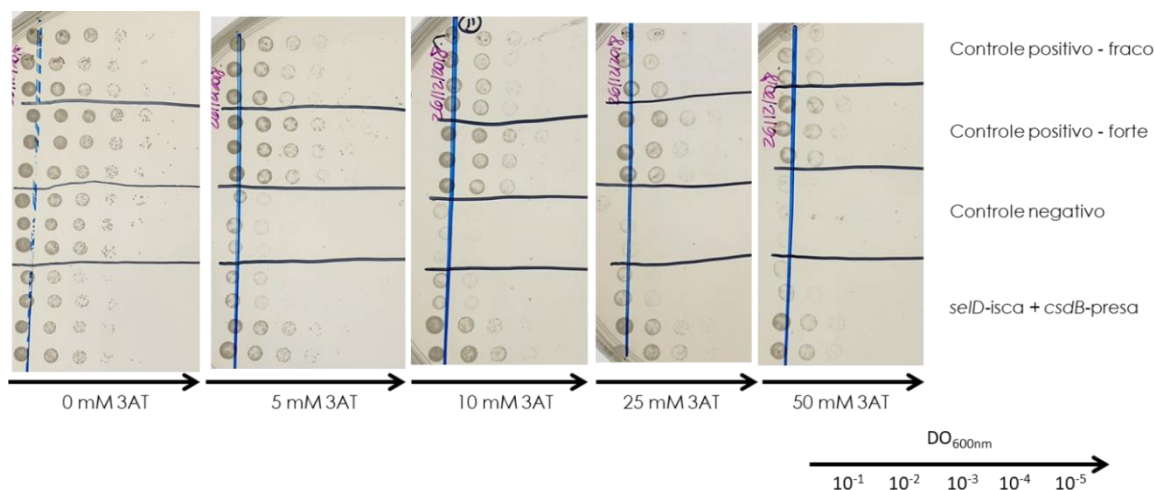


Figura 54 – Ensaio de ativação do gene repórter *HIS3* para verificação da interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* em sistema *in vivo*.

Fonte: Elaborada pela autora com colaboração da aluna de doutorado Raissa F. Gutierrez (IFSC/USP) e Prof^a Dra Ana Paula Ulian de Araújo (IFSC/USP).

Tabela 13 – Verificação do crescimento das células de *S. cerevisiae*, linhagem MaV203, no ensaio de ativação do gene repórter *HIS3*.

		[3AT]				
DO _{600nm}	0 mM	5 mM	10 mM	25 mM	50 mM	
10 ⁻¹	X	X	X	X	X	
10 ⁻²	X	X	X	X	X	
10 ⁻³	X	X	X	X		
10 ⁻⁴	X	X				
10 ⁻⁵	X					

Fonte: Elaborada pela autora

Verifica-se que os controles positivos cresceram em todas as concentrações de 3-AT, enquanto que o controle negativo não cresceu em concentrações maiores ou iguais a 10 mM, conforme esperado pelo manual do fabricante. Analisando a interação, observa-se um crescimento até a D.O. de 10⁻³, conforme o controle positivo forte. Assim, pela primeira vez

observa-se a interação entre *EcCsdB* e *EcSelD* de *E. coli* através do sistema de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando linhagem Mav203.

5 CONCLUSÕES

Esse projeto de pesquisa tinha como principal objetivo demonstrar experimentalmente a interação entre Selenocisteína liase e Selenofosfato sintetase bacterianas. Como mencionado, essa interação foi predita em 2009 mas nunca provada. Assim, este estudo demonstrou, pela primeira vez, a interação entre essas duas proteínas pertencentes à via de incorporação de selenocisteínas de *E. coli*.

A demonstração da interação foi realizada por diversas técnicas biofísicas e estruturais e observou-se uma elevada afinidade de interação para o sistema em estudo. Medidas de IFS bem como de SE-AUC mostraram uma constante de dissociação aparente de $(24,4 \pm 0,5)$ nM para *EcCsdB.EcSelD* apo, $K_{Dapp} = (13,3 \pm 2,4)$ nM para *EcCsdB.EcSelD.Se²⁻* e $K_{Dapp} = (1,8 \pm 0,4)$ nM para *EcCsdB.EcSelD.Sec*. Seguindo a hipótese da detoxificação celular, vê-se que com a adição do substrato de *EcSelD* há a redução no valor de K_{Dapp} e, na adição de *Sec*, esse valor reduz significativamente. Como $K_A = 1/K_D$, tem-se que quanto menor o K_D , maior será a afinidade de interação. A interação entre as proteínas já apresenta elevada afinidade na ausência dos substratos, pois $K_{Dapp} < 50$ nM. A adição dos ligantes com seguida redução de K_D só indica que a presença dos ligantes promove uma maior afinidade de interação para formação do complexo. Analisando a teoria, este fato era esperado de acontecer, pois aumentando a afinidade previne a liberação do composto com elevada citotoxicidade no ambiente celular. Além disso, ensaios de duplo híbrido dirigido em levedura *S. cerevisiae*, demonstraram pela primeira vez a interação *in vivo* entre a Selenocisteína liase e Selenofosfato sintetase bacteriana.

Análises termodinâmicas indicaram uma interação majoritariamente entálpica, num processo exotérmico, com $\Delta H = -11$ kcal/mol, e, uma interação termodinamicamente favorável. Ademais, observou-se uma maior estabilidade térmica para o complexo formado, uma vez que verificou-se um aumento na T_m para cada enzima individualmente quando estas estão em complexo.

Estruturalmente foi obtido um modelo em baixa resolução do complexo por SAXS, indicando assimetria na interação, além de um D_{max} maior para o complexo, sendo 98 Å para *EcSelD*, 88,1 Å para *EcCsdB* e 130 Å para o complexo, tamanho este confirmado por NS-EM. Além disso, análises da massa do complexo por técnicas biofísicas e estruturais sugerem uma estequiometria 1:1, uma vez que a massa obtida para o complexo corresponde à massa teórica do heterocomplexo formado.

Através de cristalografia de proteínas foi possível obter a melhor resolução para a estrutura de CsdB de *E. coli*, sendo esta de 1,77 Å de resolução. A estrutura foi depositada no banco de dados PDB, sob o código 6DN6. Ensaios de *soaking* com o peptídeo demonstraram, pela primeira vez, o posicionamento deste ao sítio ativo da proteína. Apesar de sua elevada flexibilidade, não sendo possível afirmar a posição exata dos átomos na densidade, observou-se como é o encaixe do domínio N-terminal de *EcSelD* no sítio catalítico de *EcCsdB*.

Desta forma, este é o primeiro estudo em que se tem a caracterização biofísica, cinética, termodinâmica e estrutural da interação entre Selenocisteína liase e Selenofosfato sintetase bacterianas. Pela primeira vez, foi demonstrada experimentalmente a interação, trazendo assim um grande avanço para a compreensão da bioquímica de composto selenados, mostrando como ocorre a entrega de seleneto na célula pela interação *EcCsdB.EcSelD*. Além de aumentar a fronteira do conhecimento nos mecanismos moleculares envolvidos na via de biossíntese de selenocisteína, esse estudo amplia o conhecimento para análise de interação do tipo proteína-proteína, sendo importante não só para o estudo da via de incorporação de selenocisteínas, mas para qualquer mecanismo em que haja interação entre proteínas, como complexos macromoleculares compostos por várias proteínas.

6 PERSPECTIVAS

Essa etapa do projeto tem como principais perspectivas:

- A caracterização cinética de *EcSelD* analisando a formação do monoselenofosfato através do monitoramento da formação de fosfato inorgânico (PPi);
- Novas coletas de NS-EM para poder aumentar a quantidade e qualidade das partículas e assim possibilitar a construção de um modelo em baixa resolução, podendo inferir o preparo das amostras em gelo vítreo e coletas por crio-microscopia eletrônica de transmissão;
- Otimização da estrutura de *EcCsdB* contendo peptídeo no sítio ativo.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA VIA DE INCORPORAÇÃO DE SELENOCISTEÍNA EM EUCARIOTOS

7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Obtenção dos genes de interesse

7.1.1 Determinação do truncamento da proteína NgSBP2

Devido a dificuldade em obter de forma solúvel a construção SBP2 de *Naegleria gruberi* (XP_002683189), optou-se por realizar o estudo da interação entre SBP2 e o elemento SECIS através de dois truncamentos distintos na sequência, um correspondente ao domínio amino-terminal (NT) e outro ao domínio carboxi-terminal (CT), esse sendo reconhecido como parceiro de interação ao elemento SECIS.^{54,61,109} A posição do truncamento foi escolhida através do *BLASTp*¹¹⁰ (NCBI) para delimitar os domínios e a ferramenta *SAS*¹¹¹ (PDBSum) para analisar a predição de estruturas secundárias. Dessa forma, truncou-se a sequência de SBP2 entre os domínios CT e NT, em uma região predita para não possuir estruturação secundária (resíduo Leu203).

7.1.2 Clonagem dos genes *sbp2CT* e *sbp2NT* em vetores de expressão

Os genes *sbp2NT* e *sbp2CT* de *N. gruberi*, codificante para os domínios amino terminal e carboxi terminal respectivamente, foram amplificados a partir de DNA genômico utilizando protocolo previamente descrito na seção 3.1.3. Aos oligonucleotídeos (Sigma-Aldrich) foram introduzidos os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*, representados abaixo.

sbp2NT-For-NdeI : 5'-CCATATGGCCGGTTACAATTTGAATTTTCCC-3';
sbp2NT-Rev-XhoI : 5'-CCGCTCGAGTAATGATGTAACAAGAGCTTCTGTTG-3'
sbp2CT-For-NdeI : 5'-CCATATGGTTCTTACAAAAAGAAAAACCAAACAAACTAAAG-3';
sbp2CT-Rev-XhoI : 5'-CCTCGAGGTAACATAATTCTTCAAATCAACATTTCCAGGTTGTTCTG-3'

Os genes amplificados foram confirmado por eletroforese em gel de agarose e posteriormente extraídos utilizando o kit comercial *Agarose gel extraction kit* (Cellco) para posterior clonagem em vetor de propagação *pJET1.2 blunt* utilizando o o kit comercial *pJET-cloning kit* (Thermo Scientific), que permite sua ligação direta com os fragmentos gerados após amplificação por PCR e tratados com enzima DNA *blunting enzyme*.

Posteriormente, as construções clonadas no vetor comercial foram transformadas em cepa de propagação *E. coli* DH5- α quimiocompetentes seguindo o protocolo 3.1.1, sendo a seleção das colônias feitas através de ampicilina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A confirmação da ligação se deu através do protocolo 3.1.2 e os clones positivos foram selecionados através do perfil eletroforético. Posteriormente, foi realizada a digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI FastDigest* (Fermentas) por 2 h à 37° C. A reação de digestão foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1%, contendo *Sybr Safe*[®] (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Novamente, os fragmentos correspondentes aos genes de interesse foram extraídos do gel de agarose da mesma maneira descrita anteriormente.

Os insertos foram então ligados aos vetores de expressão utilizando-se a enzima T4-DNA ligase, incubando a reação por 16 horas a 4 °C. Inicialmente foram escolhidos o vetor comercial pET28a(+) (Novagen) (para construção NT) e um vetor pET28a(+) modificado, pelo grupo do Professor Otavio Thiemann (IFSC/USP), para a construção CT que contém um sítio de clivagem para TEV protease substituinte ao sítio para trombina, denominando-se vetor pET-TEV não comercial. Os passos de transformação em cepa de expressão *E. coli* BL21 (λDE3) foram seguidos conforme o protocolo mencionado anteriormente.

Após a confirmação da ligação nos vetores de expressão, procedeu-se aos ensaios de expressão proteica.

7.2 Obtenção dos truncamentos da proteína NgSBP2 e elemento SECIS

7.2.1 Teste de expressão inicial

Para o teste de expressão utilizou-se pré-inóculos de 10 mL de meio LB, contendo canamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para os sistemas *E. coli* BL21 (λDE3) *spb2NT* e *spb2CT*. Os pré-inóculos foram crescidos por 16 horas sob agitação de 80 rpm à 37 °C. Posteriormente, foi feito um repique de 1:100 em meio LB seletivo, mantendo-se sob agitação de 150 rpm à 37° C até atingir a densidade óptica $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ 0,6, em que foi adicionado 1 mM de IPTG mantendo sob mesma agitação e temperatura. Variaram-se os tempos de indução em 3, 4, 5, 6 e 18h e o resultado foi observado em gel SDS-PAGE 12%.

7.2.1.1 Confirmação da expressão proteica por *Western blot* (WB)

Para analisar a presença da proteína proveniente dos testes de expressão, procedeu-se ao ensaio de *Western blot*, contra a His-TAG. Assim, amostras não induzidas e induzidas por 3 h, 37 °C foram submetidas a esta análise. Inicialmente, as amostras foram submetidas a um SDS-PAGE 12%, utilizando-se o *Spectra Multicolor Range* (Fermentas), 140 V, 400 mA por 1 h e 40 min. O gel foi imerso na solução de transferência (25 mM Tris, 200 mM glicina, 20% metanol) e em seguida foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose através do *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-rad) por 30 min, 2,5 A, 20 V.

Após este procedimento, a membrana de nitrocelulose (0,45 µm Amersham Protan) foi corada com solução *Ponceau* 1% por 2 min e descorada com água destilada. Sendo assim, foi possível confirmar a transferência para a membrana de todas as bandas do gel.

A membrana foi submersa na solução de bloqueio em tampão PBST (1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄, 1% de Tween[®] 20) suplementado com 5% de leite em pó) por 1 h, sob agitação, à temperatura ambiente. Após esta etapa, incubou-se a membrana com o anticorpo primário (monoclonal anti-His Sigma-Aldrich) na solução PBST contendo 1% de leite em pó por 2 h, sob agitação, à temperatura ambiente. A titulação utilizada para o anticorpo primário foi de 1:5000. A membrana foi lavada 3 vezes com PBST por 8 min cada lavagem e foi submetida a incubação com anticorpo secundário (anti-mouse Sigma-Aldrich) em solução PBST sem leite em pó por 1 h e 30 min, sob agitação, à temperatura ambiente, com titulação de 1:5000. Após a incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada 3 vezes com solução PBST por 8 min novamente cada lavagem e em seguida, revelou-se a membrana, deixando-a em solução de Luminol (1M Tris, pH 8,5, 0,22 mM ácido p. cumárico, 1,24 mM luminol), um reagente quimioluminescente, suplementado com 0,3% H₂O₂ por 2 min e marcação das bandas do *Spectra Multicolor Range* com a caneta *Glow writer*, uma caneta fosforescente utilizada para marcar as bandas visíveis do *Spectra Multicolor Range*, preparando estas para a detecção quimioluminescente do WB. Por fim, a membrana foi colocada no revelador digital c-digit (Li-cor), com exposição de alta sensibilidade. Os resultados foram coletados e gravados através do programa *Image Studio Digits*.

7.2.2 Expressão dos domínios CT e NT de NgSBP2

Para expressão dos truncamentos utilizaram-se pré-inóculos de 10 mL de meio LB, contendo canamicina (30 µg/mL) para ambos os sistemas. Assim como descrito anteriormente, os pré-inóculos foram utilizados para aumentar-se a escala (1:100) e assim, as células foram mantidas sob agitação, a 37 °C, até atingir D.O._{600nm} 0,6, na qual foi adicionado 1 mM de IPTG mantendo sob mesma agitação e temperatura por 3 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 min à 4 °C. Os *pellets* celulares foram suspensos em tampão de lise (100 mM Fosfato de Sódio, pH 11,0, 300 mM de NaCl, 2% de glicerol, 250 U benzonase, 2 mM MgCl₂). Após a obtenção dos extratos proteicos, estes foram submetidos à purificação.

7.2.3 Estabelecimento de protocolo para a purificação dos truncamentos da NgSBP2

Os extratos proteicos brutos foram submetidos à purificação através de cromatografia de afinidade em 3 mL de resina de Ni²⁺-NTA (ClonTech). Os tampões utilizados na purificação, além do tampão de lise, foram tampão de lavagem (100 mM fosfato de sódio, pH 11,0, 300 mM NaCl, 2% de glicerol, 20 mM de imidazol) e tampão de eluição (100 mM fosfato de sódio, pH 11,0, 300 mM NaCl, 2% de glicerol, 500 mM de imidazol). As colunas (uma para cada amostra) foram previamente equilibradas com tampão de lise. Após essa etapa, procedeu-se ao gradiente de imidazol, em etapas, com os tampões de lavagem e eluição. Todas as frações das etapas de purificação foram coletadas e submetidas a um gel SDS-PAGE 12%. Para remoção do excesso de imidazol, as amostras foram dialisadas para o tampão de lise (100 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, 2% glicerol). Após a diálise as amostras foram utilizadas para os ensaios de caracterização biofísica e interação com o elemento SECIS.

7.2.4 Obtenção do elemento SECIS

7.2.4.1 Amplificação do gene *secis* de *Naegleria gruberi*

O elemento *secis* de *Naegleria gruberi* foi amplificado através de PCR, a partir dos oligonucleotídeos complementares comercialmente sintetizados (Sigma-Aldrich):

secis-For:

5' **ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT**ATTGTGACGTGACGAGTACTGTTCTAAACTTG
GAGTAACCAAAAAGAACGCCATTCTGATATACAATAC-3'

secis-Rev:

5'ATTGTATATCAGAATGGCGTTCTTTTGGTTACTCCAAGTTTAGAACAGTACTCGTCACGTCACAAT
-3'

Foi adicionada na sequência *foward* a região promotora para ligação da enzima T7 RNA polimerase (ThermoScientific), destacada em vermelho, o que permite a transcrição utilizando o DNA dupla fita provindo da PCR.

A amplificação do DNA molde do *secis* foi realizada a partir da PCR, na qual as condições se diferenciam das previamente descritas na seção 3.1.1. Iniciou-se com o aquecimento a 94 °C por 90 s para a completa desestabilização de eventuais elementos de estrutura secundária, e os ciclos posteriores consistiram em um passo de incubação a 94 °C por 30 s, seguido pelo passo de anelamento a 40 °C por 30 segundos e por fim um passo de alongação a 72 °C por 30 segundos. Esse ciclo foi repetido por 35 vezes, e a amostra foi então incubada a 4 °C para preservação e posterior utilização.

O resultado da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% contendo *Sybr Safe*[®] (0,5 mg/mL), 80 V, 400 mA por aproximadamente 40 minutos. O gel foi preparado em tampão livre de RNases. O resultado foi observado em transluminador *Gel Doc XR⁺ System* (Bio-Rad), a 470 nm e os fragmentos de interesse foram recuperados utilizando o kit comercial *Wizard[®] SV Gel* (Promega). As quantificações foram realizadas utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific).

7.2.4.2 Transcrição *in vitro* do elemento SECIS

A transcrição *in vitro* do SECIS se deu através do kit comercial *MEGAShortscript* (Ambion). A quantidade de DNA molde utilizada foi de 250 ng para uma reação. Além do DNA molde, à reação foram adicionados 2 µL de de ATP, CTP, GTP, UTP, tampão de reação diluído 10X, mix de enzimas e água livre de RNases para um volume final de 20 µL. Após o preparo da reação, esta foi incubada a 37 °C por 24 h em termociclador *T100 Thermal Cycler* (Bio-rad).

Após a finalização da reação de transcrição *in vitro*, a amostra foi purificada pelo seguinte protocolo: à amostra adicionou-se de 1 µL de DNase Turbo (Ambion), para degradação do DNA molde utilizado, incubando-se por 15 min à 37 °C. Posteriormente, procedeu-se com a extração utilizando o protocolo de precipitação com fenol e clorofórmio,

no qual 200 μL de fenol foram adicionados e homogeneizados através vortexação por 30 s seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Uma vez retirado o sobrenadante da mistura bifásica resultante este foi transferido para outro microtubo, no qual se repetiu o mesmo procedimento com a adição de 200 μL de clorofórmio. Após a centrifugação nas mesmas condições descritas acima, o sobrenadante contendo as moléculas de RNAs transcritas foi transferido para outro microtubo. A precipitação do RNA produzido se deu pela adição de 2,5 volumes de etanol RNase_{free}100% e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 4,7 RNase_{free}. O material foi então guardado por 16 h a -20 °C para precipitação dos RNAs.

Após a precipitação, procedeu-se com a centrifugação das amostras em 13.200 rpm por 45 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi retirado e ao precipitado foi adicionado etanol 70% RNase_{free} previamente gelado. Após nova centrifugação por 15 minutos, foi retirado o etanol 70% RNase_{free} e novamente foi realizada mais uma etapa de centrifugação nas mesmas configurações. O sedimento foi deixado por 16 h para completa secagem à temperatura ambiente e, após esse período, o sedimento seco foi ressuscitado em 50 μL de água livre de RNases. Após a purificação do SECIS, foi necessário garantir o correto enovelamento.

O enovelamento do elemento de RNA foi realizado utilizando-se um banho térmico a 80 °C com decréscimo contínuo da temperatura até 35 °C e posterior suplemento com 20 mM de MgCl₂, uma vez que RNAs com estrutura secundária requerem coordenação dos fosfatos por metais divalentes. As quantificações foram realizadas utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific) no modo RNA40 utilizando água RNase_{free} autoclavada como referência.

7.2.4.3 Enovelamento do elemento SECIS monitorado por dicroísmo circular (CD)

Após a amplificação e transcrição do elemento SECIS, seu enovelamento foi monitorado através da técnica de dicroísmo circular por meio de variação térmica. Para isso, medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas circulares de 1 mm de caminho óptico em que 12 μM de SECIS foram preparados em água livre de RNases contendo 20 mM de MgCl₂. Os espectros de CD registrados em função da temperatura, de 90 °C à 10 °C com 120 s de incubação entre cada aquisição. Foram realizadas médias de 8 *scans* à 50 nm/s no intervalo de comprimentos de onda entre 200-340 nm. A contribuição do tampão (20 mM de MgCl₂ em água livre de RNases) foi subtraída dos espectros de CD. Os dados obtidos foram tratados e analisados

utilizando o software *Origin*[®] 8.6. A análise dos máximos em 268 nm em função da temperatura foi empregada, por meio do ajuste sigmoidal pela função de *Boltzmann*, permitindo a determinação da temperatura de *melting* (T_m).

7.2.4.4 Marcação do elemento SECIS com fluoróforo específico

Ambos os truncamentos da SBP2 de *Naegleria gruberi* não possuem grupos protéticos com possam funcionar como fluoróforos. Dessa forma realizou-se a marcação do elemento SECIS na extremidade 5' com o fluoróforo 5-iodoacetamnofluoresceína (5'-IAF). Estudos anteriores⁶⁸ evidenciaram que a marcação na extremidade 5' é mais eficiente para ácidos nucleicos.

Para marcação do elemento SECIS, utilizou-se o kit comercial *5' EndTag Nucleic Acid Labelling System* (Vector laboratories). Este kit realiza a ligação covalente da fluoresceína na extremidade 5' de ácidos nucleicos. Os passos seguidos pelo kit são: transferência do grupo trifosfato do ATP γ S para extremidade 5'-OH do ácido nucleico através da enzima T4 Polinucleotídeo quinase (PNK). Depois da adição do grupo tiol funcional, uma sonda tiol-reativa é quimicamente ligada à extremidade 5' do ácido nucleico.

7.3 Caracterização biofísica das amostras

7.3.1 Avaliação do perfil de estruturas secundárias por Dicroísmo circular (CD)

A fim de se determinar a composição de elementos de estruturas secundárias de cada um dos truncamentos da NgSBP2, medidas de CD foram realizadas. Vale destacar que, até o presente momento, não existem evidências estruturais de proteínas interagentes ao elemento SECIS. Além disso, medidas de CD em função da temperatura foram realizadas a fim de se obter a T_m bem como analisar a estabilidade dos truncamentos conforme se aumenta a temperatura.

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-720 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas circulares de 1 mm de caminho óptico. A concentração das amostras nesse experimento foi de 0,2 mg/mL para NgSBP2-CT e 0,3 mg/mL para NgSBP2-NT preparadas em tampão 20 mM fosfato de sódio, pH 11, 50 mM de NaCl, 2% de glicerol. Para ambos os truncamentos, ensaios de VT-CD foram realizados a fim de se analisar o comportamento das estruturas secundárias da proteína em função da temperatura.

Em todas as medidas, os espectros foram registrados em um intervalo de comprimento de onda (198-280 nm para *NgSBP2-CT* e 200-280 nm para *NgSBP2-NT*), com uma média de 8 scans com resolução de 1 nm e velocidade de 50 nm/s. As contribuições dos tampões foram subtraídas dos seus respectivos espectros. A curva de desnaturação térmica foi obtida através do monitoramento em comprimento de onda 208 nm. O ajuste da curva foi feito através da função de *Boltzmann* no programa *Origin*[®] 8.6.

A predição de estruturas secundárias foi realizada através do software *CDPro*.⁸³ Os arquivos de entrada foram modificados através do *CRDATA*⁸³ e as referências foram escolhidas de acordo com o perfil observado no espectro de dicroísmo circular.¹¹²

7.3.2 Análise do conteúdo de estruturas secundárias por Espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

Para avaliar o conteúdo de estruturas secundárias de cada uma das amostras, foram realizadas medidas de Espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR). A principal vantagem dessas medidas é que elas avaliam a absorção da banda Amida I que é proveniente das ligações amida entre os aminoácidos. Assim, o tratamento dos dados é feito através do uso de gaussianas correspondentes à frequência de absorção de cada estrutura secundária, tendo assim menores erros associados à deconvolução dos dados, e retornando o percentual de estruturas secundárias das amostras em análise.¹¹³

Os experimentos foram realizados no Departamento de Física da UNESP – São José do Rio Preto, em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio. Utilizando o espectrômetro *Spectrum Two-IR* (PerkinElmer) equipado com um detector *DTGS KBr*. Para concentrações de 1 mg/mL de *NgSBP2-CT* e *NgSBP2-NT* preparadas em tampão de lise contendo 80% de deutério (D_2O), o que suprime a contribuição das moléculas de água junto ao sinal coletado. Foram realizadas 10 acumulações durante 300 s foram coletadas com resolução de 2 cm^{-1} numa varredura de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ à $25\text{ }^\circ\text{C}$.

O processamento dos dados foi realizado através do programa *Origin 8.0*[®] e a banda Amida I (região entre $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) foi isolada utilizando-se o operador segunda derivada. Assim, determinaram-se os máximos de picos em regiões com estruturas secundárias previamente conhecidas sendo necessários 5 gaussianas para o ajuste da deconvolução espectral.

7.3.3 Determinação do diâmetro hidrodinâmico em solução através Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Com a finalidade de se avaliar o diâmetro hidrodinâmico em solução, medidas de DLS foram feitas para cada uma das proteínas, NgSBP2-CT e NgSBP2-NT. As medidas foram realizadas em concentrações constante de 0,2 mg/mL preparadas em tampão de diálise. Foram registrados 13 *scans* em triplicata durante 8 minutos mantendo a temperatura fixa em 25 °C, para analisar o diâmetro hidrodinâmico em solução. O tempo de incubação de 120 segundos no equipamento em cubeta de quartzo (caminho óptico 1,5 mm para volume de 2 µL) foi esperado antes do início das medidas.

7.3.4 Análise da estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na desnaturação proteica por Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Com a finalidade de se obter os parâmetros termodinâmicos da desnaturação das proteínas NgSBP2-CT e NgSBP2-NT, medidas de DSC foram realizadas. Além disso, essa técnica foi empregada primeiramente para caracterizar ambas as amostras para posteriormente realizar os ensaios de interação com o elemento SECIS.

As medidas de DSC das proteínas NgSBP2-CT e NgSBP2-NT foram realizadas no calorímetro VT-DSC (Microcal), com taxa de fornecimento de calor de 63,7 °C/h e pressão de 1 atm. A concentração das proteínas foi de 1,5 mg/mL (66,5 µM para NgSBP2-NT 46,3 µM para NgSBP2-CT). As análises dos termogramas obtidos foram realizadas através do software *MicroCal DSC Origin*[®]. Os experimentos de DSC para os truncamentos da NgSBP2 também foram realizados no grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo) em colaboração com o Dr. Luís Guilherme Mansor Basso da Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD-EUA).

7.4 Caracterização estrutural de NgSBP2

7.4.1 Análise em solução por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Assim como para o complexo binário *EcCsdB.EcSelD*, a coleta de dados de SAXS dos truncamentos NT e CT de *N. gruberi* também foi realizada na linha SAXS-1 do

Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS – CNPEM) em colaboração com o Prof. Dr. Mario de Oliveira Neto (IBB – UNESP Botucatu) com a mesma configuração experimental. Ambas as proteínas foram medidas em duas concentrações diferentes, sendo de 1 mg/mL e 6,8 mg/mL para NgSBP2-CT e 1 mg/mL e 10 mg/mL para NgSBP2-NT preparadas em tampão de diálise.

As amostras bem como os tampões foram colocados em sistema de vácuo numa cela de mica e obtidos em uma média de 5 frames de 30 segundos cada. O processamento inicial foi realizado através do programa *FIT2D*⁷⁴ no qual as contribuições dos respectivos tampões foram subtraídas das curvas de espalhamento de cada amostra. No caso das proteínas NgSBP2-CT e NgSBP2-NT, as análises de *Kratky Plot*¹¹⁴ foram feitas através do programa SAXSMoW2¹⁰³ e com ele foi possível observar que não seria possível obter um modelo para essas proteínas. Dessa forma, o programa *EOM*¹¹⁵ que faz parte do pacote de programas do *ATSAS*,⁷⁵ foi utilizado a fim de se determinar os diversos *ensembles* de conformações.

7.4.2 Análise da polidispersividade por microscopia eletrônica de transmissão em contraste negativo (NS-EM)

Para observar a homogeneidade/heterogeneidade dos truncamentos CT e NT de NgSBP2, a técnica de microscopia eletrônica por contraste negativo foi utilizada. Para isso, as proteínas NgSBP2-CT e NgSBP2-NT foram dialisadas em tampão 20 mM fosfato de sódio, pH 11,0, 50 mM de NaCl e 1% de glicerol e a concentração utilizada foi de 0,5 mg/mL. Procedeu-se com o protocolo de aquisição de dados como previamente descrito na sessão 3.5.1.

7.5 Caracterização biofísica da interação e reconhecimento do elemento SECIS *in vitro*

7.5.1 Determinação da interação por Espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)

As medidas de anisotropia de fluorescência foram realizadas a fim de se determinar se ambos os truncamentos interagem com o elemento SECIS e, em caso afirmativo, determinar o valor da constante de interação aparente. Dessa forma, verificaram-se as seguintes interações: NgSBP2-CT.SECIS, NgSBP2-NT.SECIS, (NgSBP2-CT.SECIS). NgSBP2-NT. A concentração de SECIS na cubeta foi de 500 nM, sendo 10 nM marcado com fluoresceína e

490 nM com a população de SECIS não marcada. Titularam-se concentrações crescentes dos truncamentos, para cada experimento. No estudo do complexo (*NgSBP2-CT.SECIS*). *NgSBP2-NT*, mantendo-se constante na cubeta o elemento SECIS em concentração equimolar a *NgSBP2-CT*.

As medidas foram realizadas em um fluorímetro K2 (*ISS, fluorescence, Analytical Biomedical Instrumentation – Illinois/USA*) a 25 °C, com geometria “L”. O comprimento de onda de excitação foi de 492 nm, com a utilização do filtro 470-490 nm. A emissão foi monitorada no modo *single point*. Assim como as medidas anteriores no fluorímetro, entre uma titulação e outra, o sistema foi deixado em repouso, por 10 min, para garantir o equilíbrio térmico. Os dados foram tratados no programa *Origin*[®] 8.6 e os ajustes foram realizados através da função de *Hill*. Todas as medidas foram realizadas em triplicata biológica.

7.5.2 Determinação das constantes de dissociação por Ultracentrifugação analítica – sedimentação em equilíbrio (SE-AUC)

Para determinar as constantes de dissociação aparente, medidas de ultracentrifugação analítica em equilíbrio (SE-AUC) foram realizadas de maneira análoga ao descrito anteriormente na seção 3.4.2.

Para os complexos envolvendo a *NgSBP2.SECIS*, as medidas de SE-AUC foram realizadas em três diferentes estequiometrias. Manteve-se constante na cela o elemento SECIS e razões 0,5; 1,0 e 2,0 de *NgSBP2-CT* foram adicionadas para a formação do complexo *NgSBP2-CT.SECIS*. Devido à inespecificidade de interação de *NgSBP2-NT* com SECIS, este complexo não foi selecionado para medidas de SE-AUC. Em contrapartida, o complexo *NgSBP2-NT. NgSBP2-CT* foi medido por esta técnica, sendo que *NgSBP2-CT* foi mantido constante na cela e razões de 0,5; 1,0 e 2,0 de *NgSBP2-NT* foram adicionadas.

Outro complexo monitorado por SE-AUC foi (*NgSBP2-CT.SECIS*). *NgSBP2-NT*, no qual *NgSBP2-CT* e SECIS foram adicionados em razões equimolares 1:1 e *NgSBP2-NT* foi adicionado nas mesmas razões mencionadas anteriormente. As medidas de SE-AUC foram obtidas em passos de 3.000 rpm; 35.000 rpm; 38.000 rpm e 42.000 rpm, sendo que em todas as etapas foi mantida a rotação durante 14 horas para assegurar o equilíbrio. As medidas foram realizadas a 25 °C com monitoramento no comprimento de onda de 280 nm. O tratamento do conjunto de dados foi realizado através do software *SEDPHAT*.⁶⁹ Os valores teóricos dos parâmetros de viscosidade e densidade foram calculados pelo programa *SEDNTERP*.⁷⁰

O modelo utilizado para os complexos *NgSBP2-NT*, *NgSBP2-CT* e *NgSBP2-CT.SECIS* foi $A + B \leftrightarrow AB$, enquanto que para o complexo ternário (*NgSBP2-CT.SECIS*). *NgSBP2-NT* o modelo de interação utilizado foi $A + B + C \leftrightarrow AB + C \leftrightarrow AC + B \leftrightarrow ABC$, sendo A, a proteína *NgSBP2-CT*, B o elemento SECIS e C a proteína *NgSBP2-NT*.

7.5.3 Análise da variação do perfil de estruturas secundárias na interação *NgSBP2-CT* com o elemento SECIS por FTIR

Análises de FTIR para o complexo foram realizadas com a finalidade de avaliar se *NgSBP2-CT* sofre mudanças na estruturação secundária ao interagir com o elemento SECIS. Assim, o complexo foi preparado em razão equimolare a coleta e tratamento dos dados ocorreu conforme sessão 7.3.2.

Essas medidas não foram feitas através de CD uma vez que os ácidos nucleicos apresentam sinal de dicroísmo circular na mesma região espectral que proteínas, portanto, interferem nos espectros de CD.¹¹⁶ Por este motivo, as análises de mudanças em estruturas secundárias de complexos proteína-RNA geralmente são feitas através de medidas de FTIR, pois as bandas de absorção dos modos vibracionais de ácidos nucleicos e proteínas são distintos.¹¹⁷

7.5.4 Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)

Para obtenção da massa molar e raio de *Stokes* (R_s) dos truncamentos da *NgSBP2* bem como do complexo *NgSBP2-CT.SECIS*, medidas de ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC) foram realizadas no mesmo equipamento mencionado na seção 3.4.2.

Os experimentos de velocidade de sedimentação das proteínas bem como do complexo de CT com o elemento SECIS também foram realizados a 28.000 rpm, 25 °C. Foram feitas medidas da proteína *NgSBP2-CT* (36,4 μ M), *NgSBP2-NT* (136,5 μ M) bem como do complexo *NgSBP2-CT.SECIS*, em razão 1:1. O monitoramento foi feito em $\lambda = 280$ nm com o total de 136 varreduras para cada condição por 24 h. A análise dos dados se deu de modo análogo à seção 3.4.7.

7.6 Caracterização dos complexos macromoleculares de NgSBP2 *in vivo*

7.6.1 Produção de antissoros para identificação dos truncamentos de NgSBP2

Para avaliar a presença dos truncamentos da NgSBP2 em extrato de proteínas totais de *N. gruberi*, fez-se necessária a produção de antissoros para cada um dos truncamentos. O antissoro para NgSBP2-NT foi produzido pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Por outro lado, o antissoro para NgSBP2-CT foi produzido em camundongos Balb/c no Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP-UFSCar), em colaboração com a Prof.^a Dr.^a Fernanda Anibal e a aluna de doutorado Ana Carolina Maragno Fattori.

Todo o procedimento se baseou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Os animais utilizados para esta finalidade foram camundongos fêmeas da linhagem Balb/c (15-18 g), obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Esses camundongos são animais isogênicos e livres de patógenos. Durante todo o período da produção do antissoro, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar, tendo acesso livre à ração e água.

Para a imunização com a proteína recombinante NgSBP2-CT, os animais foram separados em 2 grupos, sendo o grupo 1 os animais que iriam receber 2 doses de imunização e o grupo 2, os animais que receberiam 3 doses de imunização. Dessa forma, a imunização foi realizada com intervalos de 15 dias para ambos os grupos através de injeção intraperitoneal. Para isso, 100 µg de NgSBP2-CT foram adicionadas a uma solução contendo o adjuvante (100 µg de hidróxido de alumínio, dissolvidos em PBS [1X]) em volume de 200 µL. Todos os reforços das imunizações foram feitos conforme o protocolo previamente mencionado. Após o período das imunizações, os animais foram anestesiados com 1% Isoflurano (Sigma-Aldrich) e eutanasiados por punção braquial para a extração do soro.

7.6.1.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A partir do plasma total dos animais foi realizada a pesquisa de anticorpos por ELISA Indireto (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático), onde os

antígenos fixados (enzimas analisadas) estimularam a ligação com os possíveis anticorpos presentes no plasma dos camundongos que, posteriormente, foram detectados por conjugados específicos contra os possíveis anticorpos presentes neste plasma, sendo feita a detecção de anticorpos do tipo IgG1 (*anti-Mouse IgG1 Antibody HRP Conjugated*, Bethyl Laboratories, Inc.).¹¹⁸ Somente o antissoro para NgSBP2-CT foi submetido a esta análise, pois o antissoro para NT foi produzido por um centro de biotecnologia, o qual se encarregou de verificar a reatividade do antissoro para validação.

Para o ELISA da NgSBP2-CT, foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços (Corning® Costar 3590) sendo aplicados 10 µg/poço da proteína analisada (NgSBP2-CT), diluída em tampão carbonato 0,1 M - pH 9,5, totalizando 100 µL/poço, para sensibilização das placas por 16 horas a 4 °C. Após a sensibilização, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300 µL/poço de PBST [1X] (PBS [1X], pH 7,4, 0,05% Tween 20, solução de lavagem). Posteriormente à lavagem, foram acrescentados 200 µL/poço de solução bloqueio (PBST + 10% de leite em pó) e as placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período foi realizada, novamente, a lavagem das placas, por 5 vezes, com a solução de lavagem. Então foi realizada a aplicação dos anticorpos (anti-NgSBP2-CT) nas placas, nas titulações 1:50 e 1:500, sendo aplicados 100 µL/poço da solução contendo o anticorpo. As reações foram feitas em triplicatas para os grupos que receberam a imunização com a proteína e o controle. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Os camundongos foram separados em 4 *pools*, sendo: *pool1* dois animais que receberam 2 doses; *pool2*, três animais que receberam duas doses; *pool3*, três animais que receberam 3 doses e *pool4*, dois animais que receberam três doses de imunização.

Após o período de incubação, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes, com a solução de lavagem. Foi então preparado, ao abrigo de luz, o anticorpo secundário conjugado com enzima peroxidase diluindo-o em PBS 1X + BSA 1%, na proporção 1:10.000 para IgG1, e, posteriormente, foi aplicado 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por 1:30 h ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas por 3 vezes com a solução de lavagem. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB (3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, por aproximadamente 3 min, até a solução apresentar uma coloração azul mais forte. Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 µL/poço de 2 N ácido sulfúrico. Finalmente, a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pelo leitor de placas de ELISA (TP-Reader NM, Thermoplate).

7.6.2 Cultivo celular de *Naegleria gruberi*

7.6.2.1 Determinação da curva de crescimento celular

A cepa de *Naegleria gruberi* Schardinger (ATCC® 30224™) foi utilizada para todos os ensaios que seguem ao longo deste relatório. As células foram mantidas em garrafas de 25 cm², contendo 10 mL de meio nutritivo (ATCC 1034 – 10 g Peptona, 10 g Extrato de Levedura, 1 g DNA de espermatozóide de salmão, 15 mg ácido fólico, 20 mL tampão fosfato salino [1X], pH 7,2, 1 mg/mL hemina, 10% soro fetal bovino, 10 mL penicilina-streptomicina) mantidos em 26 °C, conforme protocolo estabelecido pela aluna de doutorado Natalia Bellini (IFSC/USP).¹¹⁹

Para determinação da frequência do repique das células, uma contagem em câmara de *Neubauer* foi realizada por 9 dias consecutivos, em duplicata biológica. A frequência do repique é então baseada no tempo de dobra da população de células, que é dada pela equação 2 a seguir.

$$TD = \frac{T \ln 2}{\ln \left(\frac{N_f}{N_i} \right)} \quad (2)$$

Em que TD é o tempo de dobra, T, o intervalo de tempo analisado, N_f, o número final de células (número de células na última contagem), N_i, o número de células ao início da contagem.

7.6.2.2 Ensaios de cultivo celular sob estresse oxidativo

Para investigar o comportamento da NgSBP2 em função do estresse oxidativo, foram realizados testes na cultura na presença de H₂O₂, e na presença de H₂O₂ em meio suplementado com seleneto e selenocisteína, respectivamente. Primeiramente, preparou-se garrafas de 25 cm² com 10 mL de meio ATCC 1034, contendo 50 µM, 100 µM e 200 µM de H₂O₂. Foi então feita a contagem em câmara de *Neubauer* em intervalos de 12 h durante 48 h.

Após esse ensaio, foi realizada a contagem das células sob estresse oxidativo em meio suplementado com seleneto e com selenocisteína, ambos na concentração de 5 µM, nas condições de H₂O₂ a 100 µM e 200 µM. A contagem das células foi feita conforme descrito acima.

Como o foco deste estudo consiste nas análises *in vitro* e *in vivo* da NgSBP2 em formas amebóides, a contagem de células foi feita somente para essa conformação celular, pois é de mais fácil cultivo e não necessita de protocolos de diferenciação. Além disso, a contagem também foi realizada em intervalo de 48 h pois, após esse período 4 vezes maior que o tempo de dobra celular, danos celulares passam a ser observados, o que deve ativar diversos mecanismos oxidoredutores que alteram a estrutura e, conseqüentemente, a função da NgSBP2 em análise.

7.6.3 Obtenção de extratos proteicos de *N. gruberi*

Para obtenção do extrato de proteínas totais de *N. gruberi*, 1×10^6 células amebóides foram lavadas com tampão PBS [1X] a 26 °C. Em seguida, as células foram centrifugadas 1.500 x g, 10 min, 26 °C. O sobrenadante foi removido, e ao *pellet* celular foram adicionados 200 µL de tampão RIPA [1X] (do inglês, *radioimmunoprecipitation assay buffer*) (50 mM Tris/HCl, pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,01% SDS, [1X] coquetel de proteases (Roche)).¹¹⁹⁻¹²⁰ Após a completa dissolução do *pellet* no tampão, o sistema foi submetido a uma centrifugação (10.000 x g, 15 min, 4 °C), a fim de separar o *pellet* do sobrenadante.

7.6.4 Identificação dos truncamentos em extrato de proteína total de *N. gruberi* através de *Western blot* (WB)

Para determinar o título de trabalho, bem como analisar a presença dos truncamentos no extrato proteico total de *N. gruberi*, ensaios de western blot foram realizados. Assim, 60 µg de extrato foram submetidos a um SDS-PAGE 12%, utilizando-se o marcador *Spectra Multicolor Range* (Fermentas). O protocolo de WB foi semelhante ao da seção 7.2.1.1.

As diferenças em relação ao protocolo mencionado anteriormente são os antissoros, títulos utilizados e temperatura de incubação com anticorpo primário. A titulação utilizada para o anticorpo primário foi de 1:1000 para anti-NgSBP2-NT e 1:300 para anti-NgSBP2-CT e a incubação se deu por 16 h, sob agitação, à 4 °C. Para os anticorpos secundários foi utilizada a titulação de 1:5000, sendo anti-*mouse* (Sigma-Aldrich) para NgSBP2-CT e anti-*rabbit* (Sigma-Aldrich) para NgSBP2-NT. A revelação e coleta dos dados ocorreram de modo idêntico ao descrito anteriormente.

7.6.5 Identificação dos parceiros de interação dos truncamentos de NgSBP2 através de ensaios de *pulldown* seguido de espectrometria de massas

Com a finalidade de se determinar os possíveis parceiros de interação de NgSBP2-CT e NgSBP2-NT, ensaios de *pulldown* foram realizados, onde 1 mg de NgSBP2-CT e NgSBP2-NT foram imobilizadas em em 1 mL de resina de Ni²⁺-NTA (Clontech), previamente equilibrada com o tampão de lise. Em seguida, passou-se pela coluna um extrato de proteínas totais de *N. gruberi*, contendo 3 mg de amostra. Após esta etapa, procedeu-se à uma purificação em cromatografia de afinidade com gradiente em etapas até 500 mM de imidazol com uma etapa de lavagem com 100 mM de imidazol.

Todas as etapas foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE 12%. As bandas correspondentes à fração de eluição foram recortadas e preparadas para espectrometria de massas segundo o seguinte protocolo: após a separação das bandas, estas foram descoradas com 50% metanol e 2,5% ácido acético. Esta solução foi retirada do gel para posterior desidratação com adição de 100% acetonitrila. Após a remoção desta solução, a amostra foi evaporada e 10 mM de DTT foram adicionados. O próximo passo foi a alquilação com a adição de 50 mM iodoacetamida. O gel foi então lavado com 100 mM bicarbonato de amônio, submetido à digestão pela adição de 1 µg de tripsina (Promega) seguido da injeção no equipamento para análises dos fragmentos obtidos e identificação dos possíveis parceiros de interação de CT e NT.

Os ensaios de espectrometria de massas foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Mario Sergio Palma e a Dra. Bibiana Monson de Souza (Instituto de Biociências – UNESP – Rio Claro), utilizando o espectrômetro *micrOTOF-QII* (Bruker Daltonics) e a análise dos peptídeos encontrados foi feita através da ferramenta *Mascot Server*.¹²¹

8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 Obtenção dos genes de interesse

8.1.1 Determinação do truncamento da proteína *NgSBP2*

Tentativas iniciais de se obter *NgSBP2 full-length* de forma solúvel se mostraram infrutíferas após inúmeros ensaios de expressão e purificação. Por isso, decidiu-se então truncar a sequência de modo racional para a possível análise dos domínios proteicos separadamente. Assim, os desenhos dos truncamentos foram determinados através de predições *in silico* para a aplicação nos ensaios de expressão e purificação subsequentes.

Como mencionado, a determinação do ponto de truncamento foi realizada considerando as regiões de separação entre os domínios carboxi e amino terminais baseados no *BLASTp*¹¹⁰ (NCBI) (Figura 55) bem como na predição de estruturas secundárias pela ferramenta *SAS*¹¹¹ (PDBSum) (Figura 57).

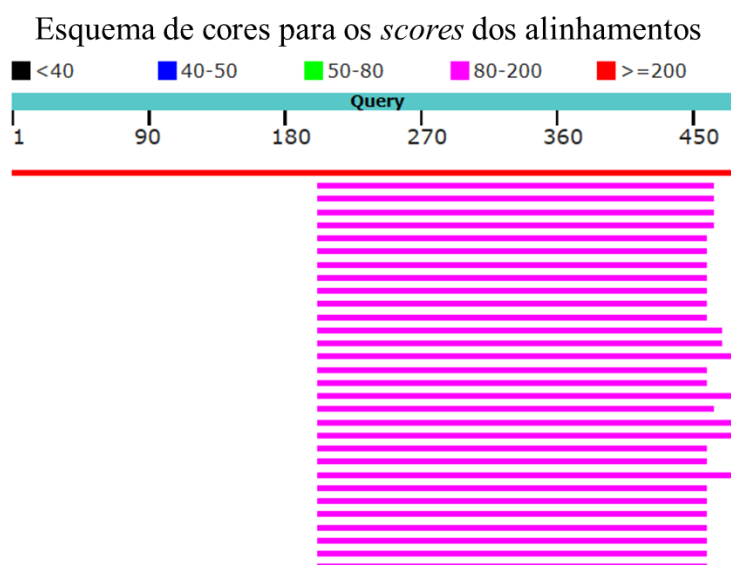


Figura 55 – Resultados obtidos pela ferramenta *BLASTp* (NCBI). Observa-se que a região NT da SBP2 de *N. gruberi* não apresentou alinhamento com nenhuma sequência do banco de dados não redundante, enquanto que a região correspondente ao domínio CT da SBP2 de *N. gruberi* apresentou um alinhamento com SBP2s de outros organismos, com cobertura de 55% e 32% de identidade com a SBP2 de *Scleropages formosus*, um peixe ornamental.¹²²

Fonte: Elaborada pela autora.

Através das análises do *BLASTp*, verifica-se que o domínio NT da SBP2 de *N. gruberi* não possui sequências do banco não redundante (nr) que alinhem com a sequência desta

região. Dessa forma, pode-se observar que não existem proteínas homólogas preditas para NT. Da mesma maneira, observa-se que o domínio NT da *NgSBP2* não apresenta um domínio conservado a que ele pertence quando se analisa a predição de domínios através da ferramenta PFAM (Figura 56).¹²³



Figura 56 – Predição de domínios conservados através da ferramenta *PFAM* para a *NgSBP2*. Verifica-se que a região amino terminal não possui domínios conservados com o banco de dados, enquanto que a região carboxi-terminal apresenta o domínio Ribossomal L7Ae, representado em verde, comum para SBP2s.

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, para a construção CT, verifica-se o domínio Ribossomal L7Ae, comum para SBP2s, e observa-se o alinhamento com SBP2s de outros organismos, sendo a cobertura de aproximadamente 55% e identidade sequencial de 32% com a SBP2 de *Scleropages formosus*, um peixe ornamental.¹²² Todas as sequências de SBP2s alinhadas com o *query* iniciam o alinhamento na posição 203, que corresponde ao aminoácido Leucina (Leu) da *NgSBP2* predita.

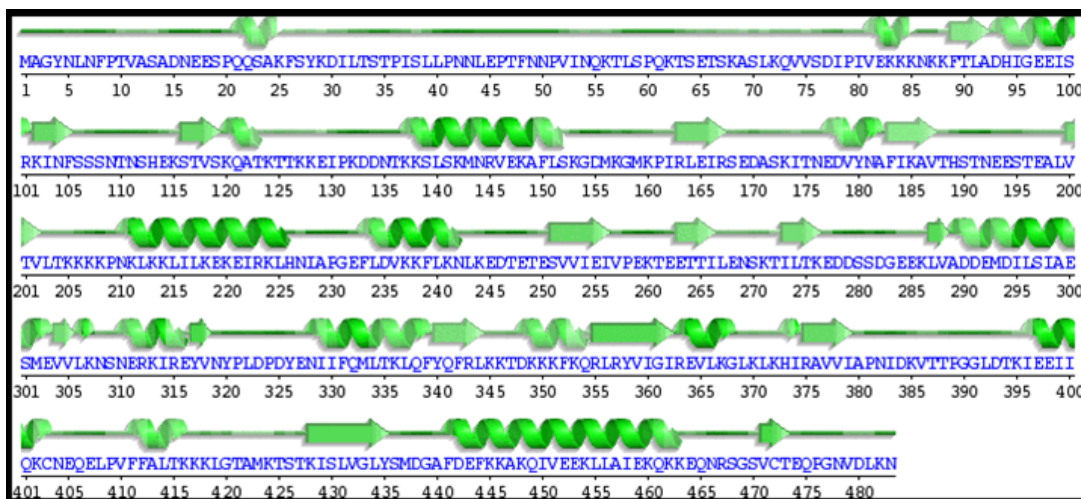


Figura 57 – Resultados obtidos pela análise do SAS – PDBSum. Verifica-se que a região da L203 é predita como uma região não estruturada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pelas análises da ferramenta *SAS*,¹¹¹ que faz um alinhamento junto ao banco de dados de estruturas de proteínas (PDB) resultando em características de estruturais, verifica-se que a região em torno do resíduo Leu203 é prevista por não possuir estruturação secundária, sendo escolhida para o truncamento da sequência de *NgSBP2*.

8.1.2 Clonagem dos genes *sbp2CT* e *sbp2NT* de *N. gruberi* em vetores de expressão

Para a obtenção dos genes clonados em vetores de expressão, os seguintes passos foram realizados: amplificação a partir de uma alíquota de DNA genômico de *N. gruberi*, clonagem em vetor de propagação *pJET1.2 blunt* (ThermoScientific), digestão com enzimas de restrição e clonagem em vetores de expressão, sendo utilizado os vetores pET28a(+) (Novagen) para a construção NT e pET-TEV não comercial para a construção CT. Todas as etapas podem ser observadas na Figura 58 a seguir.

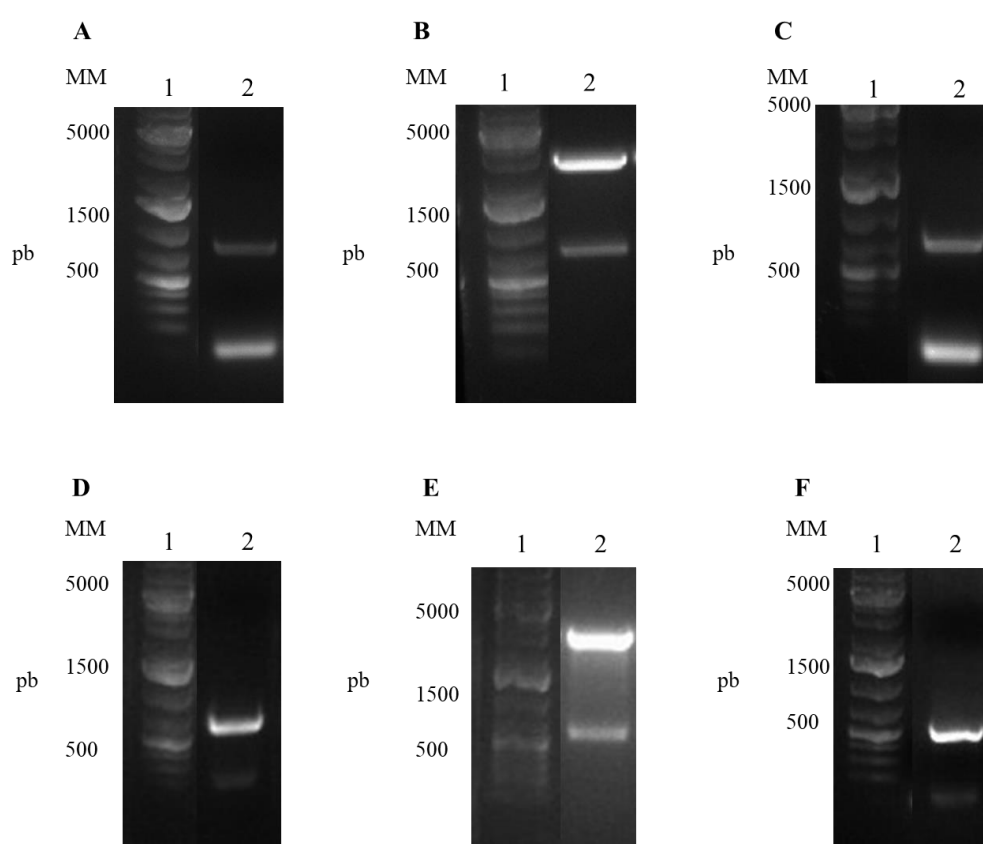


Figura 58 – Eletroforese em gel de agarose 1% após coloração com *Sybr Safe*[®] correspondentes às etapas realizadas para obtenção dos genes *sbp2CT* (A)-(C) e *sbp2NT* (D)-(F) de *N. gruberi* em vetores de expressão. (A) e (D) Amplificação através de PCR a partir de uma alíquota de DNA genômico, resultando nas bandas de tamanho esperado, sendo 849 pb para *sbp2CT* e 603 pb para *sbp2NT*. (B) e (E) Digestão com enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* após a ligação dos insertos no vetor de propagação *pJET1.2 blunt*. Observam-se duas bandas em cada gel, sendo as correspondentes ao vetor (~3000 pb) e as correspondentes aos insertos de interesse com seus respectivos tamanhos. (C) e (F) Confirmação por PCR após ligação nos vetores de expressão, sendo pET-TEV não comercial para o gene *sbp2CT* e pET28a(+) (Novagen) para o gene *sbp2NT*. Novamente observam-se as bandas de tamanho esperado. As canelatas (1) correspondem ao marcador molecular *Gene Ruler 1kb Plus* (Fermentas), e as canaletas (2) as etapas descritas acima.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 58A, B e C, tem-se as etapas de clonagem para o gene *sbp2CT* de *N. gruberi*, enquanto que na Figura 58D, E e F, as mesmas etapas para o gene *sbp2NT* de *N.*

gruberi. Nas Figuras 58 (A) e (D) verifica-se a amplificação dos genes de interesse à partir de DNA genômico através da PCR, obtendo-se as bandas referentes à: 849 pb para *Ngspb2CT* e 603 pb para *Ngspb2NT*. O passo seguinte foi a clonagem em vetor de propagação *pJET1.2 blunt* (ThermoScientific) com posterior digestão com as enzimas de restrição, Figuras 58 (B) e (E). Na digestão observam-se as bandas correspondentes ao vetor de propagação (~3000 pb) e as bandas correspondentes a cada um dos insertos.

Após a digestão, as bandas foram excisadas do gel, o DNA extraído conforme mencionado anteriormente. Então, foi realizada a ligação em vetor de expressão, e a confirmação se deu por PCR (Figuras 58 (C) e (F)) e sequenciamento.

Deste modo, tendo os genes confirmados nos vetores de expressão, foi possível o início dos ensaios de expressão para os truncamentos CT e NT de *N. gruberi*.

8.2 Obtenção dos truncamentos da proteína NgSBP2 e elemento SECIS

8.2.1 Teste de expressão inicial

Para o teste de expressão, ambos os sistemas (*E. coli* BL21 λ DE3 pETTEV – *spb2CT* e *E. coli* BL21 λ DE3 pET28a(+) – *spb2NT*) foram crescidos até a DO_{600nm} de 0,6 e então induzidos com adição de 1 mM de IPTG. O tempo de 3-18 h foi monitorado e o resultado pode ser observado na Figura 59 a seguir.

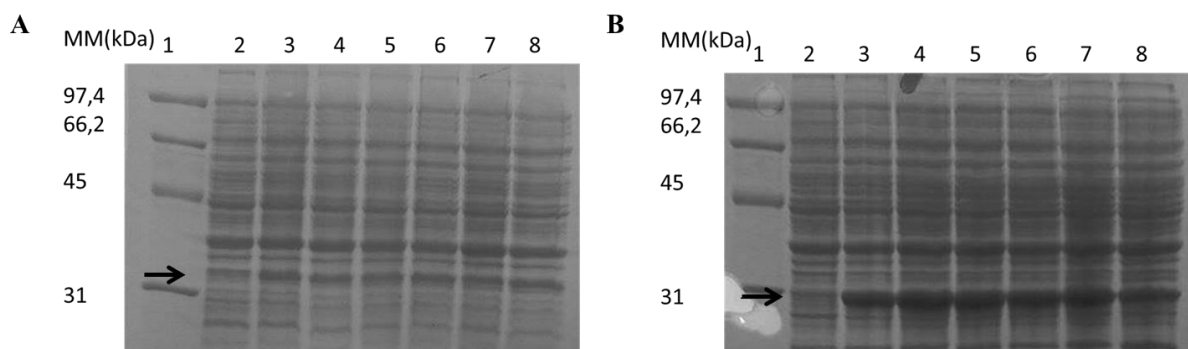


Figura 59 – SDS-PAGE 12% para o teste de expressão de (A) *NgSBP2-CT* e (B) *NgSBP2-NT*. (1) Marcador molecular; (2) cultura não induzida; (3)-(8) indução com 1 mM de IPTG, sendo monitorados os tempos de 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h e 18 h de indução, respectivamente. Com 3 h de indução é possível observar um aumento da intensidade das bandas correspondentes a cada uma das proteínas, sendo indicadas com uma seta.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na Figura 59, tem-se o teste para o truncamento CT e truncamento NT da SBP2 de *N. gruberi*, respectivamente. Nas canaletas 2, tem-se as amostras não induzidas. Nas canaletas de 3-8, tem-se a indução com IPTG para diferentes tempos, de 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h e 18 h.

Observa-se que no tempo de 3 h de indução há um aumento da intensidade das bandas correspondentes às proteínas de interesse (23,8 kDa para *NgSBP2-NT* e 33,9 kDa para *NgSPB2-CT*), sendo indicadas com uma seta na Figura 59.

Dessa forma, o tempo de 3 h foi determinado para a expressão das amostras em larga escala. Entretanto, para confirmar que de fato, as bandas correspondem as proteínas de interesse, estas foram submetidas ao ensaio de *Western blot* para detecção da His-TAG fusionada.

8.2.1.1 Confirmação da expressão proteica por *Western blot* (WB)

A confirmação da presença da His-TAG nas amostras induzidas e não iduzidas foi realizada com a finalidade de avaliar a expressão das proteínas de interesse. Por isso, as amostras não induzidas e induzidas por 3 h foram submetidas a uma eletroforese em gel 12% utilizando o *Spectra Broad Range* (Fermentas) como marcador molecular. O resultado pode ser observado na Figura 60 a seguir.

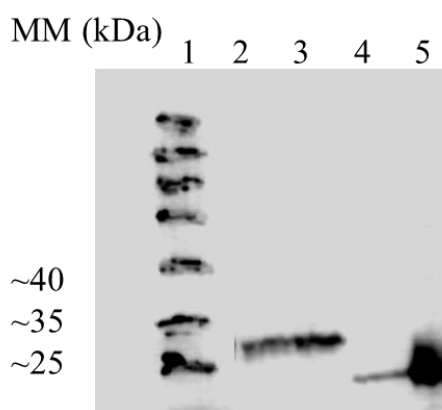


Figura 60 – *Western blot* realizado para detecção da His-TAG. (1) *Spectra Broad Range* (Fermentas); (2) *NgSBP2-CT* não induzida; (3) *NgSBP2-CT* induzida com 1 mM de IPTG por 3 h; (4) *NgSBP2-NT* não induzida e (5) *NgSBP2-NT* induzida com 1 mM de IPTG por 3 h. Verifica-se, primeiramente, a presença da His-TAG, indicando que as bandas observadas no teste de expressão correspondem às proteínas de interesse fusionada a cauda de hexa-histidinas. Além disso, observa-se um aumento da intensidade nas amostras induzidas, indicando que houve a super expressão das proteínas de interesse.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando-se a presença da His-TAG, verifica-se que as bandas observadas no SDS-PAGE 12% do teste de expressão correspondem às amostras de interesse. Na Figura 60, as canaletas 2-3 correspondem às amostras de *NgSBP2-CT* e as canaletas 4-5, às amostras de *NgSBP2-NT*, sendo na ordem: amostras não induzidas e amostras induzidas por 3 h com 1

mM de IPTG. As amostras não induzidas apresentam sinal para a presença da His-TAG pois o sistema utilizado não possui uma redução da expressão basal da célula, como é o caso da cepa *E coli* pLysS,¹²⁴ por exemplo.

Deste modo, as proteínas foram expressas em maior escala e então, procedeu-se com o protocolo de purificação.

8.2.2 Estabelecimento de protocolo para a purificação dos truncamentos da NgSBP2

Para purificação de NgSBP2-CT e NgSBP2-NT foi realizada uma cromatografia de afinidade, na qual 3 mL de resina de Ni²⁺-NTA (Clontech) foram imobilizadas em um suporte e equilibradas com o tampão de lise. Em seguida, procedeu-se com a cromatografia de afinidade em que se aumentou a concentração de imidazol para eluição das amostras (Figura 61).

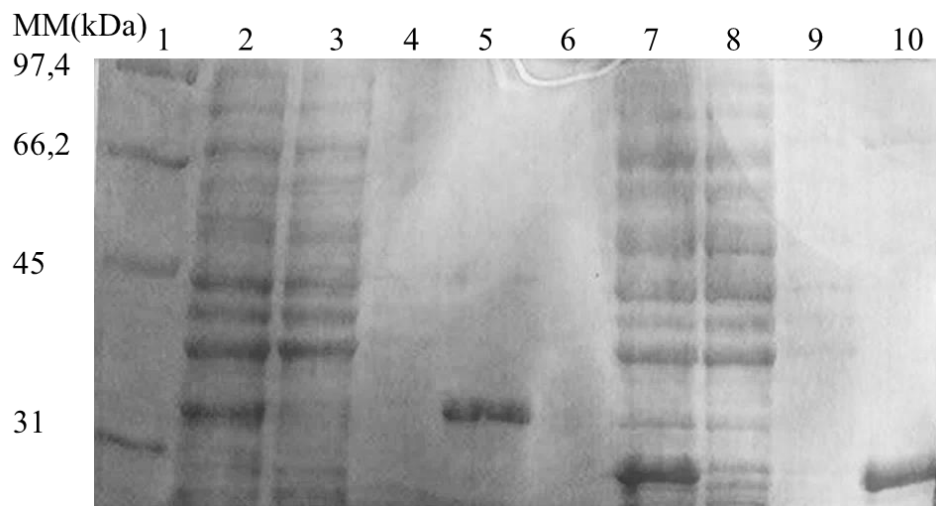


Figura 61 – SDS-PAGE 12% resultante da etapa de purificação dos truncamentos da NgSBP2-CT (2)-(5) e NgSBP2-NT (7)-(10). (1) Marcador molecular; (2) Extrato celular bruto; (3) Fração não interagente à coluna; (4) Lavagem com 20 mM de imidazol; (5) Eluição de NgSBP2-CT com 500 mM de imidazol. (7) Extrato celular bruto; (8) Fração não interagente à coluna; (9) Lavagem com 20 mM de imidazol; (10) Eluição de NgSBP2-NT com 500 mM de imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

No SDS-PAGE 12% acima, a canaleta 1 corresponde ao marcador molecular. As canaletas (2)-(5) correspondem ao processo de purificação de NgSBP2-CT e as canaletas (7)-(9), ao processo de purificação de NgSBP2-NT. As canaletas (2) e (7) correspondem ao extrato celular bruto, em que é possível ver a super expressão heteróloga das amostras de interesse. Esse extrato foi adicionado à coluna previamente equilibrada com tampão de lise e as frações não ligadas (3) e (8) mostram que grande parte das proteínas não se ligou à coluna e que as proteínas de interesse ligaram-se à coluna. No processo de lavagem (4) e (9) verifica-

se que alguns contaminantes são eliminados e as proteínas de interesse ainda permanecem ligadas à coluna, sendo estas eluídas com 500 mM de imidazol (5) e (10).

Verifica-se, dessa forma, que ambas as proteínas foram purificadas com elevado grau de pureza, não sendo necessária nenhuma etapa extra de purificação. Assim, as proteínas precisam somente passar por um processo de diálise para remoção do excesso de imidazol para serem submetidas à caracterização biofísica.

8.2.3 Obtenção do elemento SECIS

Uma das propostas deste estudo é verificar a interação da putativa NgSBP2 com o elemento SECIS. Por isso, foi necessária a obtenção e enovelamento deste RNA. Dessa forma, primeiramente foi realizada uma amplificação utilizando-se olinucleotídeos sobrepostos (Figura 62).

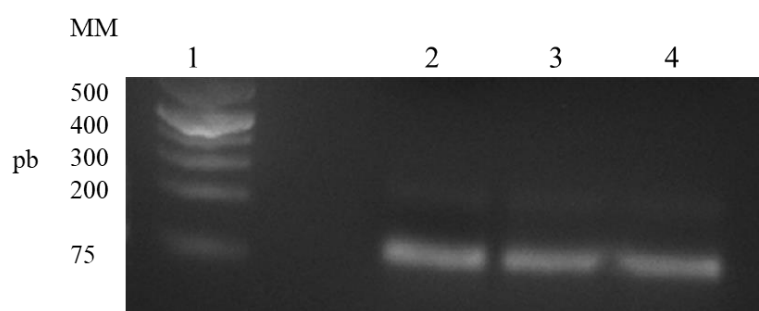


Figura 62 – Gel de agarose 2% para obtenção do DNA molde do elemento SECIS. (1) Padrão de pares de bases (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* - ThermoScientific); (2)-(4) DNA molde do elemento SECIS com tamanho esperado, de 75 pb.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando o gel de agarose 2%, verifica-se que a produção do DNA molde para o elemento SECIS ocorreu de modo satisfatório, uma vez que as bandas no gel possuem o tamanho esperado para este elemento, de 75 pb. Assim, essas bandas foram excisadas do gel para extração do DNA e este foi então submetido à transcrição *in vitro*, para obtenção do RNA. Após a transcrição, o RNA foi então enovelado e o monitoramento do enovelamento foi realizado através de dicroísmo circular.

8.2.3.1 Enovelamento do elemento SECIS monitorado por Dicroísmo circular (CD)

Para monitorar o enovelamento do elemento SECIS, este foi preparado a 12 μ M em água livre de RNases contendo 20 mM de MgCl₂. Os espectros de CD podem ser visualizados na Figura 63A a seguir. A avaliação da T_m do SECIS foi realizada através do

monitoramento dos máximos em 268 nm Figura 63B, comprimento de onda usual para análises de ácidos nucleicos,^{116,125} através do ajuste de *Boltzmann*.

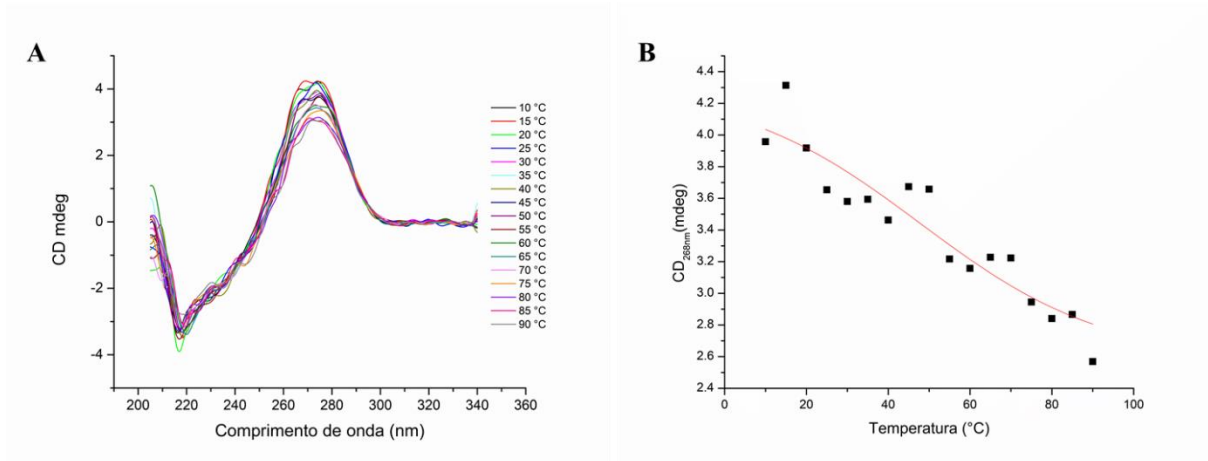


Figura 63 – Monitoramento do enovelamento do elemento SECIS por CD. (A) Espectros de CD variando-se a temperatura de 90 °C a 10 °C. Observa-se um aumento do sinal em 268 nm com a diminuição da temperatura, indicando um maior pareamento de bases formado com o perfil em “S”. (B) Monitoramento dos máximos em 268 nm. O ajuste de *Boltzmann* (em vermelho) revela uma $T_m = (47.9 \pm 2.7) ^\circ\text{C}$.

Fonte: Elaborada pela autora.

As estruturas de RNA apresentam a curva característica em “S”, que indica o enovelamento e pareamento ordenado das bases nitrogenadas. A diferença observada no valor total do sinal de CD está relacionada à quantidade de pareamento de bases no enovelamento do elemento de RNA. Observa-se na Figura 63A, que o elemento SECIS apresenta um aumento do sinal (mdeg) com a redução da temperatura. Apesar de em 90 °C o elemento aparentar já estar enovelado, tem-se que há um aumento no pareamento de bases, indicando a formação da melhor estrutura secundária para o RNA ao final do processo de redução térmica. O elemento SECIS anotado por nosso grupo pertence à Tioredoxida redutase, uma selenoproteína, e é classificado como forma 2.⁶¹

A determinação da T_m do SECIS foi realizada através do monitoramento dos máximos em 268 nm (Figura 54B). O ajuste de *Boltzmann* resultou em $T_m = (47,9 \pm 2,7) ^\circ\text{C}$ em quem dessa forma, garante-se o enovelamento do elemento de RNA para as análises, e, além disso, a T_m indica que o SECIS é estável para a temperatura de análises de interação com os truncamentos da NgSBP2.

8.3 Caracterização biofísica dos truncamentos de NgSBP2

8.3.1 Análise do perfil de estruturas secundárias e estabilidade térmica por Dicroísmo circular (CD)

Como já mencionado, não existem até o momento estruturas de SBP2s determinadas por cristalografia de macromoléculas. Dessa forma, o entendimento do conteúdo de estruturas secundárias da NgSBP2 auxilia a aumentar o conteúdo de informações em relação a essa proteína putativa. A primeira técnica utilizada para avaliar o perfil de estruturas secundárias foi por dicroísmo circular (CD). Os espectros em função da temperatura, bem como o monitoramento dos mínimos em 208 nm para NgSBP2-CT podem ser observados na Figura 64 abaixo.

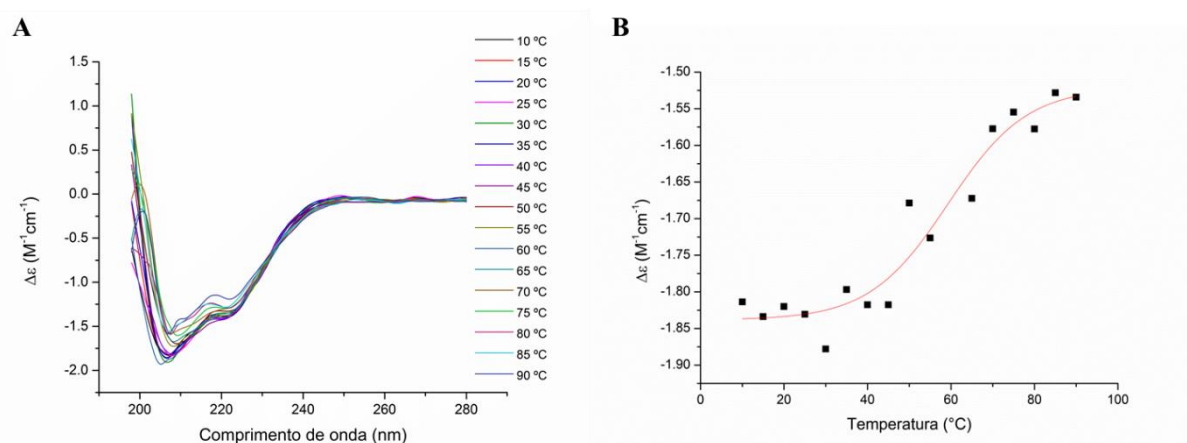


Figura 64 – Medidas de CD para NgSBP2-CT. (A) Espectros em função da temperatura. Observa-se uma elevada estabilidade térmica para a amostra, sendo que esta começa a ter perda de estruturas secundárias a partir de 55 °C. (B) Monitoramento dos mínimos em 208 nm, obtendo, através do ajuste de *Boltzmann*, uma $T_m = (59,3 \pm 3,8)$ °C.

Fonte: Elaborada pela autora.

O monitoramento dos mínimos globais em 208 nm seguido do ajuste de *Boltzmann* resultou em uma elevada T_m para a amostra, sendo $T_m = (59,3 \pm 3,8)$ °C. Os espectros de CD da NgSBP2-CT refletem um perfil de estruturas não ordenadas e estruturas do tipo $\alpha + \beta$. Após as análises pelo *CDPro* (Tabela 14), verificou-se que o truncamento CT possui mais estruturas do tipo β .

Além disso, os espectros em função da temperatura para NgBSP2-NT bem como a curva de desnaturação térmica também foram analisados utilizando mesma metodologia (Figura 65).

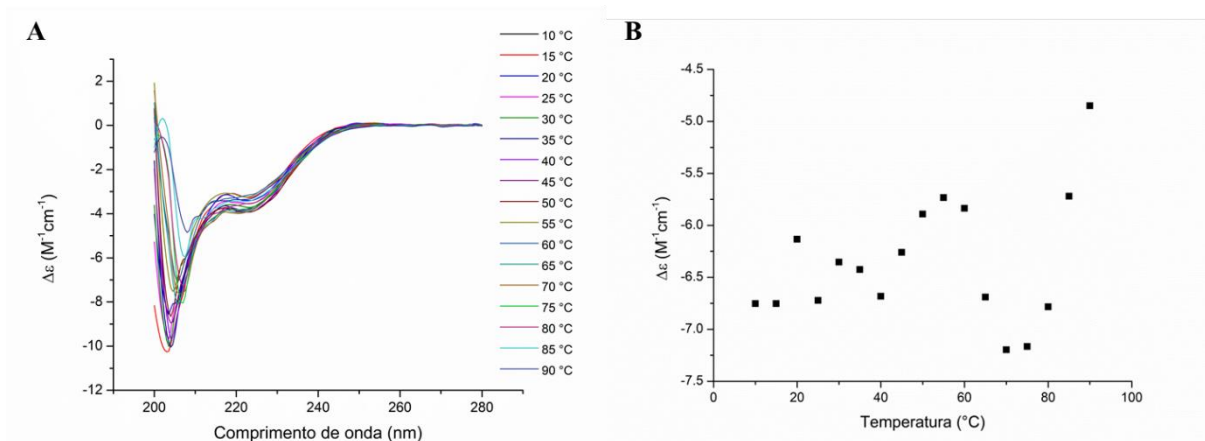


Figura 65 – Medidas de CD para *NgSPB2-NT*. (A) Espectros em função da temperatura. Observa-se um perfil de estruturas não ordenadas. (B) Curva de desnaturação térmica, mostrando que não é possível determinar a T_m por esta técnica, indicando novamente que *NgSPB2-NT* deve ter muitas regiões de desordem.

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil dos espectros de CD observados para *NgSPB2-NT* indicam que, provavelmente, este truncamento seja desordenado.¹²⁶ A análise de dados de estruturas desordenadas, mostrou-se que os resíduos pertencentes à α -hélices e folhas- β não são geralmente parte de uma hélice ou uma fita, mas sim resíduos isolados ou pequenos segmentos que fazem o *ensemble* de conformações em uma conformação não estruturada.¹²⁷ Dessa forma, também é necessário a deconvolução dos dados para obtenção do percentual de estruturas secundárias desta proteína.

Os resultados obtidos pelas análises no CDPro podem ser observados na Tabela 14 a seguir.

Tabela 14 – Análise do perfil de estruturas secundárias dos truncamentos de *NgSPB2*, utilizando o banco de dados otimizado para estimar estruturas secundárias de proteínas desordenadas.¹¹² unrd: não estruturada.

Amostra	α -hélice (%)	fita- β (%)	voltas (%)	unrd (%)
<i>NgSPB2-CT</i>	8,7	30,7	19,7	40,9
<i>NgSPB2-NT</i>	2,7	37,4	16,8	43,1

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se grande percentual de estruturas não ordenadas, em ambos os truncamentos. Para validar esses dados e compreender melhor as estruturas secundárias das proteínas em estudo, medidas de espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR) foram implementadas.

8.3.2 Análise do conteúdo de estruturas secundárias através de Espectroscopia Infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR)

Como as medidas de CD indicam que as proteínas sejam compostas majoritariamente de regiões de desordem estrutural, medidas de FTIR foram realizadas a fim de se validar os dados obtidos. É importante ressaltar que para a obtenção do percentual de estruturas secundárias de proteínas através do CD, é necessário haver um banco de dados cujas proteínas possuem estrutura conhecida. Sreema e seus colaboradores¹¹² otimizaram um banco de dados para analisar proteínas desordenadas, porém este banco contém apenas 8 proteínas, reduzindo assim a confiabilidade na deconvolução espectral. Por isso, as medidas de FTIR são importantes, pois elas consideram a absorção das bandas Amida I, as quais são provenientes das ligações amida entre os aminoácidos e independem de um banco de dados para a determinação do conteúdo de elementos de estrutura secundária das amostras analisadas.¹²⁸⁻¹²⁹

As amostras de ambos os truncamentos foram analisadas em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto). Primeiramente, uma análise do espectro IR-médio das varreduras para cada truncamento foi realizada. Em seguida, os *spikes* experimentais foram removidos, sendo esta etapa baseada na avaliação do desvio do espectro de segunda derivada, o qual não seria aceito caso o desvio das frequências ultrapassassem um número maior que 6 cm^{-1} . Valores abaixo deste são considerados toleráveis, pois as bandas correspondentes aos assinalamentos são largas e estes se mantêm estáveis dentro dessa variação.

Para a determinação do conteúdo de estruturas secundárias dos truncamentos foram utilizadas cinco curvas gaussianas para o ajuste da banda da Amida-I. As posições centrais de cada gaussiana foram estabelecidas de acordo com as estruturas secundárias e, assim, os assinalamentos previamente conhecidos para cada estrutura secundária foram realizados. (Figura 66)

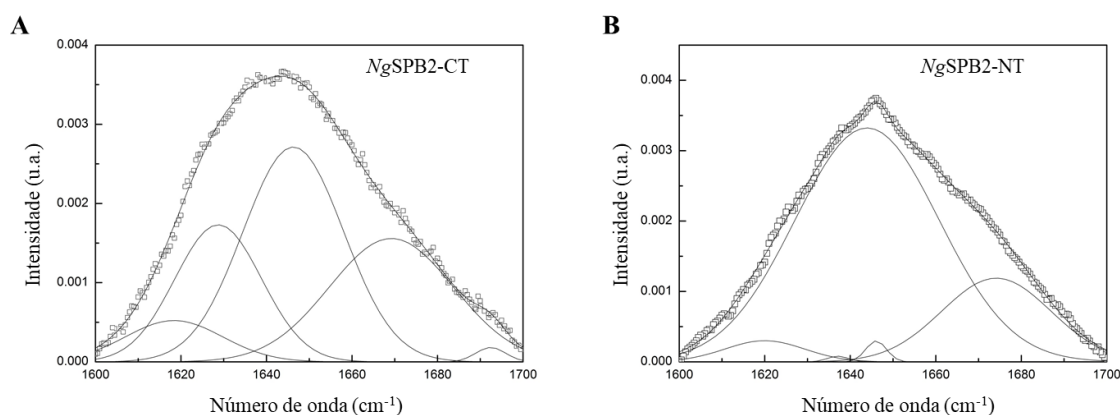


Figura 66 – Determinação do percentual de estruturas secundárias por FTIR. Análise da banda Amida-I de (A) *NgSBP2-CT* e (B) *NgSBP2-NT*.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (IBILCE/UNESP- São José do Rio Preto)

O ajuste dos dados experimentais com a deconvolução, utilizando os 5 elementos de estrutura secundária analisados, apresentou um ajuste de $R=0,998$ (99,8%) e pode ser observado na Tabela 15.

Tabela 15 – Percentual de estruturas secundárias para os truncamentos da *NgSBP2*. β_{\parallel} , fita β paralela, β_{\perp} , fita β anti-paralela.

Estrutura secundária	<i>NgSBP2-CT</i>	Estrutura secundária	<i>NgSBP2-NT</i>
β_{\parallel} (1618 cm^{-1})	8%	β_{\parallel} (1620 cm^{-1})	4%
β_{\parallel} (1628 cm^{-1})	22%	β_{\parallel} (1637 cm^{-1})	1%
Desordenada (1646 cm^{-1})	40%	Desordenada (1643 cm^{-1})	74%
β_{\perp} (1669 cm^{-1})	28%	Coil estendido (1646 cm^{-1})	1%
β_{\perp} (1692 cm^{-1})	2%	β_{\perp} (1674 cm^{-1})	20%

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (IBILCE/UNESP-São José do Rio Preto).

Com os resultados obtidos é possível verificar que não há estruturas do tipo α para ambos os truncamentos. Além disso, ambos são compostos majoritariamente por estruturas não ordenadas. Portanto, juntamente com o perfil obtido pelas análises de CD e através da deconvolução dos dados de FTIR, observa-se que o truncamento NT da *NgSBP2* é uma proteína intrinsecamente desordenada (*Intrinsically Disordered Protein*, IDP).

Em contrapartida para CT da *NgSBP2*, observa-se que é uma proteína altamente flexível, sendo composta principalmente por fitas β , assim como esperado pelo perfil dos espectros de CD. As diferenças observadas por ambas as técnicas podem ser justificadas pelo uso do banco de dados de CD, o qual precisaria conter um maior número de amostras.

Após a determinação do perfil de estruturas secundárias, medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas a fim de se determinar o diâmetro hidrodinâmico, bem como avaliar se o mesmo altera em função da concentração, característico para IDPs.¹³⁰

8.3.3 Determinação do diâmetro hidrodinâmico em solução através Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As primeiras medidas de DLS foram feitas 0,2 mg/mL para avaliar o diâmetro hidrodinâmico em solução. Os ensaios foram realizados a 25 °C e os gráficos de espalhamento podem ser observados na Figura 67 a seguir.

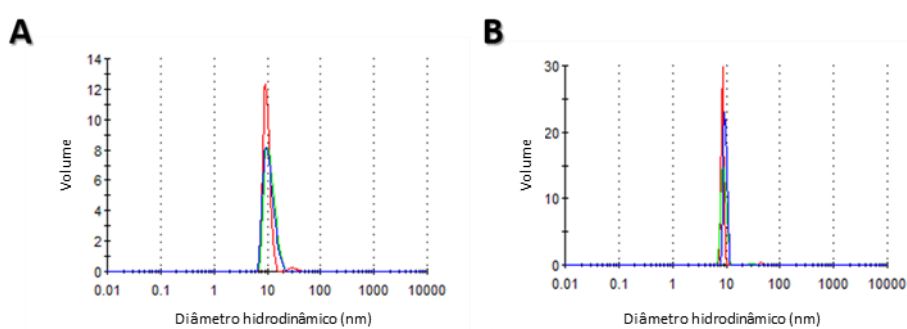


Figura 67 - Medidas de Espalhamento de luz dinâmico para (A) *NgSBP2-CT*, com diâmetro hidrodinâmico de $(10,2 \pm 1,5)$ nm e (B) *NgSBP2-NT*, com diâmetro hidrodinâmico de $(9,8 \pm 0,6)$ nm. O experimento foi realizado em triplicata e cada curva corresponde a cada uma das medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

O experimento foi realizado em triplicata experimental, e cada uma das curvas representa cada medida. Assim, resumem-se na Tabela 16, os valores obtidos das medidas de espalhamento de luz dinâmico dos truncamentos CT e NT da *NgSBP2*.

Tabela 16 - Resultados da medida de DLS dos truncamentos CT e NT da *NgSBP2* baseado em modelo esférico de proteína.

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico (nm)
<i>NgSPB2-CT</i>	$10,2 \pm 1,5$
<i>NgSPB2-NT</i>	$9,8 \pm 0,6$

Fonte: Elaborada pela autora.

Através desta tabela pode-se verificar que ambas as proteínas possuem altos valores de diâmetro hidrodinâmico, indicando que ou a proteína não assume forma globular, ou assume estados oligoméricos em solução. Como não se tem informações estruturais de SBP2s, e considerando-se as informações obtidas pelas medidas de CD e FTIR, acredita-se que tanto CT, como NT não apresentam forma globular em solução, uma vez que são compostas majoritariamente por estruturas desordenadas. Esta hipótese será validada através das medidas

de espalhamento de raios-X a baixo angulo (SAXS) com análises de *Kratky plot* e verificação da distribuição de R_g nos *ensemble*.

8.3.4 Análise da estabilidade térmica e determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na desnaturação proteica por Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para determinar os parâmetros termodinâmicos de desenovelamento dos truncamentos da NgSBP2, medidas de Calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram realizadas para cada uma das amostras em colaboração com o Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (UCSD-EUA). Os resultados das medidas de DSC podem ser observados no termograma a seguir (Figura 68).

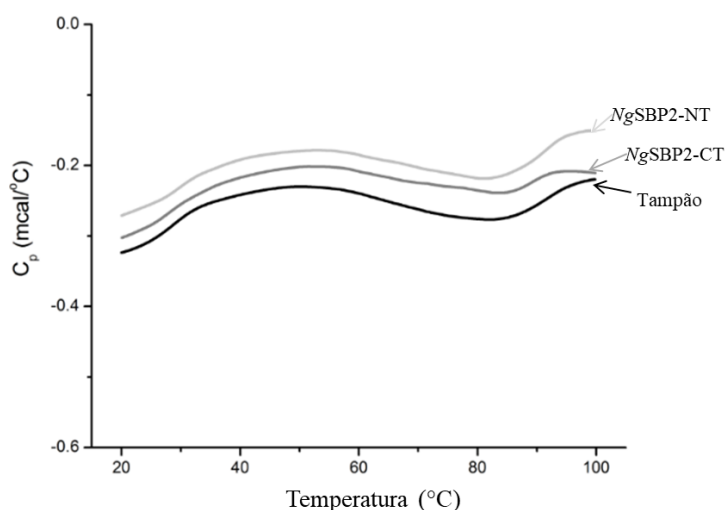


Figura 68 – Termogramas de DSC obtidos para NgSBP2-NT, NgSBP2-CT. Observa-se uma transição do tipo não-cooperativa para as amostras. Dessa forma, não foi possível determinar o valor da T_m para os truncamentos da proteína interagente ao elemento SECIS de *N. gruberi*.

Fonte: Elaborada pela autora com a colaboração do Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (UCSD-EUA).

Através do termograma obtido, verifica-se que ambas as proteínas não apresentam nenhuma transição do tipo cooperativa, seja endotérmica ou exotérmica. Dessa forma, não foi possível obter os valores da capacidade térmica das amostras (C_p), nem do valor da temperatura de *melting* através desta técnica.

Observa-se no termograma que a linha de base do tampão utilizado para a análise apresenta o mesmo perfil das amostras em análise, indicando que o perfil observado para as amostras é relativo ao tampão utilizado. Como discutido anteriormente, ambas as proteínas possuem maior percentual de estruturas não ordenadas, sendo o truncamento NT de NgSBP2

considerado uma IDP. Essa classe de proteínas geralmente não apresenta cooperatividade positiva na transição.¹³¹⁻¹³⁴

Além disso, a ausência de sinal nas medidas de DSC indica que as proteínas sofrem grande influência das regiões não ordenadas, e assim, não há nenhum tipo de cooperatividade em relação ao desenovelamento das amostras em estudo,¹³⁵ principalmente em relação à NgSBP2-CT.

Dessa forma, verifica-se grande coerência dos dados obtidos até aqui. Como visto da literatura, o domínio amino-terminal da SBP2 não necessariamente está ligado à via de incorporação de selenocisteína. Os dados obtidos até o momento indicam que o domínio amino-terminal na NgSBP2 putativa de *N. gruberi* é uma IDP, e assim, pode ser promíscua na sua interação, podendo então interagir com diversos parceiros e, deste modo, estar ou não envolvida com a via de Sec. Para compreender quais são os parceiros de interação de NgSBP2-NT, ensaios de *pull-down* seguidos de espectrometria de massas foram realizados e serão discutidos mais adiante.

Antes de analisar os dados de interação, ensaios de caracterização estrutural dos truncamentos foram realizados com a finalidade de se compreender melhor essas regiões de desordem.

8.4 Caracterização estrutural de NgSBP2

8.4.1 Análise em solução por Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Uma das técnicas utilizadas para caracterização estrutural das amostras em solução é o Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Como foi visto anteriormente, ambas as proteínas possuem um grande percentual de estruturas desordenadas. Dessa forma, a primeira análise feita por SAXS foi o gráfico de *Kratky*, que fornece informações de enovelamento e flexibilidade da amostra em estudo (Figura 69).¹³⁶ As curvas de espalhamento experimentais encontram-se no ANEXO 4.

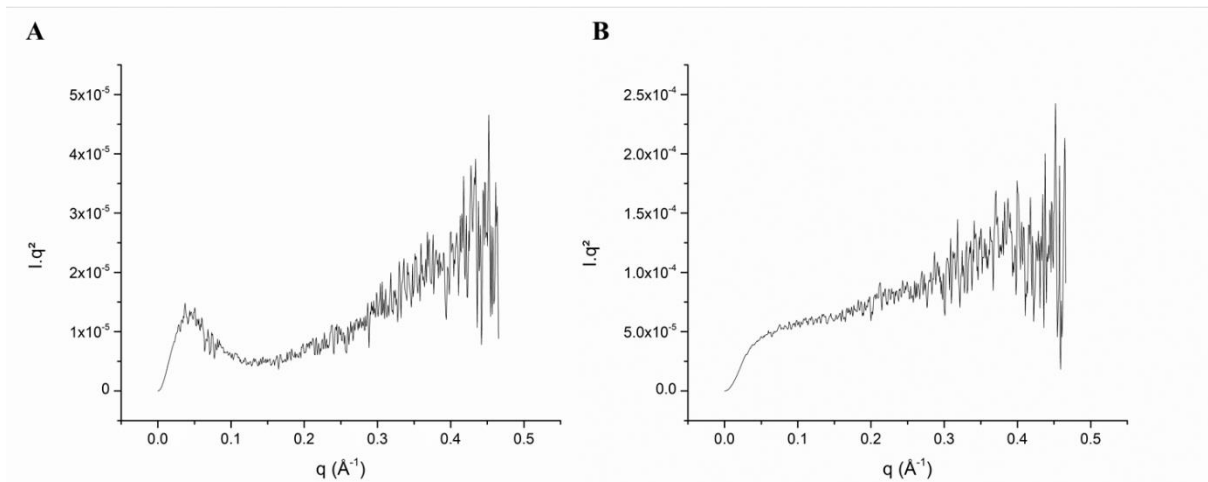


Figura 69 – Gráficos de *Kratky* para (A) NgSBP2-CT e (B) NgSBP2-NT. Verifica-se que o truncamento CT é altamente flexível enquanto que o truncamento NT é desestruturado.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar nos gráficos de *Kratky* dois perfis distintos para cada um dos truncamentos de NgSBP2. Sendo que para o truncamento CT, observa-se um perfil similar a uma gaussiana, seguido de um aumento em Iq^2 com o aumento do módulo do vetor de espalhamento (q). Isso indica que a proteína em análise possui regiões muito flexíveis, mas ainda apresenta uma região enovelada, uma vez que o perfil apresentado não é de completa desordem.

Por outro lado, o gráfico de *Kratky* para o truncamento NT não apresenta a distribuição localizada para baixos ângulos de espalhamento, mostrando apenas o perfil de proteína não estruturada. O resultado obtido por *Kratky* ajudam a corroborar com os dados observados nos experimentos anteriores, indicando que CT é altamente flexível (composição de 40% de estruturas do tipo não ordenada) e que NT é uma IDP (74% de estruturas do tipo não ordenada).

Como ambas as proteínas não são globulares e possuem regiões de desordem, espera-se que possa haver múltiplos *ensembles* de conformações em solução, ou seja, uma heterogeneidade conformacional.^{114,137} Desta forma, o melhor tratamento dos dados não é feito conforme no Capítulo I deste estudo, mas sim analisando quais são as possíveis conformações em solução que as proteínas apresentam. Para isso, o programa *EOM* é utilizado, o qual analisa os *ensembles* em solução, gerando, primeiramente, um conjunto de N modelos (*pool*) independentes. Em seguida, um algoritmo é aplicado para a seleção de um *ensemble* e aquele que melhor descreve o dado experimental é selecionado.¹¹⁵ Os resultados obtidos para NgSBP2-CT podem ser observados a seguir (Figura 70).

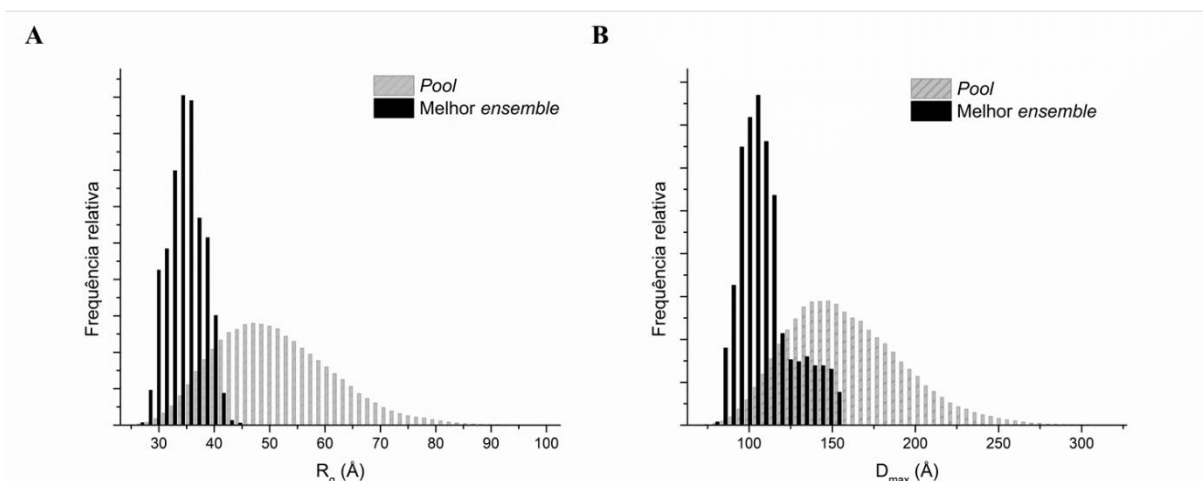


Figura 70 – Análises utilizando *EOM* para *NgSBP2-CT*. (A) Distribuição de R_g , sendo em cinza a distribuição do *pool* de conformações gerados pelo programa. E em preto, o *ensemble* que melhor se ajusta aos dados experimentais. Observa-se que a distribuição apresenta uma pequena variação, sendo o pico máximo em 34,1 Å. (B) Distribuição de D_{max} . As cores representam o mesmo mencionado anteriormente, Verifica-se uma distribuição mais ampla, com máximo em 104,5 Å.

Fonte: Elaborada pela autora.

De mesmo modo, os resultados para o truncamento NT de *NgSBP2* podem ser visualizados na Figura 71 a seguir.

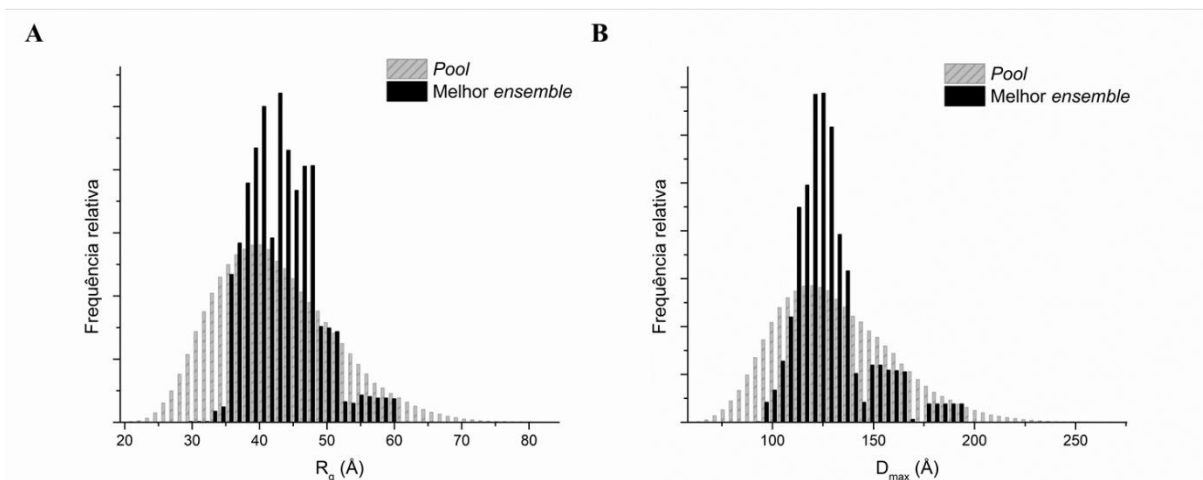


Figura 71 - Análises utilizando *EOM* para *NgSBP2-NT*. (A) Distribuição de R_g , sendo em cinza a distribuição do *pool* de conformações gerados pelo programa. E em preto, o *ensemble* que melhor se ajusta aos dados experimentais. Observa-se que a distribuição apresenta variação maior, indicando várias populações diferentes. (B) Distribuição de D_{max} . As cores representam o mesmo mencionado anteriormente, Verifica-se uma distribuição mais ampla, com D_{max} variando de 96,3 a 192,8 Å.

Fonte: Elaborada pela autora

Pelos histogramas obtidos pelo *EOM*, verifica-se que a população que melhor representa o dado experimental de *NgSBP2-CT* possui valores de R_g e D_{max} menores do que o *pool* de modelos gerados, indicando que o melhor modelo é mais compacto em comparação ao *pool*. Nota-se também que os valores são centralizados em torno de um máximo em R_g , indicando que a variação da distribuição de outras conformações é muito pequena, sendo

provocada provavelmente pela flexibilidade do sistema. Em relação ao truncamento NT da NgSBP2, verifica-se que o melhor *ensemble* é virtualmente equivalente ao *pool*, sendo que a variação na distribuição é maior, tanto para R_g quanto para D_{max} . Além disso, verifica-se que não há apenas um máximo no qual os pontos se aproximam em R_g , indicando maior variabilidade na distribuição das populações, sendo condizente com o fato de este truncamento ser uma IDP. Os resultados observados novamente estão de acordo com os dados anteriores, uma vez que a maior distribuição nos parâmetros de SAXS indica uma maior flexibilidade para o sistema.

A média de R_g obtida para NgSBP2-CT é de 35,5 Å e $D_{max-médio} = 107,60$ Å. Para o outro truncamento, a média de R_g em solução é de 43,9 Å e $D_{max-médio} = 128,6$ Å. Dessa forma, verifica-se que NgSBP2-CT é mais compacta que NgSBP2-NT, o que pode também ser observado na Figura 72.

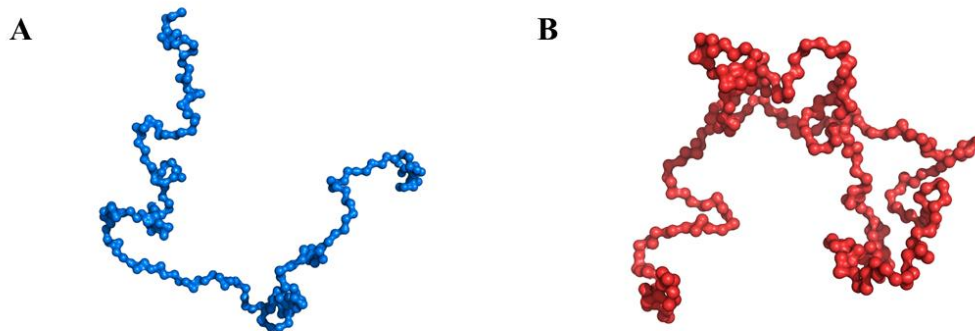


Figura 72 – Modelos produzidos pelo EOM a partir do *ensemble* selecionado para determinação dos parâmetros de SAXS. (A) Modelo utilizado para NgSNP2-NT e (B) Modelo utilizado para NgSBP2-CT.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os modelos observados na Figura 72 acima não representam o modelo em baixa resolução de SAXS, mas são indicativos do comportamento que ocorre no sistema em análise. Esses modelos são gerados no *pool* e selecionados pelo melhor valor estatístico, ou seja, com maior significância entre modelo e dado experimental, durante os ciclos aplicados pelo algoritmo. Como pode ser visto o truncamento NT é muito mais desordenado que CT, sendo este muito flexível. Como existe um *ensemble* de conformações em solução, as medidas de SAXS não serão utilizadas para determinação do envelope molecular, mas sim, para uma compreensão maior dos truncamentos de NgSBP2.

Assim, para validar este comportamento de heterogeneidade conformacional de NT, foram realizadas medidas de microscopia eletrônica de transmissão com preparo de amostra por contraste negativo.

8.4.2 Análise inicial por microscopia eletrônica por contraste negativo (NS-EM)

Tentando verificar essa variedade conformacional dos truncamentos de *NgSBP2*, ensaios de microscopia eletrônica de transmissão em preparo de contraste negativo foram realizadas em microscópio FEI TECNAI G2F20 HRTEM (FEI), 200 kV, sendo as imagens (Figura 73) gravadas com a câmera TIA TF20.

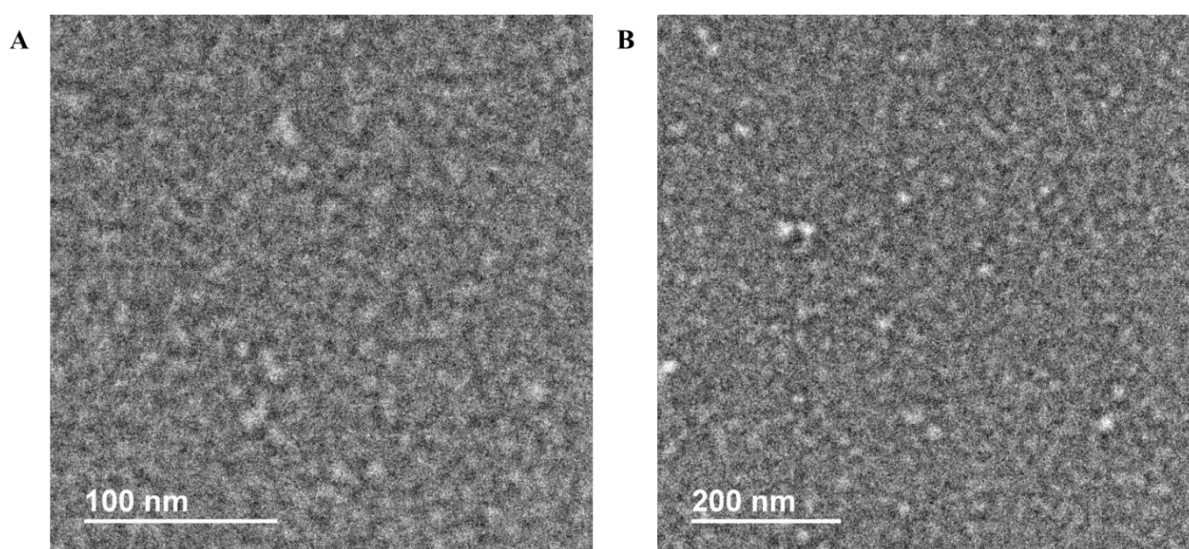


Figura 73 - Visualização das amostras (A) *NgSBP2*-NT e (B) *NgSBP2*-CT por NS-EM.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com Dr. Vitor Hugo Serrão (*University of Toronto, Canada*).

Analisando as imagens foi possível verificar o baixo contraste das partículas (em branco) em relação ao *background* principalmente devido ao tamanho das partículas. Além disso, as grades foram preparadas sem a descarga adicional para carregar a superfície inerte do filme de carbono, o que pode ter dificultado o aumento considerável do número de partículas depositadas na superfície. Somado a esse efeito, ambas as proteínas são compostas de um grande percentual de resíduos carregados, cerca de 37% para *NgSBP2*-CT e 30% para *NgSBP2*-NT, o que pode ter ocorrido uma lavagem das partículas durante o preparo das amostras. Portanto, fica como perspectiva a melhoria do preparo das amostras para futuras análises por microscopia eletrônica de transmissão a fim de contribuir para informações estruturais dessas moléculas.

8.5 Caracterização biofísica da interação e reconhecimento do elemento SECIS *in vitro*

8.5.1 Determinação das constantes aparente de interação por Espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)

Para determinação das constantes de dissociação aparente entre os domínios NT e CT de *NgSBP2* com o elemento SECIS, medidas de espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS) foram realizadas monitorando-se o comprimento de onda da fluoresceína-maleimida ($\lambda = 492$ nm, Sigma-Aldrich) que está covalentemente ligada extremidade 5'-OH do elemento SECIS. Para isso 500 nM do elemento SECIS foram colocados na cubeta, sendo 490 nM não marcado com fluoresceína e 10 nM marcado com fluoresceína. O objetivo é manter a população de RNA em 500 nM, porém 10 nM é o suficiente para aquisição.

Assim, experimentos foram realizados titulando-se concentrações crescentes de *NgSBP2*-CT e em outro experimento, titulando-se *NgSBP2*-NT. Também avaliou-se o complexo (*NgSBP2*-CT.SECIS) titulando-se *NgSBP2*-NT para analisar a interação do *NgSBP2*-NT quando *NgSBP2*-CT já está ligado ao elemento de RNA em razão equimolar.

Através do ajuste de *Hill* para cada curva de FAS (Figura 74) foi possível determinar as constantes de dissociação: $K_{Dapp} = (175,1 \pm 19,2)$ nM para *NgSBP2*-CT.SECIS, $K_{Dapp} = (85,0 \pm 127,7)$ nM para *NgSBP2*-NT.SECIS e $K_{Dapp} = (77,6 \pm 5,9)$ nM para o complexo (*NgSBP2*-CT.SECIS). *NgSBP2*-NT. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas biológicas e o valor representado corresponde ao valor médio obtido entre os experimentos.

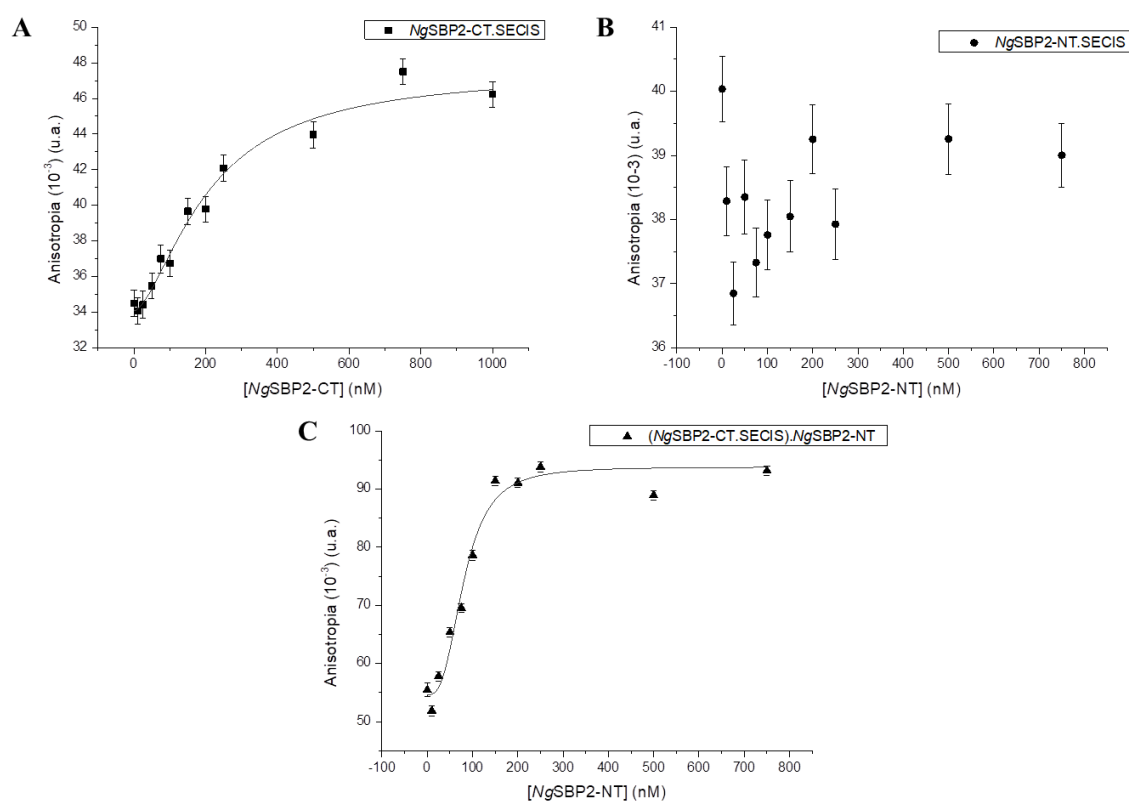


Figura 74 – Medidas de FAS excitando-se em 492 nm. (A) Medidas de interação *NgSBP2-CT.SECIS*, (B) *NgSBP2-NT.SECIS* e (C) *NgSBP2-NT* ao complexo (*NgSBP2-CT.SECIS*). O ajuste de Hill resultou em constante de dissociação aparente de $(175,1 \pm 19,2)$ nM, com R^2 0,98, para o complexo (A) e de $(77,6 \pm 5,9)$ nM, com R^2 0,97, para o complexo (C). O complexo (B) não apresentou perfil de interação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pelas medidas de FAS, observa-se que o domínio CT da *NgSBP* interage com o elemento SECIS. O perfil observado é condizente a uma interação específica, e mais ainda, os valores de constante aparente obtidos indicam alta afinidade para sistemas de interação proteína-RNA *in vitro* (~ 180 nM).^{36,68} Dessa forma, tem-se pela primeira vez, a demonstração experimental da presença de uma proteína interagente ao elemento SECIS em *Naegleria gruberi*. Além disso, este experimento *in vitro*, confirma a hipótese do trabalho publicado pelo nosso grupo, onde foi reportada a existência da putativa SBP2 nesse organismo.⁶¹

Em relação ao domínio NT da *NgSBP2* é possível verificar que não apresenta um perfil de interação, indicando que esta região da proteína não participa diretamente da interação ao elemento SECIS. Entretanto, observa-se uma interação de *NgSBP2-NT* ao complexo pré formado de *NgSBP2-CT.SECIS*. Os valores de constante aparente obtidos indicam que a afinidade desse sistema é maior que o próprio domínio CT da *NgSPB2* ao elemento SECIS, sugerindo que o domínio NT da *NgSBP2* deve participar da via de incorporação de selenocisteínas em *N. gruberi*.

As proteínas com elevado grau de estruturas não ordenadas geralmente estão envolvidas em processos de sinalização e regulação celular.¹³⁸⁻¹³⁹ Isso pode ser um indicativo de que *NgSBP2-NT* esteja envolvida com a ativação ou não da maquinaria para o reconhecimento do códon de parada como um códon de inserção de selenocisteína. Essa hipótese será analisada na seção 8.6.4.

Assim como realizado para as proteínas bacterianas, medidas de equilíbrio de sedimentação por ultracentrifugação analítica (SE-AUC) foram realizadas a fim de se validar os valores de constantes obtidos, e, mais ainda, tentar entender melhor os mecanismos envolvidos com a SBP2 de *N. gruberi*.

8.5.2 Medidas de Ultracentrifugação analítica - sedimentação em equilíbrio (SE-AUC) para obtenção das constantes de interação

Para determinar as constantes de dissociação, medidas de ultracentrifugação analítica em equilíbrio (SE-AUC) foram realizadas em três diferentes estequiometrias. Manteve-se constante na cela o elemento SECIS e razões 0,5; 1,0 e 2,0 de *NgSBP2-CT* foram adicionadas para a formação do complexo. Devido à ausência de interação de *NgSBP2-NT* com SECIS, este complexo não foi selecionado para medidas de SE-AUC. Em contrapartida, o complexo *NgSBP2-NT. NgSBP2-CT* foi analisado por SE-AUC, sendo que *NgSBP2-CT* foi mantido constante na cela e razões de 0,5; 1,0 e 2,0 de *NgSBP2-NT* foram adicionadas. Outro complexo monitorado por SE-AUC foi (*NgSBP2-CT.SECIS*). *NgSBP2-NT*, no qual *NgSBP2-CT* e SECIS foram adicionados em razões equimolares e *NgSBP2-NT* foi adicionado nas mesmas razões mencionadas anteriormente. Os valores das constantes podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 - Valores de constantes de dissociação aparente para a interação dos complexos envolvendo as proteínas *NgSBP2-NT* e *NgSBP2-CT*, bem como o elemento SECIS, obtidas por SE-AUC.

Sistema	K_D^1 (nM)	K_D^2 (nM)	K_D^3 (nM)	$K_{D-médio}$ (nM)
<i>NgSBP2-CT.SECIS</i>	175,0	166,7	-	170,9 ± 4,2
(<i>NgSBP2-CT.SECIS</i>). <i>NgSBP2-NT</i>	72,0	75,8	74,5	74,1 ± 1,4
<i>NgSBP2-NT.CT</i>	141,3	145,4	-	143,3 ± 2,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como os dados anteriores os índices numéricos acima do K_D correspondem às diferentes estequiometrias medidas para cada complexo na interação, sendo 1 para razão 1:0,5, o número 2 para razão 1:1 e por fim, o número 3 para razão de 1:2. O $K_{D-médio}$ foi obtido

através da média aritmética das constantes obtidas para as diferentes estequiometrias. Para todas as medidas o RMSD ficou abaixo de 0,03, indicando um ajuste adequado entre as medidas e o calculado pelo programa SEDPHAT.⁶⁹ O modelo utilizado para os complexos *NgSBP2-NT*, *NgSBP2-CT* e *NgSBP2-CT.SECIS* foi $A + B \leftrightarrow AB$, enquanto que para o complexo ternário (*NgSBP2-CT.SECIS*), *NgSBP2-NT* o modelo de interação utilizado foi $A + B + C \leftrightarrow AB + C \leftrightarrow AC + B \leftrightarrow ABC$, sendo A a proteína *NgSBP2-CT*, B o elemento SECIS e C corresponde a *NgSBP2-NT*.

Os gráficos de $Abs_{280nm} \times r$ (cm) referentes a cada condição analisada podem ser verificados a seguir (Figura 75), em que os termos 1, 2 e 3 representam cada uma das janelas de trabalho utilizadas, cada uma correspondendo a uma estequiometria específica, sendo 1 a estequiometria 0,5:1, o número 2 a estequiometria 1:1 e o número 3 corresponde à razão 2:1.

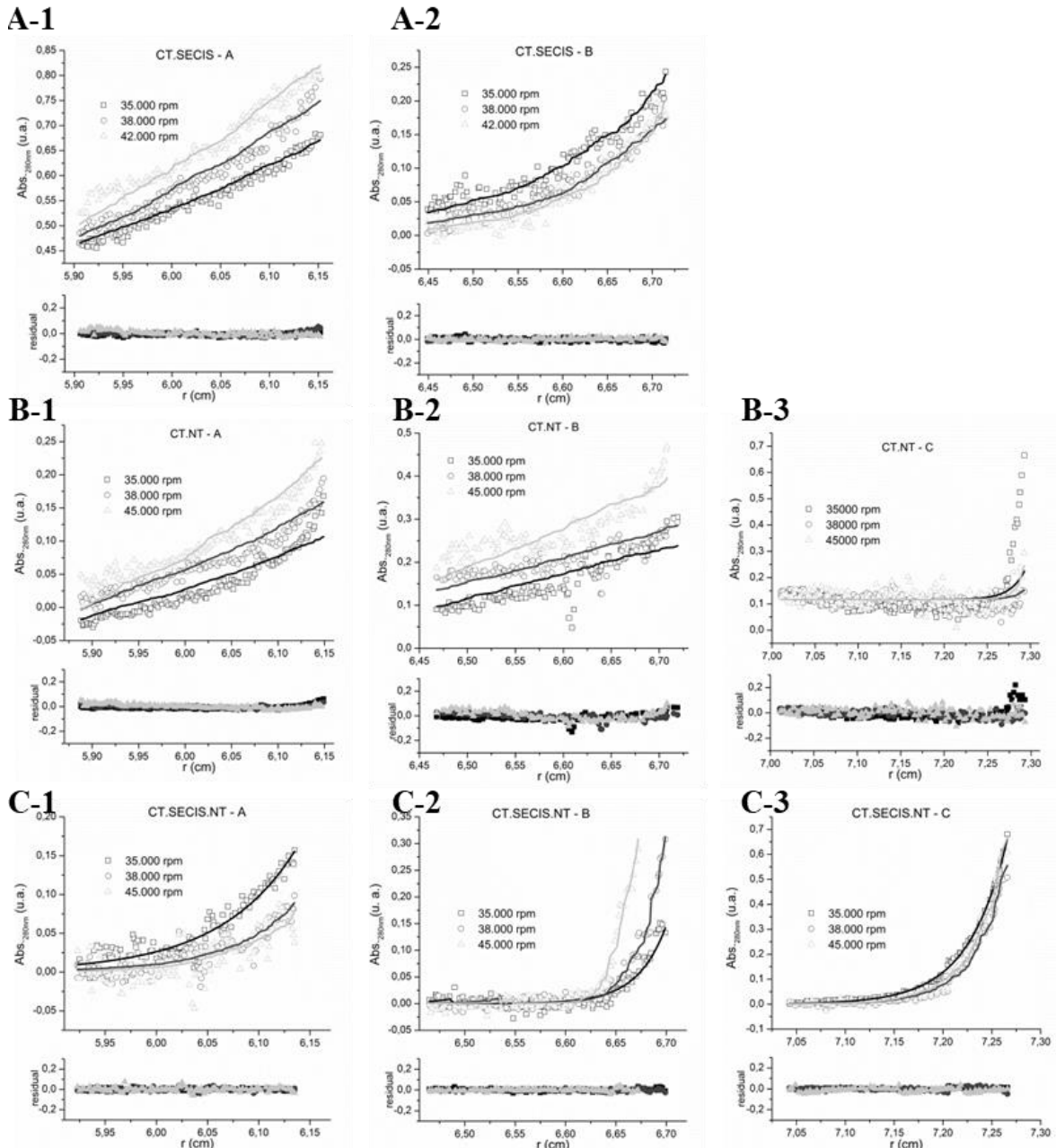


Figura 75 – Gráficos $Abs_{280nm} \times r$ (cm) obtidos nas análises de Ultracentrifugação analítica em sedimentação em equilíbrio (acima), monitorando-se o comprimento de onda de 280 nm (ANEXO 3). Valores residuais para cada medida (parte inferior de cada dado experimental). (A) Medidas para o complexo $NgSBP2-CT.SECIS$, obtendo-se um valor de $K_{D-médio} = 170,9$ nM. Os índices 1 e 2 correspondem às estequiometrias de 0,5:1 e 1:1 de $NgSBP2-CT:SECIS$, respectivamente. Não foi possível analisar a estequiometria de 2:1 devido a problemas na cela contendo esta amostra. (B) Medidas para o complexo $NgSBP2-CT.NgSBP2-NT$, com um valor de $K_{D-médio} = 143,3$ nM. Os índices 1, 2 e 3 correspondem às estequiometrias de 0,5:1, 1:1 e 2:1 de $NT:CT$, respectivamente (C) Medidas para o complexo $(NgSBP2-CT.SECIS).NgSBP2-NT$, resultando em um $K_{D-médio} = 74,1$ nM.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, podem-se resumir na Tabela 18 as constantes obtidas por ambos os métodos bem como a discrepância entre os valores calculados.

Tabela 18 – Comparativo entre as constantes de dissociação aparente obtidas para os complexos entre as proteínas NT e CT de *NgSBP2*, juntamente com o elemento SECIS.

Sistema	K_D^{FAS} (nM)	$K_{D-m\u00e9dio}^{SE-AUC}$ (nM)	Discrep\u00e2ncia (%)
<i>NgSBP2</i> -CT.SECIS	175,1 ± 19,2	170,9 ± 4,2	2
<i>NgSBP2</i> -NT.SECIS	85,0 ± 127,7	-	-
(<i>NgSBP2</i> -CT.SECIS). <i>NgSBP2</i> -NT	77,6 ± 5,9	74,1 ± 1,4	4
<i>NgSBP2</i> -NT. <i>NgSBP2</i> -CT	-	143,3 ± 2,0	-

Fonte: Elaborada pela autora.

A janela de trabalho correspondente a 2 *NgSBP2*-NT : 1 *NgSBP2*-CT aparentemente sofreu processo de sedimentação e assim, não foi considerada na análise. Através dos dados de SE-AUC e FAS, observa-se baixa discrepância entre as técnicas, apesar de haver limitações entre elas. Como o caso do complexo *NgSBP2*-CT. *NgSBP2*-NT, o qual não foi possível monitorar por anisotropia de fluorescência, devido ao alto percentual de lisinas de ambas as amostras, além do complexo *NgSBP2*-NT.SECIS, o qual não foi selecionado para análises de SE-AUC.

O domínio NT da *NgSBP2* não interage com o elemento SECIS, como previsto pela literatura.^{44,58-59} Entretanto, verificou-se através de SE-AUC a interação entre o domínio CT e NT com $K_{Dapp} = 143,3$ nM e, na presença do elemento SECIS, observa-se uma diminuição do K_{Dapp} em aproximadamente 50% do valor quando comparada ao complexo *NgSBP2*-CT. *NgSBP2*-NT. Este fato sugere que a interação *NgSBP2*-CT ao SECIS favorece a interação com o domínio *NgSBP2*-NT, reforçando a hipótese de que ele possa participar da via de incorporação de Sec atuando como mecanismo de sinalização.

Analisando a interação do domínio CT com o elemento SECIS, verifica-se uma constante de dissociação de aproximadamente $K_{Dapp} = 170$ nM. Os valores de constantes obtidos entre as duas técnicas apresentam somente 2% de discrepância. Por se tratar inicialmente de uma proteína putativa em *N. gruberi*, tem-se que este valor de constante confirma que este domínio é uma SBP2, pois o valor de constante obtido é um valor considerado na faixa do baixo nanomolar. Além disso, verifica-se que a interação ocorre com alta afinidade, conforme o esperado para outras SBP2s de organismos diferentes, em que a constante varia de 80-210 nM.⁴⁷

Em relação à *NgSBP2*-NT, tem-se as seguintes hipóteses: (i) interação *NgSBP2*-NT ao complexo ocorre, pois *NgSBP2*-NT deve reconhecer e interagir com o eEFSec ou (ii) interação *NgSBP2*-NT ao complexo ocorre, pois *NgSBP2*-NT deva interagir com o complexo (*NgSBP2*-CT.SECIS).eEFSec.GTP.Sec-tRNA^{Sec} ao ribossomo. Dessa forma, os experimentos

de *pull-down* seguido de espectrometria de massas para identificação das bandas auxiliaram a compreender quais são os parceiros de interação de *NgSBP2-NT*.

8.5.3 Análise da variação do perfil de estruturas secundárias na interação *NgSBP2-CT* com o elemento SECIS por FTIR

Como foi apresentado na seção de caracterização biofísica das amostras, a proteína *NgSBP2-CT* apresenta grandes regiões de desordem. Uma maneira alternativa para se analisar a interação com o elemento SECIS é através do FTIR, pois os modos vibracionais de ácidos nucleicos é distante dos modos normais de absorção das amidas presentes nos polipeptídeos. Dessa forma, espectros de infravermelho (IR) foram coletados e analisados para o complexo *NgSBP2-CT* (Figura 76).

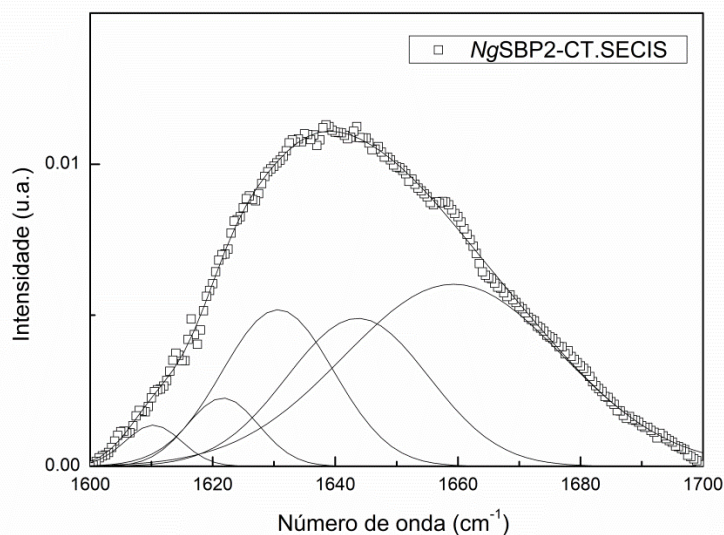


Figura 76 - Determinação do percentual de estruturas secundárias por FTIR do complexo *NgSBP2-CT* interagente ao elemento SECIS.

Fonte: Elaborada pela autora em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio (IBILCE/UNESP-São José do Rio Preto).

Assim como os dados de *NgSBP2-CT*, o ajuste foi feito através de 5 gaussianas resultando em $R = 0,997$ (99,7%). Os resultados da deconvolução deste complexo bem como os resultados obtidos anteriormente são apresentados na Tabela 19 a seguir.

Tabela 19 – Comparativo do percentual de estruturas secundárias obtidas por FTIR para NgSBP2-CT e o complexo deste truncamento com o elemento SECIS

Estrutura secundária	NgSBP2-CT	Estrutura secundária	NgSBP2-CT.SECIS
β_{\parallel} (1618 cm^{-1})	8%	β_{\parallel} (1610 cm^{-1})	4%
β_{\parallel} (1628 cm^{-1})	22%	β_{\parallel} (1621 cm^{-1})	6%
Desordenada (1646 cm^{-1})	40%	β_{\parallel} (1630 cm^{-1})	20%
β_{\perp} (1669 cm^{-1})	28%	Desordenada (1643 cm^{-1})	24%
β_{\perp} (1692 cm^{-1})	2%	α -hélice (1659 cm^{-1})	46%

Fonte: Elaborada pela autora.

A interação com o elemento SECIS fez com que surgisse um modo vibracional que se assemelha a de uma estrutura do tipo α -hélice, que não foi previamente observada para a amostra na ausência do RNA específico. Além disso, observa-se uma diminuição na desordem estrutural (40% para 20%). Isso está de acordo ao previsto para regiões desordenadas, às quais geralmente são acompanhadas com um ganho de estrutura quando se ligam aos seus parceiros biológicos, um fenômeno conhecido como “*folding upon binding*”, ou enovelamento devido à interação.^{137,140-142}

Contudo, deve-se ressaltar que o aumento tão grande do percentual em estruturas do tipo α -hélice não deve ser totalmente devido ao fenômeno mencionado anteriormente, uma vez que ele promove um ganho de estrutura secundária, porém não altera completamente o enovelamento da proteína como um todo, como observado pelas alterações em fita- β . Sendo assim, tem-se que durante o processo de interação entre o domínio CT e o elemento SECIS, novos contatos foram formados, resultando no possível ganho de estruturas em α -hélice.

Subsequentemente, os parâmetros hidrodinâmicos foram obtidos através de medidas de velocidade de sedimentação através de ultracentrifugação analítica.

8.5.4 Determinação dos parâmetros hidrodinâmicos por Ultracentrifugação analítica em velocidade de sedimentação (SV-AUC)

Para analisar os complexos formados, medidas de velocidade de sedimentação através de ultracentrifugação analítica foram realizadas. Para isso, foram feitas medidas de NgSB2-CT, NgSB2-NT, NgSB2-CT. NgSB2-NT e NgSB2-CT.SECIS. As análises do coeficiente de sedimentação podem ser observadas a seguir (Figura 77).

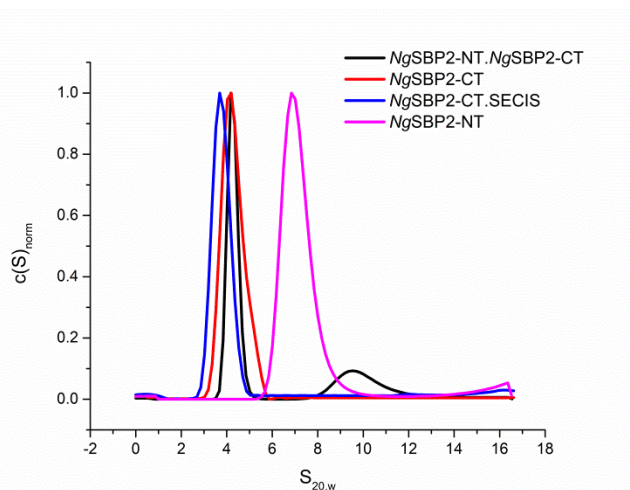


Figura 77 - Análise do coeficiente de sedimentação para os truncamentos *NgSBP2-CT*, *NgSBP2-NT*, bem como o complexo entre eles e *NgSBP2-CT* com o elemento SECIS. O tratamento dos dados através da função de distribuição contínua $c(s)$ resultou em $S_w = 3,97$ S para *NgSBP2-CT*, $S_w = 6,50$ S para *NgSBP2-NT*, $S_w = 3,87$ S para o complexo entre eles e $S_w = 3,51$ S para *NgSBP2-CT.SECIS*.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resumo dos dados obtidos encontra-se na Tabela 20 a seguir.

Tabela 20 - Parâmetros obtidos através da análise de SV-AUC. As variáveis representam: S_w , coeficiente de sedimentação, $S_{20,w}$, coeficiente de sedimentação padrão, MM, massa molecular, Rs, raio de Stokes.

Amostra	S_w (S)	$S_{20,w}$ (S)	MM (kDa)	Rs (Å)
<i>NgSB2-CT</i>	3,97	4,40	65,97	32,4
<i>NgSB2-NT</i>	6,50	7,16	120,24	39,3
<i>NgSB2-CT. NgSB2-NT</i> (1)	3,87	4,27	59,89	31,3
<i>NgSB2-CT. NgSB2-NT</i> (2)	9,24	10,19	220,64	48,3
<i>NgSB2-CT.SECIS</i>	3,51	3,89	54,87	30,5

Fonte: Elaborada pela autora.

O ajuste dos dados pelo programa SEDFIT resultou nos parâmetros de coeficiente de sedimentação (S_w) de 3,97 S para *NgSB2-CT*, com massa molecular de 65,97 kDa. Observa-se também que o $R_s = 32,4$ Å, sendo coerente ao valor obtido por SAXS. Dessa forma, conclui-se que esse truncamento em solução apresenta-se na sua forma dimérica. Quando este interage com o elemento SECIS, os parâmetros são $S_w = 3,51$ S, MM = 54,87 kDa e $R_s = 30,5$ Å. A interação faz com que as moléculas em solução estejam mais compactas, como pode ser observado pela variação do raio de Stokes.

Em relação à *NgSBP2-NT*, a proteína se encontra em estado oligomérico maior para a concentração utilizada nesse experimento, sendo $S_w = 6,50$ S, MM = 120,24 kDa e $R_s = 39,3$ Å. Como foi visto através de DLS e SAXS, os raios hidrodinâmico e de giro (médio) obtidos foram de (49 ± 3) Å e 43,9 Å, respectivamente. Dessa forma, levando-se em consideração a

massa teórica do monômero deste truncamento, os resultados indicam que NgSBP2-NT se organiza em um pentâmero em solução. Contudo, para analisar os estados oligoméricos deste truncamento em função da concentração, medidas de SV-AUC para cada concentração podem ser feitas, ficando como perspectiva para a continuidade desse estudo.

O complexo entre os dois truncamentos resultou em dois picos, sendo o majoritário com $S_w = 3,87$ S, $MM = 59,9$ kDa e $R_s = 31,3$ Å. Observa-se também que o complexo formado corresponde à proteína inteira de NgSBP2. Já o complexo NgSBP2-CT.SECIS é mais compacto que o complexo formado pelos truncamentos. Esse resultado ajuda a corroborar com o efeito de *foldings upon binding* previamente descrito para a formação do complexo na presença do RNA. O outro pico formado, possui $S_w = 9,24$ S, $MM = 220,64$ kDa e $R_s = 48,3$ Å sendo possivelmente correspondente a um complexo tetramérico entre os dois truncamentos, ou estequiometrias diferentes de interação.

Pelas abordagens realizadas até o momento, as proteínas são muito flexíveis, podem interagir com elas mesmas, mas na presença dos parceiros de interação elas assumem a forma monomérica,¹⁴³ e, mais ainda, uma delas apresentou uma diminuição do percentual da desordem na interação com seu parceiro de interação.

Para investigar quais são os possíveis parceiros de interação de NgSBP2-NT, ensaios de *pull-down* seguido de espectrometria de massas foram realizados.

8.6 Caracterização dos complexos macromoleculares de NgSBP2 *in vivo*

8.6.1 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para verificar a reatividade do antissoro produzido

Como mencionado anteriormente, o antissoro produzido para NgSBP2-NT foi validado pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Assim, a Figura 78 a seguir, representa os dados do ensaio imunoenzimático ELISA para o antissoro produzido para NgSBP2-CT, produzidos no Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Fernanda Anibal.

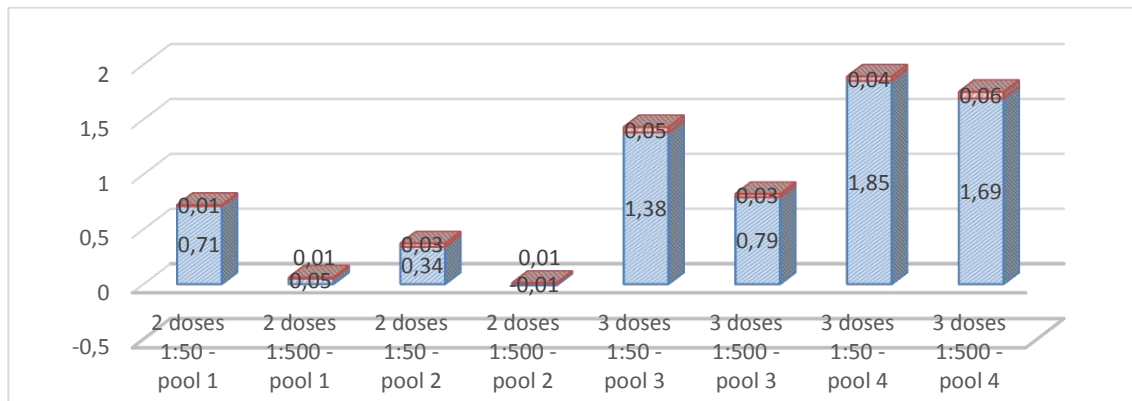


Figura 78 – Histograma da análise por ELISA do antissoro produzido para NgSBP2-CT. Em azul, as medidas de absorbância observadas em 450 nm. Em marrom, o erro associado às medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores observados no gráfico representam os valores de absorbância em 450 nm, após a subtração do controle do experimento. Em marrom, têm-se os valores do desvio padrão associado aos dados. Os *pools* representam os grupos de animais que foram separados para imunização com a proteína recombinante NgSBP2-CT. *Pool 1* corresponde a 2 animais que receberam 2 doses de imunização, *Pool 2*, corresponde a 3 animais que receberam 2 doses de imunização. *Pool 3* e 4 correspondem aos animais que receberam 3 doses de imunização, sendo o *pool 3* contendo 3 animais e o *pool 4* contendo 2 animais.

Verificou-se que o antissoro produzido contra a proteína NgSBP2-CT foi reativo à proteína recombinante. Além disso, pode-se observar que os animais que receberam 3 doses apresentaram melhor resposta imune ao antígeno.

Dessa forma, tem-se que os antissoros produzidos podem ser utilizados para estudos através de WB bem como estudos *in vivo* para análise da localização celular através de imunofluorescência indireta.

8.6.2 Cultivo celular de *Naegleria gruberi*

8.6.2.1 Curva de crescimento celular

Para avaliar a frequência de repique, foi feita a contagem de células em câmara de *Neubauer*, por 9 dias consecutivos. O resultado pode ser observado na Figura 79 a seguir.

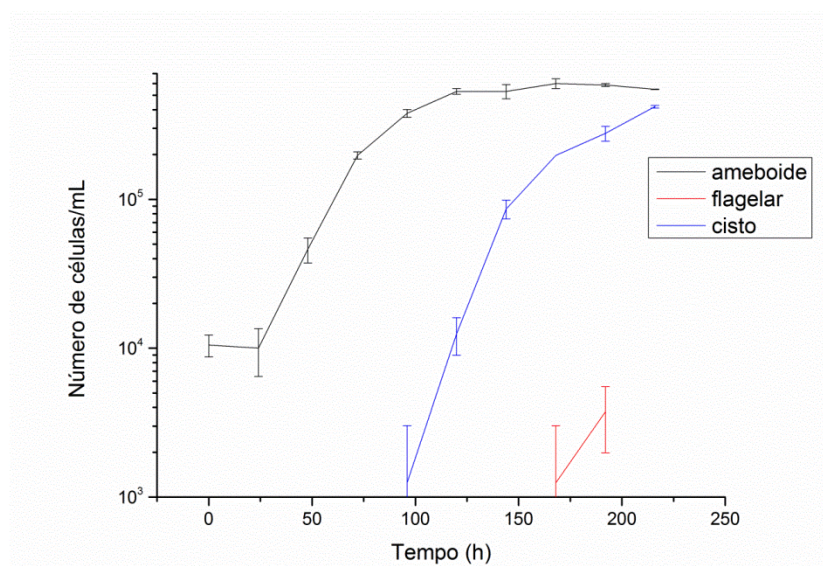


Figura 79 – Curva de crescimento de *Naegleria gruberi* em meio ATCC 1034, para determinação do tempo de dobra. A contagem foi realizada ao longo de 9 dias consecutivos.

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a equação 2, tem-se então que o tempo de dobra é de 11,2 h. Assim, determinou-se que o repique das células deve ser feito a cada 48 h para preservação e manutenção da cultura.

8.6.2.2 Análise da cultura sob estresse oxidativo

Os ensaios de estresse oxidativo e estresse em meio suplementado com seleneto e selenocisteína foram realizados a fim de se determinar o comportamento celular para, então, investigar o comportamento das proteínas *NgSBP2-CT* e *NgSBP2-NT* quando as células são submetidas a essas condições. Vale ressaltar que a análise do comportamento dos truncamentos deve ser feita em células saudáveis, por isso a necessidade de entender se o estresse e/ou suplementação provocam algum efeito dentro de 48 h. O resultado dos ensaios de estresse oxidativo (na presença de H_2O_2) pode ser observado na Figura 80 a seguir.

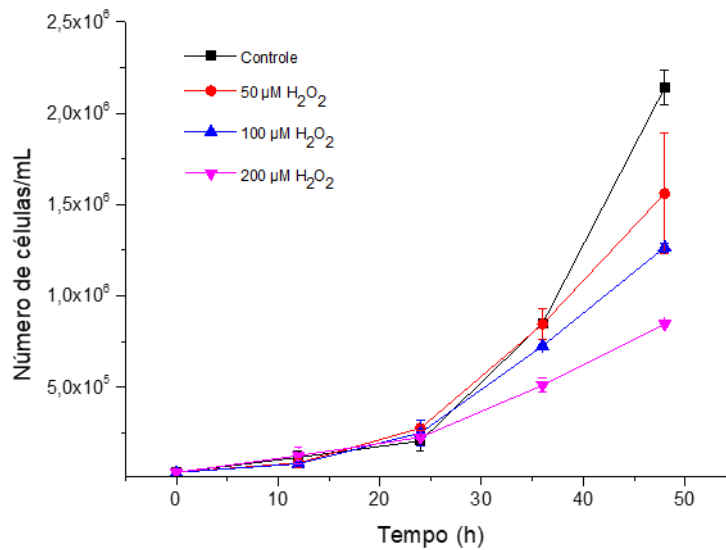


Figura 80 – Ensaios de estresse oxidativo em cultura de *N. gruberi*. A contagem foi feita a cada 12 h em um período de 48 h. Verifica-se que a concentração de 50 μM de H_2O_2 possui crescimento celular similar ao da cultura controle. As concentrações de H_2O_2 de 100 μM e 200 μM provocam maiores efeitos na cultura, sendo o de maior concentração correspondente ao maior dano. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observada, a concentração de 50 μM de H_2O_2 possui comportamento similar ao da cultura sadia, apresentando, assim, pouco ou nenhum efeito sob a cultura. Verifica-se que as concentrações de 100 μM e 200 μM de H_2O_2 provocam maiores danos à cultura, sendo que a concentração de 200 μM leva a uma diminuição do número de células amebóides. Como a menor concentração não apresentou efeitos relevantes na cultura, ela não foi utilizada para os ensaios de estresse em meio suplementado com seleneto e selenocisteína (Figura 81).

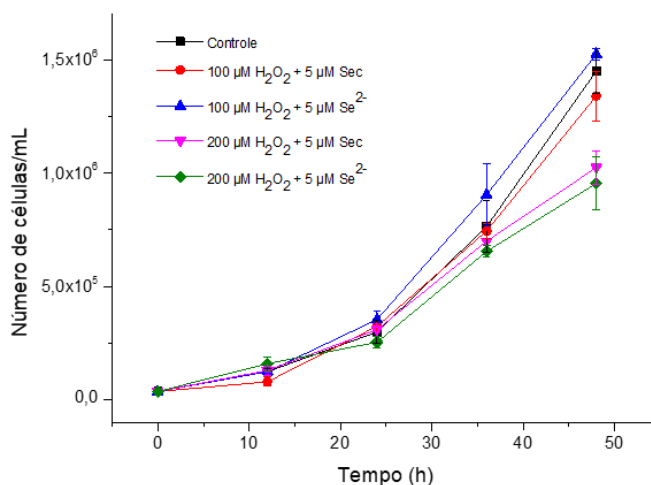


Figura 81 – Ensaio de estresse oxidativo em meio suplementado com seleneto e selenocisteína em cultura de *N. gruberi*. A cultura foi mantida por 48 h, sendo a contagem das células realizadas a cada 12 h. Observa-se que a cultura estressada com 100 μM de H₂O₂ suplementada tanto com seleneto como com selenocisteína possui uma curva de crescimento similar da cultura sadia. A cultura estressada com 200 μM de H₂O₂ apresenta efeitos de morte celular significativos tanto no meio suplementado com seleneto como com selenocisteína. O experimento foi realizado em triplicata biológica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Através do ensaio realizado, verifica-se que a cultura estressada com 100 μM de H₂O₂ e suplementada com 5 μM de seleneto ou selenocisteína possui uma curva de crescimento similar ao da cultura controle. Isso indica que a presença desses ligantes previne danos celulares decorrente do estresse oxidativo pelo direcionamento dos suplementos de cultivo para a via de biossíntese e incorporação de selenocisteína, resultando em selenoproteínas, dentro as quais, a glutatona peroxidase (GSH) que age diretamente na prevenção de danos celulares decorrente de processos oxidativos.¹⁴⁴

A cultura suplementada com os ligantes e contendo 200 μM de H₂O₂ não consegue se reestabelecer à condição sadia, levando a uma diminuição do número de células amebóides. Dessa forma, é possível investigar o comportamento dos truncamentos de NgSBP2 na cultura, uma vez que verifica-se que há a ativação da maquinaria de incorporação de Sec nas condições de estresse com 100 μM de H₂O₂ na presença dos ligantes. A via deve também ser ativada no segundo caso de estresse oxidativo, porém a concentração de ligantes não foi suficiente para detoxificar o meio, levando aos danos observados na cultura. Esses ensaios são importantes para a verificação da localização celular de NgSBP2, ficando assim como perspectiva.

8.6.3 Identificação dos truncamentos em extrato de proteína total de *N. gruberi* através de *Western blot* (WB)

Antes de realizar os experimentos de imunolocalização indireta, bem como experimentos de co-imunoprecipitação, é necessário indentificar a proteína em um extrato de proteínas totais de *N. gruberi*. Essa primeira identificação tem como finalidade principal, verificar se a proteína sofre algum tipo de processamento, pois IDPs são susceptíveis ao processamento pós traducional.¹³⁹ Além disso, é importante a determinação do título de trabalho, o qual serve como um guia para a realização de experimentos posteriores.

O resultado do WB para *NgSBP2-NT* pode ser verificado na Figura 82A e de *NgSBP2-CT*, na Figura 82B.

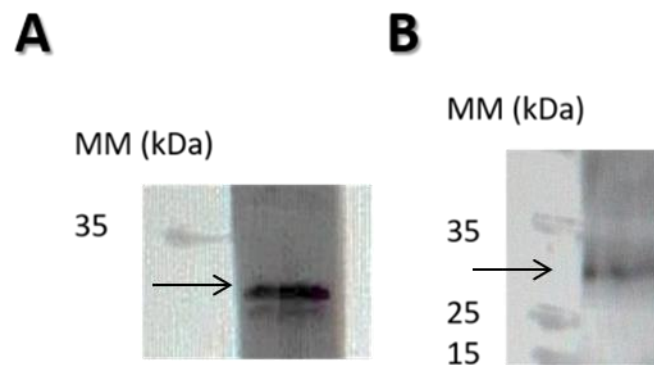


Figura 82 – Identificação dos truncamentos de *NgSBP2* por *Western blot* utilizando os antissoros produzidos para (A) *NgSBP2-NT*, com título de 1:1000 e (B) *NgSBP2-CT*, com título de 1:300.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os títulos utilizados foram de 1:1000 para *NgSBP2-NT* e de 1:300 para *NgSBP2-CT*. Através de SDS-PAGE 12% observa-se que ambas as proteínas possuem massa molecular menor que 35 kDa. Lembrando que a proteína predita pelo nosso grupo possui massa teórica de aproximadamente 55 kDa. Observa-se que de fato, a proteína interagente ao elemento SECIS sofre algum tipo de processamento pós traducional em *Naegleria gruberi*, sendo separada em seus domínios NT e CT.

A posição do truncamento teórico da *NgSBP2* baseou-se nas análises de *BLASTp* resultando em um alinhamento com identidade e cobertura razoáveis (32% e 54%, respectivamente) para *NgSBP2* ao ser comparada com *SBP2* de *Scleropages formosus*, um peixe de água doce conhecido como “peixe-dragão”. Escolheu-se então o truncamento em uma região predita em não possuir estrutura secundária e que possui elevada probabilidade de sofrer ação de endoproteínases, como Lys-C, Lys-N e Tryps, que reconhecem

preferencialmente as regiões ricas em lisinas (203-VLTKKKKPNKLLKLLILKEKEIRKLH-226).

Deste modo, os truncamentos foram planejados de modo que suas massas teóricas sejam de aproximadamente 24 kDa para NgSBP2-NT e de 34 kDa para NgSBP2-CT. Assim, verifica-se que os truncamentos construídos se assemelham ao processo sofrido no organismo.

Os ensaios de identificação por WB mostram, pela primeira vez, a identificação experimental de uma proteína interagente ao elemento SECIS em um extrato de proteínas totais de *Naegleria gruberi*, confirmando a hipótese criada por nosso grupo em 2013. Além disso, os antissoros produzidos são específicos para as proteínas dos truncamentos de NgSBP2, podendo ser utilizados para ensaios posteriores como co-imunoprecipitação indireta.

8.6.4 Identificação dos parceiros de interação dos truncamentos de NgSBP2 através de ensaios de *pulldown* seguido de espectrometria de massas

Após a obtenção dos extratos proteicos, estes foram utilizados para os ensaios de *pulldown*. Como mencionado anteriormente, uma das hipóteses da função de NgSBP2-NT é o seu envolvimento em algum mecanismo de sinalização para o funcionamento da maquinaria da via de biossíntese e incorporação de Sec. Para isso, os ensaios de *pulldown* foram realizados, no qual as proteínas NgSBP2-NT e NgSBP2-CT foram imobilizadas em uma coluna de Ni²⁺-NTA (Clontech) e um extrato contendo proteínas totais de *N. gruberi* foi passado por essa coluna contendo o truncamento imobilizado. Para cada truncamento foi realizado um ensaio de *pulldown* e o resultado pode ser observado na Figura 83 a seguir.

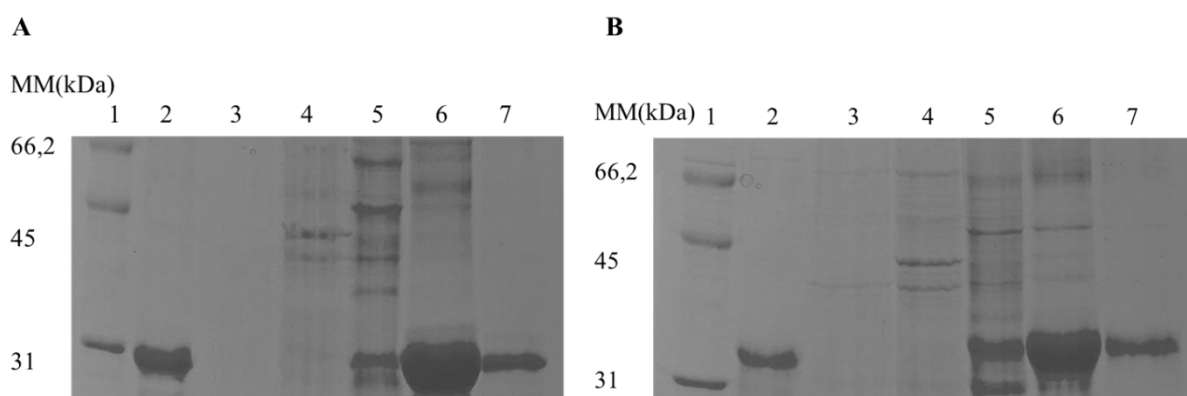


Figura 83 – SDS-PAGE 12% referente ao *pulldown* realizado para (A) NgSBP2-NT e (B) NgSBP2-CT. As canaletas correspondem a (1) Marcador molecular. (2) Amostras controles. (3) Fração não interagente à coluna previamente equilibrada com tampão de lise contendo as proteínas recombinantes imobilizadas. (4) Lavagem com 20 mM de imidazol. (5) Lavagem com 100 mM de imidazol. (6) Eluição com 500 mM de imidazol. (7) Segunda eluição com 500 mM de imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que apenas uma pequena parte do extrato de *N. gruberi* não se ligou à coluna que continha as proteínas imobilizadas, canaletas 3. Grande parte do extrato de proteínas totais de *N. gruberi* foi eluído nas etapas de lavagem, canaletas 4 e 5 e a fração que interagiu com as proteínas de interesse foram eluídas com as mesmas, canaletas 6 e 7. As bandas do gel foram recortadas, tratadas para remoção das proteínas do gel e então enviadas para análise de espectrometria de massas (MS/MS).

Os resultados provenientes das análises pelo programa *Mascot* podem ser observados na Tabela 21 a seguir.

Tabela 21 – *Hits* encontrados pelo Mascot após análise por espectrometria de massas contra o banco proteômico de *N. gruberi*.

Truncamento	#Hit	Hits – Código de acesso	Hits – <i>N. gruberi</i>	Score
CT	1	GenBank: EFC44563.1	ras GTPase-activating-like protein	36
	2	GenBank: EFC38363.1	Predicted protein	32
	3	GenBank: EFC43885.1	Predicted protein	22
	4	GenBank: EFC39607.1	Predicted protein	21
NT	1	GenBank: EFC50445.1	Predicted protein	1509
	2	GenBank: EFC49444.1	Hypotetical protein	29
	3	GenBank: EFC47129.1	Predicted protein	29
	4	GenBank: EFC45705.1	Predicted protein	25
	5	GenBank: EFC45091.1	Predicted protein	23
	6	GenBank: EFC48664.1	Hypotetical protein	14

Fonte: Elaborada pela autora.

Para o truncamento CT de *NgSBP2* foram encontrados 4 *hits*, sendo 1 deles correspondente à uma GTPase. Os outros *hits* referem-se às proteínas anotadas no genoma de *N. gruberi*.⁶² Para o truncamento NT da *NgSBP2* foram encontrados 6 *hits*, sendo todos relacionados à anotação no genoma de *N. gruberi*.⁶² Por isso, para analisar os *hits* cuja função é desconhecida, a ferramenta *BLASTp* (NCBI) foi utilizada a fim de se identificar proteínas homólogas identificadas por espectrometria de massas (Tabela 22).

Tabela 22 – Análises de *BLASTp* das proteínas identificadas por MS/MS anotadas no genoma de *N. gruberi*

	#Hit	Nome	Cobertura / Identidade (%)
<i>NgSBP2-CT</i>	2	serine/threonine kinase	98 / 52
	3	Sem alinhamento com outra proteína do banco de dados, mas apresentou uma região correspondente à família F-box (6%)	
	4	polyADP-ribose polymerase [Heterostelium album PN500]	68 / 34
<i>NgSBP2-NT</i>	1	selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 [Scleropages formosus]	54 / 32
	2	Sem alinhamento com outra proteína do banco de dados. Sem a presença de domínios conservados	
	3	NAD(P)/FAD-dependent oxidoreductase [Rufibacter tibetensis]	96 / 51
	4	Roco1, Roco family protein [Emiliana huxleyi CCMP1516]	84 / 36
	5	transcription initiation factor TFIID subunit 1 isoform X3 [Solanum lycopersicum]	38 / 30
	6	G8 domain-containing protein [Deinococcus maricopenensis]	27 / 33

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Tabela 19 acima, o domínio CT da *NgSBP2* ligou-se a uma serina treonina quinase, uma proteína não identificada mas que compartilha uma pequena região com a família F-box e uma poli-ADP-ribose. Além da interação com uma GTPase. Dessa forma, pode-se hipotetizar que no *pulldown* este foi possível obter proteínas ligadas mRNA, uma vez que poli-ADP-ribose é importante para a correta montagem das subunidades ribossomais.¹⁴⁵ O motivo F-box identificado está relacionado a um receptor de ubiquitinação, ou seja, participa de processos regulatórios.¹⁴⁶ A interação com uma GTPase indica que este truncamento além de interagir com o elemento SECIS pode estar diretamente relacionado com a interação com o fator de alongação.

Em relação ao truncamento NT da *NgSBP2*, o resultado do *pulldown* mostrou a presença do domínio C-terminal de *NgSBP2*, como era esperado pelos experimentos de interação. Outras proteínas que interagiram com este truncamento foram uma oxidoreductase e Roco 1, ambas proteínas regulatórias.¹⁴⁷ Outras duas proteínas foram identificadas como interagentes a este truncamento, entretando, ao buscar proteínas homólogas, observou-se uma baixa identidade com o banco de dados.

As proteínas com menores percentuais de identidade, bem como de cobertura identificadas, consistem em uma proteína ligadora a ácidos nucleicos e outra envolvida no processo de ubiquitinação.

As análises de espectrometria de massas indicam que o truncamento CT é responsável pela interação com o fator de alongação específico (GTPase). Dessa forma, a hipótese de que

NT se liga ao fator de alongação é invalidada por esses ensaios. Além disso, verifica-se que NT se ligou a proteínas de regulação, sendo condizente com o previamente descrito na literatura para IDPs.¹³⁸⁻¹³⁹

Como mencionado na seção 1.4.2, existem alguns modelos da entrega do tRNA^{Sec} junto ao ribossomo, porém o completo mecanismo ainda não foi demonstrado. Observa-se que a análises de massas é condizente com a literatura, sendo o truncamento CT de NgSBP2 reponsável pela interação com o fator de alongação específico, entretanto, a ordem da entrega ainda permanece em questão.⁶⁰

9 CONCLUSÕES

Em 2013, nosso grupo de pesquisa fez uma anotação no genoma de *Naegleria gruberi*, identificando uma proteína putativa para interação com elemento SECIS. Esse é o primeiro estudo que demonstra experimentalmente a existência da proteína responsável pelo reconhecimento desse RNA específico nesse organismo.

Os estudos foram conduzidos utilizando dois truncamentos da proteína NgSBP2, sendo os truncamentos amino terminal (NT) e carboxi terminal (CT). Através de análises biofísicas foi possível comprovar que a enzima predita por nosso grupo deixa de ser putativa e passa a ser funcional. Isso foi obtido através de medidas de interação por FAS e SE-AUC, às quais indicaram interação do domínio CT ao elemento SECIS, com $K_{Dapp} = (170,9 \pm 4,2)$ nM e ausência de interação do domínio NT com o elemento de RNA. Os resultados obtidos por essas análises estão de acordo com a literatura de SBP2s de outros organismos, em que apenas o domínio carboxi-terminal é responsável pelo reconhecimento e interação ao elemento SECIS.

Um fenômeno observado na interação NgSBP2-CT.SECIS por FTIR foi o de “*folding upon binding*”. Os estudos de caracterização biofísica por CD, FTIR e SAXS indicaram que este truncamento possui alta flexibilidade, com cerca de 40% de estruturas não ordenadas, e quando interage com o elemento SECIS, o truncamento ganha estrutura para poder interagir com seu parceiro de interação, passando de 40% de estruturas não ordenadas para 20%.

Além disso, observou-se também a formação do complexo através de SV-AUC, em que o R_s do complexo apresentou-se mais compacto, com $R_s = 32,4$ Å para o truncamento CT e $R_s = 30,5$ Å para com complexo com o elemento SECIS, o que corrobora com os dados observados de FTIR.

Interessantemente, o domínio NT apresentou maior afinidade de interação ao complexo NgSBP2-CT.SECIS do que ao truncamento CT, com $K_{Dapp} = (77,6 \pm 5,9)$ nM e $K_{Dapp} = (143,3 \pm 2,0)$ nM, respectivamente. Isso trouxe o questionamento se NgSBP2-NT estaria envolvido com a via de incorporação de selenocisteínas em *N. gruberi*. Análises de caracterização biofísica por CD, FTIR e SAXS indicaram que o domínio NT da NgSBP2 é uma proteína intrinsecamente desordenada, com 74% de estruturas não ordenadas, sendo a sua função provavelmente relacionada com mecanismos de regulação celular. Deste modo, ensaios de *pull-down* seguido de espectrometria de massas revelaram que a interação observada nos sistemas em estudo devem-se provavelmente à promiscuidade de interação de NT, uma vez que ela não teve nenhum parceiro da via de incorporação de Sec identificado.

As análises estruturais realizadas, SAXS e NS-EM indicaram uma heterogeneidade no sistema, sendo observadas uma distribuição de *ensemble* de conformações por SAXS e ausência de partículas únicas em microscopia eletrônica. Estes fatos são condizentes com a elevada flexibilidade dos sistemas que pode ser corrigida com aumento da concentração salina.

Sendo assim, este estudo traz um avanço no conhecimento da via de incorporação de selenocisteínas em *Naegleria gruberi*, demonstrando experimentalmente a presença de uma SBP2 funcional. Além disso, esse trabalho traz amplo avanço no conhecimento de interações do tipo proteína-RNA bem como a compreensão de comportamentos característicos de regiões desordenadas ou de proteínas desordenadas. Deste modo, este trabalho apresenta grande importância para estudo de interações macromoleculares.

10 PERSPECTIVAS

Como perspectivas principais para a continuidade desse projeto, pode-se destacar:

- Novos preparos de amostra para NS-EM e assim, analisar a distribuição do tamanho das partículas;
- Aumentar a escala de co-immunoprecipitação para atingir a concentração necessária para análises por espectrometria de massas;
- Determinar a promiscuidade de interações de *NgSBP2-NT* através de medidas de interação com proteínas não pertencentes à via de biossíntese de Sec.
- Realizar ensaios de imunolocalização através da técnica de imunofluorescência indireta utilizando-se os antissoros produzidos e avaliando-se a localização celular da cultura sadia e da cultura estressada com H_2O_2 ;
- Realizar novas medidas de SV-AUC de *NgSBP2-NT* para verificar os estados oligoméricos para cada concentração.
- Realizar medidas de DSC para o complexo *NgSBP2-CT.SECIS* e verificar se na presença do seu parceiro de interação a proteína apresenta cooperatividade na transição térmica.

REFERÊNCIAS

- 1 JAIN, V. K. An Overview of organoselenium chemistry: from fundamentals to synthesis. In: JAIN, V. K.; PRIYADARSINI, K. I. (Ed.). **Organoselenium compounds in biology and medicine: synthesis, biological and therapeutic treatments**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2017. p. 1-33.
- 2 RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.
- 3 HOLBEN, D. H.; SMITH, A. N. The diverse role of selenium within selenoproteins: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 7, p. 836-843, 1999.
- 4 BURK, R. F.; HILL, K. E. Regulation of selenium metabolism and transport. **Annual Review of Nutrition**, v. 35, p. 109-134, 2015. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034250.
- 5 KAUR, N. et al. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 60, n. 12, p. 1593–1624, 2014.
- 6 NOVOSELOV S.V. et al. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. **EMBO Journal**, v.21, n. 14, p. 3681-93, 2002.
- 7 HANSEN, D.; HATHAWAY, R.; OLDFIELD, J. E. White muscle and other selenium-responsive diseases of livestock. **PNW**, v. 157, 1993. Disponível em: <http://www.multiminusa.com/sites/www.multiminusa.com/files/pdfs/se_responsive_diseases.pdf>. Acesso em: 28 set. 2018.
- 8 ELGHANDOUR, M. M. Y. et al. Relationship between nutrition and animal diseases. In: SALEM, A. Z. M. (Ed.) **Feed nutrients and animal health**. Saarbrücken: OmniScriptum GmbH & Co., 2013. cap. 1, p. 3-36.
- 9 PEIXOTO, P. V. et al. Experimental and iatrogenic poisoning by sodium selenite in pigs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 561-569, 2017.
- 10 LOW, S. C.; BERRY, M. J. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 6, p. 203-208, 1996.
- 11 SUTTER, M. E. et al. Selenium toxicity: a case of selenosis caused by a nutritional supplement. **Annals of Internal Medicine**, v. 48, n. 12, p. 969-971, 2008.
- 12 SURAI, P. F. **Selenium in nutrition and health**. Nottingham: Nottingham University Press, 2006. 974 p.
- 13 CHEN, J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, n. 3, p. 320-326, 2012.
- 14 MORENO-REYES, R. et al. Kashin–Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 16, p. 1112-1120, 1998.

15 VAN ZUUREN, E. J. et al. Selenium supplementation for Hashimoto's thyroiditis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 6, n. 6, p. 1-47, 2013.

16 VENTURA, M.; MELO, M.; FRANCISCO, C. Selenium and thyroid disease: from pathophysiology to treatment. **International Journal of Endocrinology**, v. 2017, p. 1-9, 2017. doi: 10.1155/2017/1297658.

17 METANIS, N.; BELD, J.; HILVERT, D. The chemistry of selenocysteine. **Patai's Chemistry of Functional Groups**, p.1-73, 2011. doi.org/10.1002/9780470682531.pat0582.

18 BÖCK, A. Biosynthesis of selenoproteins – an overview. **BioFactors**, v. 11, n. 1-2, p. 77-78, 2000.

19 IP, C.; GANTHER, H. E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 7, p. 1167-1170, 1992.

20 WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 11-28, 2004.

21 BÖCK, A.; ROTHER, M. Selenium metabolism in prokaryotes. In: HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J. GLADYSHEV, V. N. (Ed.) **Selenium: its molecular biology and role in human health**. 2nd ed. Berlin: Springer, 2006. cap. 2. p. 9-28.

22 YOKOYAMA, S. Synthesis mechanism of 21st amino acid selenocysteine (Press Release). Disponível em <<http://www.spring8.or.jp>>. Acesso em 07 mar. 2017.

23 BURTON JR., G. A. et al. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 185-188, 1987.

24 TURNER, R. J.; WEINER, J. H.; TAYLOR, D. E. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. **Biometals**, v. 11, n. 3, p. 223-227, 1998.

25 BURK, R. F. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. **FASEB Journal**, v. 5, n. 9, p. 2274-2279, 1991.

26 MIHARA, H. et al. cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6195-6200, 2000.

27 LEINFELDER, W. et al. *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 540-546, 1988.

28 BARANOV, P. V.; GESTELAND, R. F.; ATKINS, J. F. Recoding: translational bifurcations in gene expression. **Gene**, v. 286, n. 2, p. 187-201, 2002.

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

- 30 BERRY, M. J. et al. Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. **EMBO Journal**, v. 12, n. 8, p. 3315-3322, 1993.
- 31 ITOH, Y. et al. Crystal structure of human selenocysteine tRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 18, p. 6259-68, 2009.
- 32 HATFIELD, D. L. et al. Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 81, p. 97-142, 2006. doi: 10.1016/S0079-6603(06)81003-2.
- 33 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1273 p.
- 34 FERNANDES, A. F. **Análise da especificidade do tRNA^{Sec} entre o fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB) e Seril-tRNA sintetase (SerRS) de *Escherichia coli***. 2017. 199 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 35 GLASS, R. S. et al. Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12555-12559, 1993.
- 36 SILVA, I. R. et al. Formation of a ternary complex for selenocysteine biosynthesis in bacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 49, p. 29178-29188, 2015.
- 37 ENGELHARDT, H. et al. Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA^{Sec}-enzyme complex. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 23, p. 3461-3467, 1992.
- 38 NOINAJ, N. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of *Escherichia coli* selenophosphate synthetase. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 499-508, 2012.
- 39 FISCHER, N. et al. . Towards understanding selenocysteine incorporation into bacterial proteins. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 1061-1067, 2007.
- 40 ARAISO, Y. et al. Structural insights into RNA-dependent eukaryal and archaeal selenocysteine formation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 4, p. 1187-1199, 2008.
- 41 FRENCH, R. L. et al. Structural asymmetry of the terminal catalytic complex in selenocysteine synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 28783-28794, 2014.
- 42 WANG, K. T. et al. Crystal structures os catalytic intermediates of human selenophosphate synthetase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 4, p. 747-759, 2009.
- 43 LEIDBUNDGUT, M. et al. Selenocysteine tRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimaera of elongation and initiation factors. **EMBO Journal**, v. 24, n. 1, p. 11-22, 2005.

- 44 KOSSINOVA, O. et al. The SBP2 protein central to selenoprotein synthesis contacts the human ribosome at expansion segment 7L of 28S rRNA. **RNA**, v. 20, n. 7, p. 1046-1056, 2014.
- 45 FORCHHAMMER, K.; BOESMILLER, K.; BÖCK, A. The function of selenocysteine synthase and SELB in the synthesis and incorporation of selenocysteine. **Biochimie**, v. 73, n. 12, p. 1481-1486, 1991.
- 46 XU, X. M. et al. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. **PLOS Biology**, v. 5, n. 1, p. 96-105, 2007.
- 47 FLETCHER, J. E. et al. The selenocysteine incorporation machinery: Interactions between the SECIS RNA and the SECIS-binding protein SBP2. **RNA**, v. 7, n. 10, p. 1442-1453, 2001.
- 48 FLORES, J. N. G. et al. The selenocysteine-specific elongation factor contains a novel and multi-functional domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 46, p. 38936-38945, 2012.
- 49 LACOURCIERE, G. M.; STADTMAN, T. C. Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis. **Biofactors**, v. 14, n. 1-4, p. 69-74, 2001.
- 50 LIMA, C. D. Analysis of the *E. coli* NifS CsdB protein at 2.0 Å reveals the structural basis for perselenide and persulfide intermediate formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 315, n. 5, p. 1199-1208, 2002.
- 51 SERRÃO, Vitor Hugo Balasco. **Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio de Escherichia coli**. 2013. 187 p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 52 PALIOURA, S. et al. The human SepSecS-tRNA^{Sec} complex reveals the mechanism of selenocysteine formation. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 321-325, 2009.
- 53 ITOH, Y. et al. Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 5, p. 1456-1469, 2009.
- 54 COPELAND, P. R. et al. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **EMBO Journal**, v. 19, n. 2, p. 306-314, 2000.
- 55 KOSSINOVA, O. et al. A novel insight into mechanism of mammalian selenoprotein synthesis. **RNA**, v. 19, n. 8, p. 1147-1158, 2013.
- 56 PAPP, L. V. et al. The redox state of SECIS binding protein 2 controls its localization and selenocysteine incorporation function. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 13, p. 4895-4910, 2006.

- 57 CABAN, K.; KINZY, S. A.; COPELAND, P. R. The L7Ae RNA binding motif is a multifunctional domain required for the ribosome-dependent Sec incorporation activity of Sec insertion sequence binding protein 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 18, p. 6350–6360, 2007.
- 58 TAKEUCHI, A. et al. A short motif in *Drosophila* SECIS binding protein 2 provides differential binding affinity to SECIS RNA hairpins. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 7, p. 2126–2141, 2009.
- 59 KROL, A. Evolutionarily different RNA motifs and RNA–protein complexes to achieve selenoprotein synthesis. **Biochimie**, v. 84, n. 8, p. 765–774, 2002.
- 60 KINZY, S. A.; CABAN, K.; COPELAND, P. R. Characterization of the SECIS binding protein 2 complex required for the co-translational insertion of selenocysteine in mammals. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 16, p. 5172–5180, 2005.
- 61 DA SILVA, M. T. et al. Selenocysteine biosynthesis and insertion machinery in *Naegleria gruberi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 188, n. 2, p. 87-90, 2013.
- 62 FRITZ-LAYLIN, L. K. et al. The genome of *naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. **Cell**, v. 140, n. 5, p. 631-642, 2010.
- 63 CHARRIER, B. et al. Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. **New Phytologist**, v. 177, n. 2, p. 319-332, 2008.
- 64 MIHARA H. et al. A nifS-like Gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14768-14772, 1999.
- 65 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. Berlin: Springer, 2006. 954 p.
- 66 OMI, R. et al. Reaction mechanism and molecular basis for selenium/sulfur discrimination of selenocysteine lyase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 16, p. 12133-12139, 2010.
- 67 MAITY, A. N.; CHEN, Y.; KE, S. Large-scale domain motions and pyridoxal-5'-phosphate assisted radical catalysis in coenzyme B12-dependent aminomutases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 3064-3087, 2014.
- 68 MANZINE, L. R. **Identificação de elementos estruturais no tRNA^{sec}_{uca} determinantes da ligação com proteínas**. 2012. 159 p. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 69 VISTICA, J. et al. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. **Analytical Biochemistry**, v. 326, n. 2, p. 234-256, 2004.

70 LAUE, T. et al. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In: HARDING, S.; HORTON, J. (Ed.) **Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992. p. 90–125.

71 GREK, S. B.; DAVIS, J. K.; BLABER, M. An efficient, flexible-model program for the analysis of differential scanning calorimetry data. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 6, p. 429-436, 2001.

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

73 VAN HEEL, M. et al. Four- dimensional cryo- electron microscopy at quasi- atomic resolution: IMAGIC 4D. In: ARNOLD, E.; HIMMEL, D. M.; ROSSMANN, M. G. **International Tables for Crystallography, volume F: crystallography of biological macromolecules**. 2nd ed. 2012. cap. 19.9. p. 624-628. online.

74 HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D**: an introduction and overview. Grenoble: ERSF, 1997. ERSF Internal Report. ESRF, BP 220, 38043.

75 PETOUKHOV, M. V. et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 45, n. Pt 2, p. 342-350, 2012.

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

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

78 KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2004.

79 DOMINGUEZ, C.; BOELEN, R.; BONVIN, A. M. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 7, p. 1731-1737, 2003.

80 YANG, J. et al. The I-TASSER suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p.7-8, 2015.

81 BRAMUCCI, E. et al. PyMod: sequence similarity searches, multiple sequence-structure alignments, and homology modeling within PyMOL. **BMC Bioinformatics**, v. 13, Suppl 4, p. S2, 2012.

82 KIM, I. Y.; VERES, Z.; STADTMAN, T. C. *Escherichia coli* mutant SELD enzymes. the cysteine 17 residue is essential for selenophosphate formation from ATP and selenide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 19650-19654, 1992.

- 83 SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252-260, 2000.
- 84 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, Pt 2, p. 125-132, 2010.
- 85 WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 67, Pt 4, p. 235-242, 2011.
- 86 POTTERTON, E. et al. A graphical user interface to the CCP4 program suite. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 59, Pt 7, p. 1131-1137, 2003;
- 87 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, Pt 4, p. 658-674, 2007.
- 88 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, Pt 2, p. 213-221, 2010.
- 89 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, Pt 4, p. 486-501, 2010.
- 90 HATFIELD, D. et al. Selenocysteyl-tRNAs recognize UGA in *Betavulgaris*, a higher plant, and in *Gliocladium virens*, a filamentous fungus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 184, n. 1, p. 254-259, 1992.
- 91 RUDINGER-THIRION, J.; GIEGÉ, R. The peculiar architectural framework of tRNA^{Sec} is fully recognized by yeast AspRS. **RNA**, v. 5, n. 4, p. 495-502, 1999.
- 92 STELLBERGER, T. et al. Improving the yeast two-hybrid system with permuted fusions proteins: the Varicella Zoster Virus interactome. **Proteome Science**, v. 15, p. 1-8, 2010.
- 93 Katzen, F. Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 2, n. 4, p. 571-589, 2007.
- 94 BARDSLEY, W. G.; CHILDS, R. E. Sigmoid curves, non-linear double-reciprocal plots and allostereism. **Biochemical Journal**, v. 149, n. 2, p. 313-328, 1975;
- 95 SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; SCHOMBURG, D. BRENDA, enzyme data and metabolic information. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 47-49, 2002.
- 96 MIHARA, H. et al. Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. **Journal of Biochemistry**, v. 127, n. 4, p. 559-567, 2000.
- 97 WILKINSON, J. H. Enzyme kinetics and its relevance to enzyme assay. **Journal of Clinical Pathology**, v. 4, p. 14-21, 1970.

98 CHOCAT, P. et al. Purification and characterization of selenocysteine beta-lyase from *Citrobacter freundii*. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 669-676, 1985.

99 HEIDENREICH, T. et al. Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 6, p. 4213-4218, 2005.

100 CHILOM, C. G.; CRAESCU, C. T.; POPESCU, A. I. Parameters of interaction between proteins and their specific ligands, deduced by isothermal titration calorimetry. **Romanian Journal of Physics**, v. 51, n. 3-4, p. 443-457, 2006.

101 DU, X. et al. Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1-34, 2016.

102 GRÜNBERG, R.; NILGES, M.; LECKNER, J. Flexibility and conformational entropy in protein-protein binding. **Structure**, v. 14, n. 4, p. 683-693, 2006.

103 FISCHER, H. et al. The molecular weight of proteins in solution can be determined from a single SAXS measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, n. 1, p. 101-109, 2010.

104 OLIVEIRA NETO, M. **Espalhamento de raios-X a baixo ângulo aplicado ao estudo estrutural de proteínas**. 2008. 153 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008;

105 MIHARA, H. et al. Structure of external aldimine of *Escherichia coli* CsdB, an IscS/NifS homolog: implications for its specificity toward selenocysteine. **Journal of Biochemistry**, v. 131, n. 5, p. 679-685, 2002.

106 PEARCE, N. M.; KROJER, T.; VON DELFT, F. Proper modelling of ligand binding requires an ensemble of bound and unbound states. **Acta Crystallographica D: structural biology**, v. 73, Pt 3, p. 256-266, 2017.

107 ZHENG, H. et al. CheckMyMetal: a macromolecular metal-binding validation tool. **Acta Crystallographica D: structural biology**, v. 73, Pt 3, p. 223-233, 2017.

108 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v. 66, Pt 1, p. 12-21, 2010.

109 DONAVAN, J. et al. A novel protein domain induces high affinity selenocysteine insertion sequence binding and elongation factor recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 50, p. 35129-35139, 2008.

110 ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

111 MILBURN, D.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. Sequences annotated by structure: a tool to facilitate the use of structural information in sequence analysis. **Protein Engineering**, v. 11, n. 10, p. 855-859, 1998.

- 112 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 243-251, 2000.
- 113 ARRONDO, J. L. et al. Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 23-56, 1993.
- 114 BERNADÓ, P.; SVERGUN, D. I. Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 1, p. 151-167, 2012.
- 115 TRIA, G. et al. Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering. **IUCrJ**, v. 2, Pt 2, p. 207-217, 2015.
- 116 MOULTON, V. et al. RNA folding argues against a hot-start origin of life. **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, n. 4, p. 416-421, 2000.
- 117 TAJMIR-RIahi, H.A.; N'SOUKPOÉ-KOSSI, C. N.; JOLY, D. Structural analysis of protein-DNA and protein-RNA interactions by FTIR, UV-visible and CD spectroscopic methods. **Journal of Spectroscopy**, v. 23, n. 2, p. 81-101, 2009.
- 118 ENGVALL, E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. **Methods in Enzymology**, v. 70, n. A, p. 419-439, 1980.
- 119 BELLINI, N. K. **Estudo celular, bioquímico e biofísico da enzima selenofosfato sintetase de Naegleria gruberi**. 2015. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- 120 FRITZINGER, A. E. et al. Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1189-1195, 2006.
- 121 PERKINS, D. N. et al. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis**, v. 20, n. 18, p. 3551-67, 1999.
- 122 BIAN, C. et al. The Asian arowana (*Scleropages formosus*) genome provides new insights into the evolution of an early lineage of teleosts. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-17, 2016. doi: 10.1038/srep24501.
- 123 EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427-D432, 2019.
- 124 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 172, p. 1-17, 2014.
- 125 KYPR, J. et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 6, p. 1713-1725, 2009.

126 MOUILLON, J. M.; GUSTAFSSON, P.; HARRYSON, P. Structural investigation of disordered stress proteins. Comparison of full-length dehydrins with isolated peptides of their conserved segments. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 638-650, 2006.

127 UVERSKY, V.; LONGHI, V. **Instrumental analysis of intrinsically disordered proteins: assessing structure and conformation**. Hoboken: Wiley, 2010. 760 p.

128 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry: part II – techniques for the study of biological structure and function**. San Francisco: Freeman and Co., 1980.

129 BYLER, D. M.; SUSI, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. **Biopolymers**, v. 25, n. 3, p. 469-478, 1986.

130 CALLAWAY, D. J. E. et al. Controllable activation of nanoscale dynamics in a disordered protein alters binding kinetics. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 7, p. 987-998, 2017.

131 DEMETZOS, C. Differential scanning calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 3, p. 159-173, 2008.

132 PERMYAKOV, S. E. Differential scanning microcalorimetry of intrinsically disordered proteins. **Methods in Molecular Biology**, v. 896, p. 283-296, 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-3704-8_19.

133 COOPER, A.; NUTLEY, M. A.; WADOOD, A. Differential scanning microcalorimetry. In: HARDING, S. E.; CHOWDHRY, B. Z. (Ed.) **Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry**. Oxford: Oxford University Press, 2000, p. 287-318.

134 KAPŁON, T. M. et al. The rod-shaped conformation of Starmaker. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 11, p. 1616-1624, 2009.

135 WANG, X. et al. A large intrinsically disordered region in SKIP and its disorder-order transition induced by PP1L1 binding revealed by NMR. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4951-4963, 2010.

136 KIKHNEY, A. G.; SVERGUN, D. I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. **FEBS Letters**, v. 589, n. 19 Pt A, p. 2570-2577, 2015.

137 MOLLICA, L. et al. Binding mechanisms of intrinsically disordered proteins: theory, simulation, and experiment. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, n. 52, p. 1-18, 2016.

138 DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 3, p. 197-208, 2005.

139 DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Intrinsically disordered proteins in cellular signaling and regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 18-29, 2015.

- 140 JEMTH, P. et al. A frustrated binding interface for intrinsically disordered proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 5528-5533, 2014.
- 141 PROTTER, D. S.W. et al. Intrinsically disordered regions can contribute promiscuous interactions to RNP granule assembly. **Cell Reports**, v. 22, n. 6, p. 1401-1412, 2018.
- 142 VAN DER LEE, R. et al. Classification of intrinsically disordered regions and proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 13, p. 6589-6631, 2014.
- 143 CABAN, K.; COPELAND, P. R. Size matters: a view of selenocysteine incorporation from the ribosome. **Cellular and Molecular Life Sciences:CMLS**, v. 63, n. 1, p. 73-81, 2006.
- 144 BÖCK, A. et al. Selenocysteine: the 21st amino acid. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 515-520, 1991.
- 145 BOAMAH, E. K. et al. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2012.
- 146 BAI, C. et al. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. **Cell**, v. 86, n. 2, p. 263-274, 1996.
- 147 DIHANICH, S.; et al. GTP binding controls complex formation by the human ROCO protein MASL1. **FEBS Journal**, v. 281, n. 1, p. 261-274, 2014.

ANEXO A – ARTIGOS PUBLICADOS

- 1) **Jéssica Fernandes Scortecci**, Vitor Hugo Balasco Serrão, Juliana Cheleski, Juliana Roberta Torini, Larissa Romanello, Ricardo DeMarco, Humberto D'Muniz Pereira: Spectroscopic and calorimetric assays reveal dependence on dCTP and two metals (Zn^{2+} + Mg^{2+}) for enzymatic activity of *Schistosoma mansoni* deoxycytidylate (dCMP) deaminase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 08/2017; 1865(11)., DOI:10.1016/j.bbapap.2017.07.015

- 2) Vitor Hugo Balasco Serrão, Ivan Rosa Silva, Marco Tulio Alves da Silva, **Jéssica Fernandes Scortecci**, Adriano de Freitas Fernandes, Otavio Henrique Thiemann*. The unique tRNA^{Sec} and its role in Selenocysteine synthesis. *Amino Acids*, 2018, DOI:10.1007/s00726-018-2595-6.

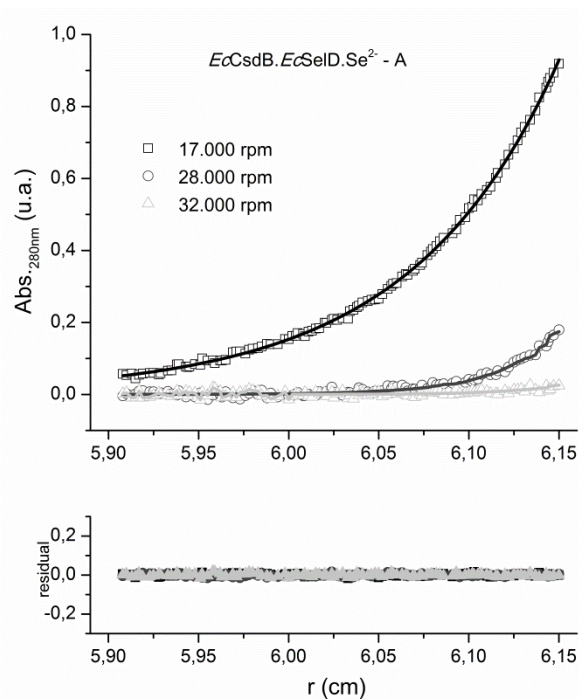
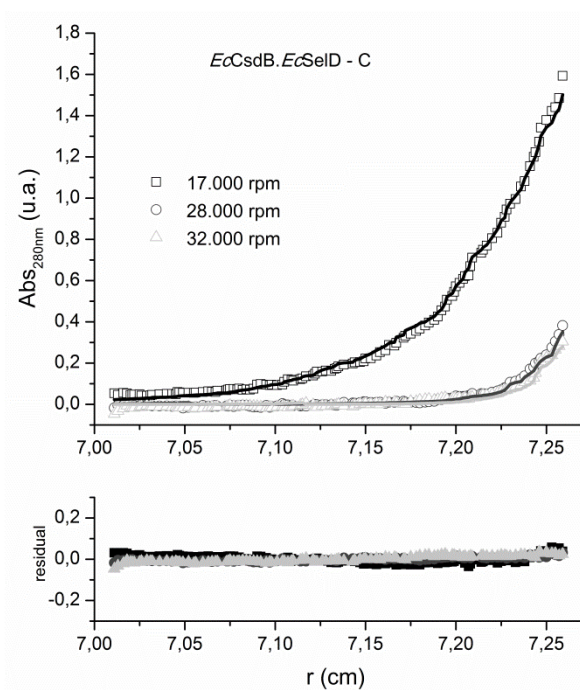
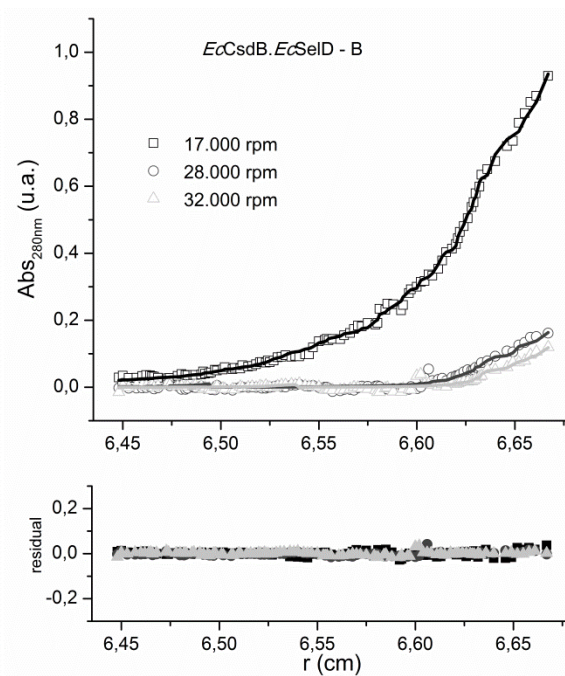
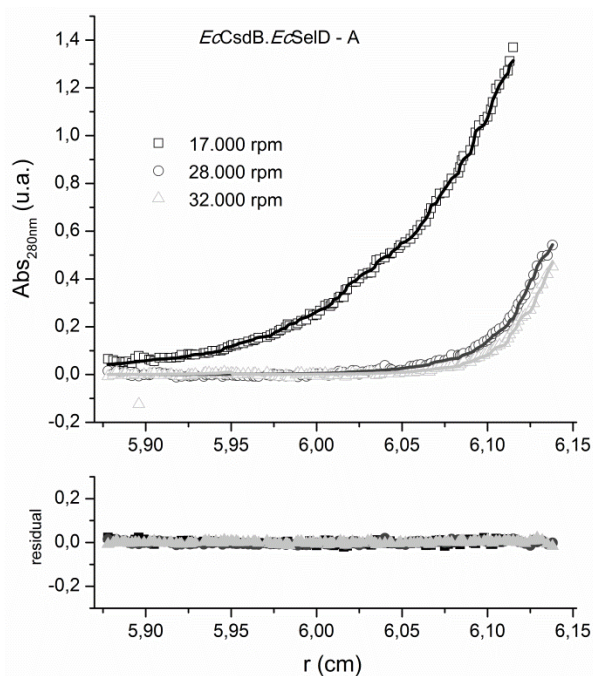
ANEXO B – MANUSCRITOS EM FASE FINAL DE REVISÃO

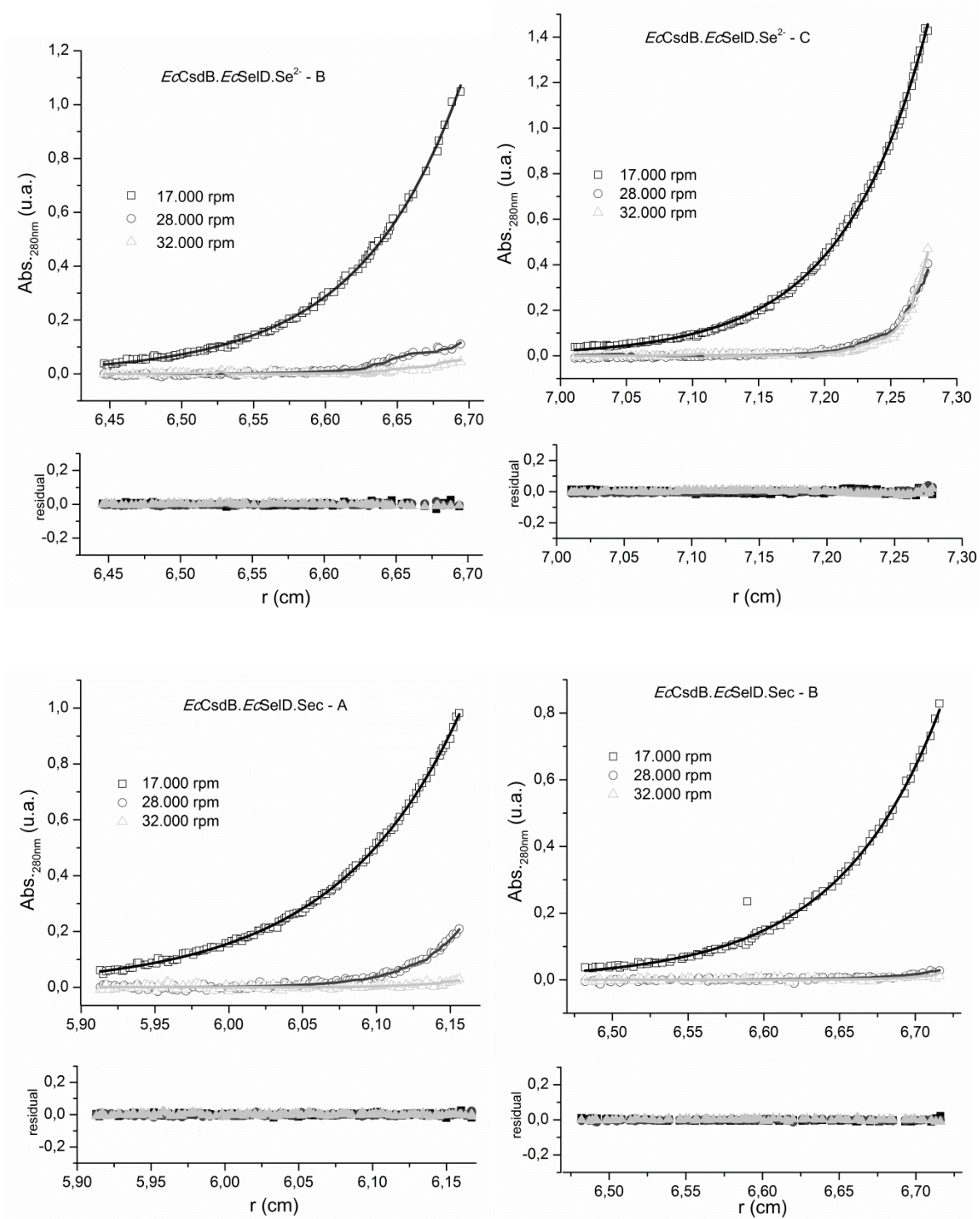
- 1) Vitor Hugo Balasco Serrão; Adriano de Freitas Fernandes; Luis Guilherme Mansor Basso; Edson Crusca Júnior; **Jéssica Fernandes Scortecci** and Otavio Henrique Thiemann*. The specific elongation factor to selenocysteine incorporation in *Escherichia coli*: tRNA^{Sec} unique recognition and its interactions by biophysical approaches. (Journal of Molecular Biology, 2018).

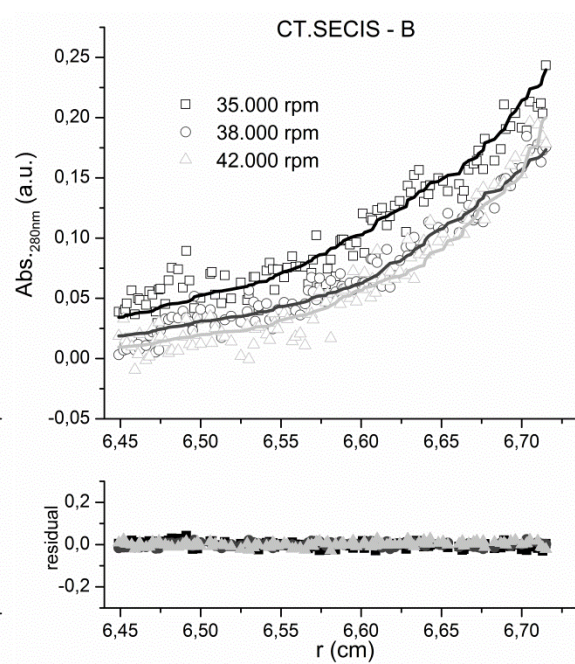
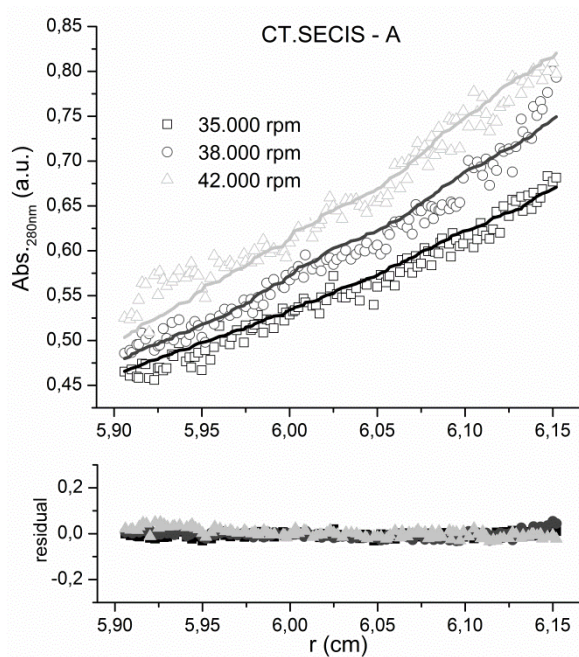
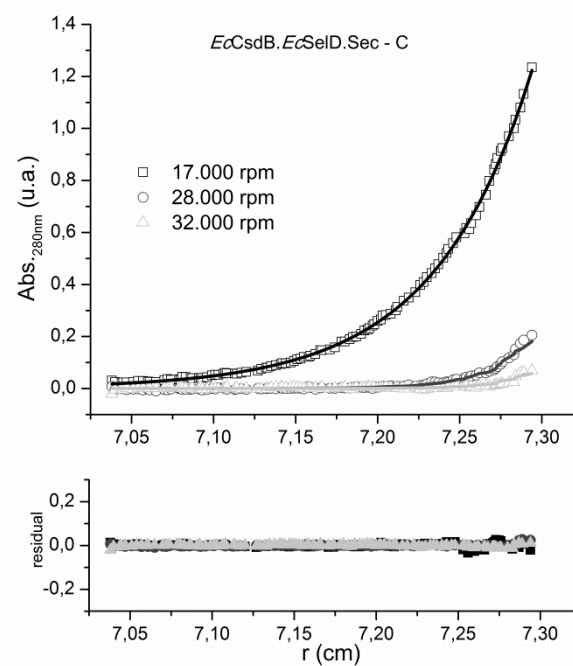
- 2) **Jessica Fernandes Scortecci**, Vitor Hugo Balasco Serrão, Adriano de Freitas Fernandes, Luis Guilherme Mansor Basso, Mário de Oliveira Neto and Otavio Henrique Thiemann*. Characterization of the macromolecular interaction between Selenocysteine Lyase and Selenophosphate Synthetase at the beginning of selenocysteine biosynthesis pathway in *E. coli*. (FEBS Journal, 2018).

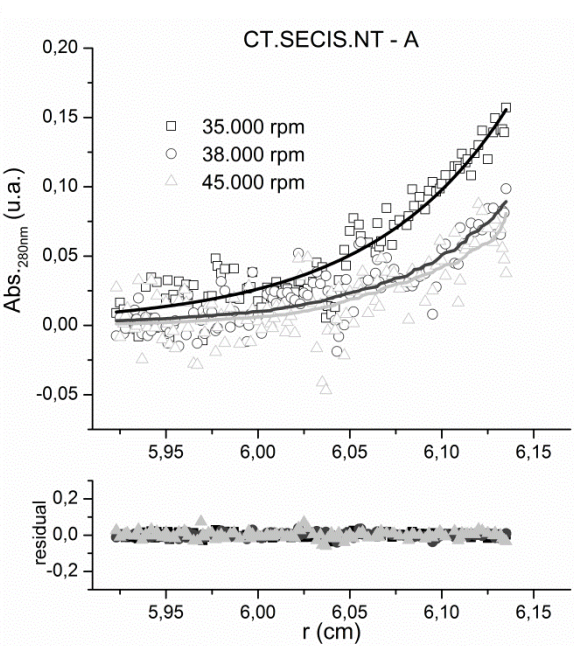
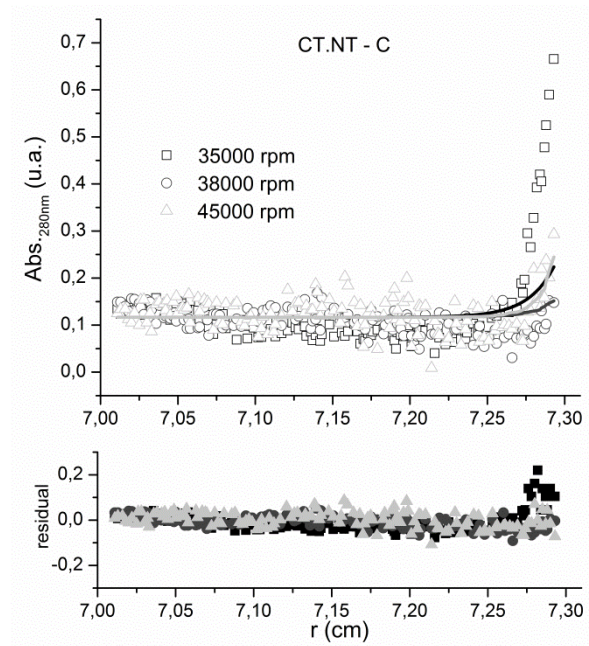
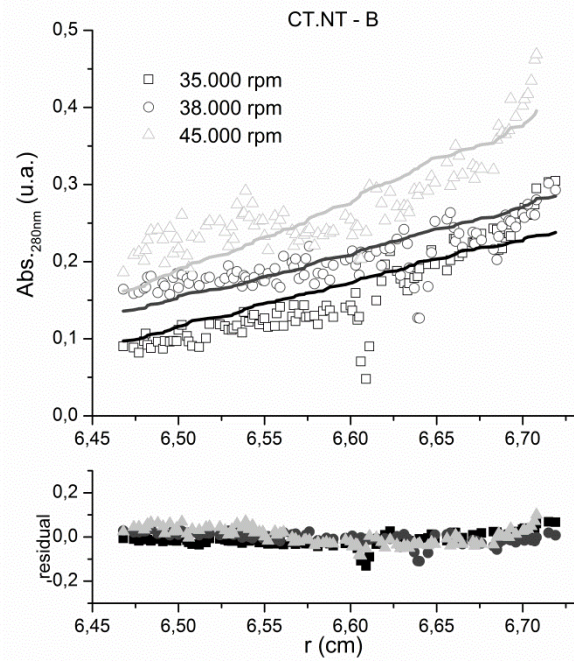
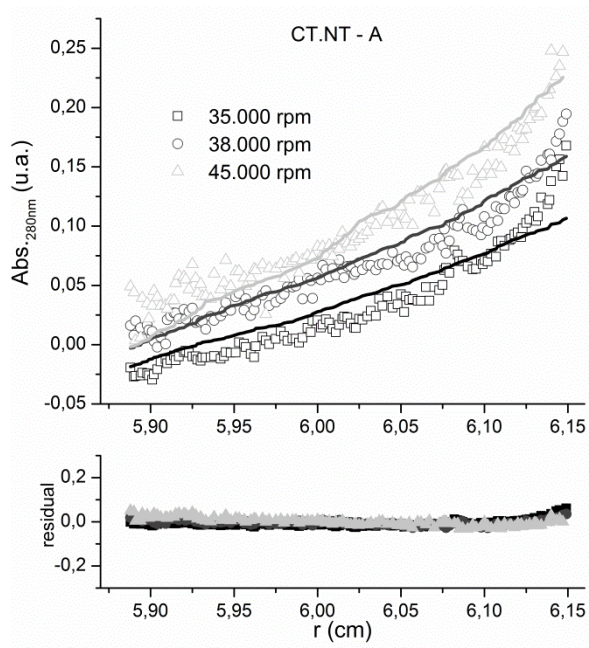
- 3) Adriano de Freitas Fernandes; Vitor Hugo Balasco Serrão; **Jéssica Fernandes Scortecci**; and Otavio Henrique Thiemann*. Investigation of tRNA^{Sec} and Seryl tRNA synthetase specificity at the beginning of Sec biosynthesis in Bacteria. (Archives of Biochemistry and Biophysics, 2019)

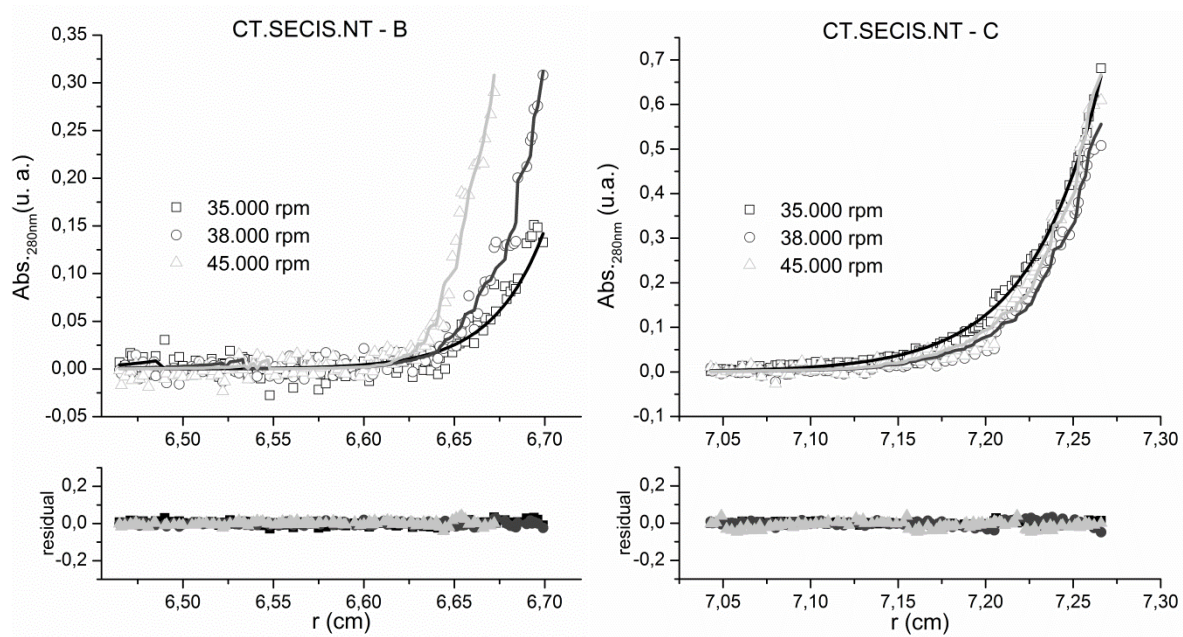
ANEXO C - GRÁFICOS DE Abs_{280nm} X r (cm) OBTIDOS NAS ANÁLISES DE SEDIMENTAÇÃO EM EQUILÍBRIO POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA

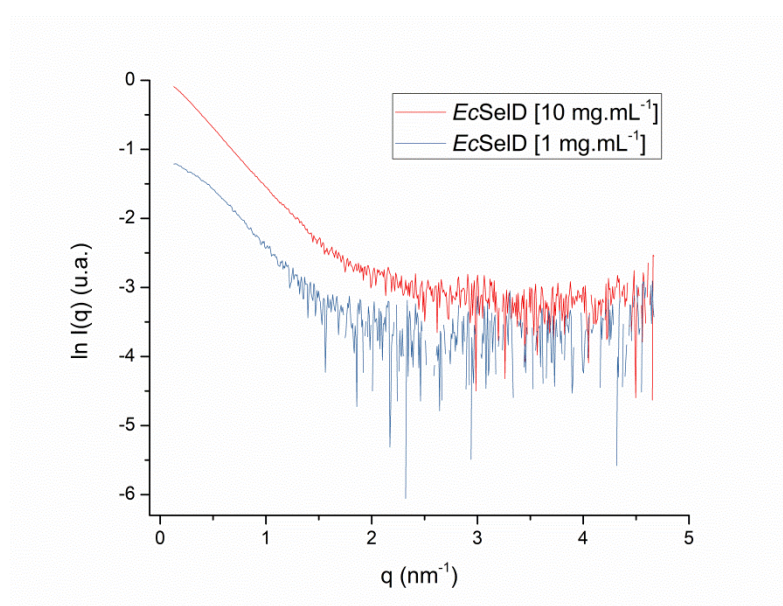
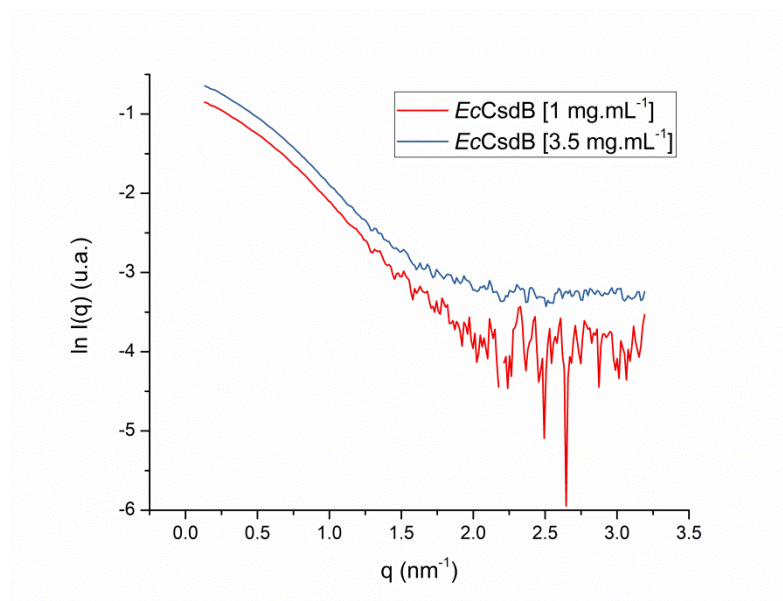


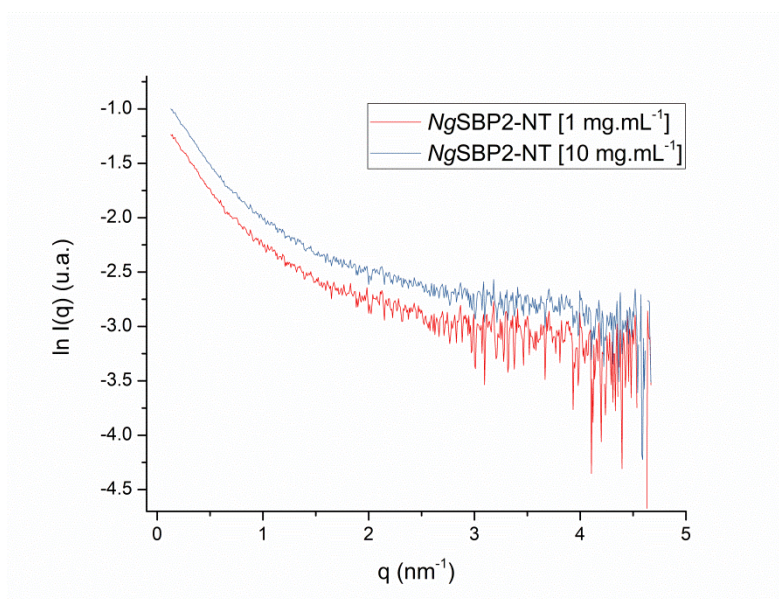
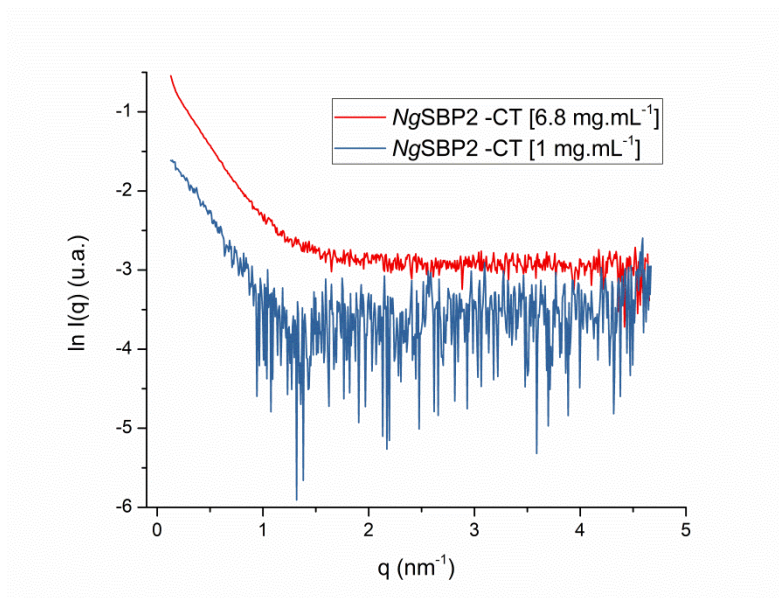
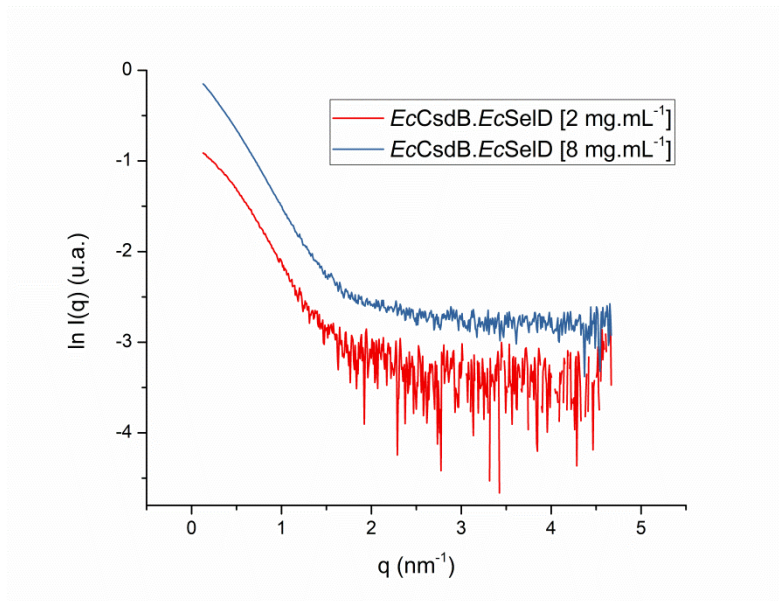








ANEXO D - CURVAS DE ESPALHAMENTO EXPERIMENTAIS (SAXS)



ANEXO E - SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS EM ESTUDO

EcCsdB

MTFSVDKVRADFPVLSREVNGLPLAYLDSAASAQKPSQVIDAEAEFYRHGYAAVHRGIHTLSAQATEKME
 NVRKRASLFINARSAEELVFRGTTEGINLVANSWGNNSVRAGDNI I I SQMEHHANIVPWQMLCARVGAE
 LRVIPLNPDGTLQLETLPFLFDEKTRLLAITHVSNVLGTENPLAEMITLAHQHGAKVLVDGAQAVMHPV
 DVQALDCDFYVFSGHKLYGPTGIGILYVKEALLQEMPPWEGGSMIATVSLSEGTWTWKAPWRFEAGTPN
 TGGI I GLGAALEYVSAQGLNNAEYEQNLMHYALSQLESVPDLTLYGPQNRLGVIAFNLGKHHAYDVGSF
 LDNYGIAVRTGHHCAMPLMAYYNVPAMCRASLAMYNTHEEVDRLVTGLQRIHRLLG

EcSelD

MNENSIRLTQYSHGAGCGCKISPKVLETILHSEQAKFVDPNLLVGNETRDDAAVYDLGNGTSVISTTDFD
 MPIVDNPFDFGRIAATNAISDIFAMGGKPIMAIAILGWPINKLSPEIAREVTEGGRYACRQAGIALAGGH
 SIDAPEPIFGLAVTGIVPTERVKKNSTAQAGCKLFLTKPLGIGVLTAEKKSLLKPEHQGLATEVMCRMN
 IAGASFANIEGVKAMTDVTFGFLGLHLSMCQGAGVQARVDYDAIPKLPGVVEEYIKLGAVPGGTERNFAS
 YGHLMGEMPREVRDLLCDPQTSGLLLAVMPEAENEVKATAAEFGIELTAIGELVPARGGRAMVEIR

Ng-SBP2-NT

MAGYNLNFPTVASADNEESPQQSAKFSYKDILTSTPISLLPNNLEPTFNNPVINQKTLSPQKTSETSKASLKQVV
 SDIPIVEKKKNKKFTLADHIGEEISRKINFSSNTNSHEKSTVSKQATKTTKKEIPKDDNTKKSLSKMNRVEKAF
 LSKGDMKGMKPIRLEIRSEDASKITNEDVYNAFIKAVTHSTNEESTEALVTVL

Ng-SBP2-CT

MTKKNKPNLKKLILKEKEIRKLHNIAPGEFLDVKKFLKLNKEDTETESVVIEIVPEKTEETTILENSKITLTKE
 DDSSDGEEKLVADDEMDILSIAESMEVVLKNSNERKIREYVNYPLDPDYENIIFQMLTKLQFYQFRLKKTDKKKF
 KQRLRYVIGIREVLKGLKLRVAVIAPNIDKVTTPGGGLDTKIEEIIQKCNEQELPVFFALTKKKLGTAMKTST
 KISLVGLYSMDGAFDEFKAKQIVEEKLLAIEKQKKEQNRSGSVCTEQPGNVDLKN