

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

VITOR HUGO BALASCO SERRÃO

**Caracterização das interações macromoleculares das proteínas envolvidas  
na síntese de selenocisteínas em *Escherichia coli***

São Carlos  
2017



VITOR HUGO BALASCO SERRÃO

Caracterização das interações macromoleculares das proteínas envolvidas na síntese de selenocisteínas em *Escherichia coli*

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

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular.

Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann

Co-orientador: Dr. Rodrigo Villares Portugal

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2017

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

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Serrão, Vitor Hugo Balasco  
Caracterização das interações macromoleculares das  
proteínas envolvidas na síntese de selenocisteínas em  
*Escherichia coli* / Vitor Hugo Balasco Serrão;  
orientador Otavio Henrique Thiemann; co-orientador  
Rodrigo Villares Portugal -- São Carlos, 2017.  
256 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São  
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Selenocisteína. 2. Interação proteína-RNA. 3.  
Interação proteína-proteína. I. Thiemann, Otavio  
Henrique, orient. II. Portugal, Rodrigo Villares, co-  
orient. III. Título.

*Aos meus avós (Dona Rita in memoriam e Seu João), ao meu pai (Aguinaldo) e minha  
namorada (Jéssica), obrigado por tudo!*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter possibilitado tudo o que aconteceu na minha vida até esse momento e não tem deixado nada faltar ou me abater;

Aos meus avôs, Dona Rita (*in memoriam*) e Seu João, que com toda dificuldade do mundo, assumiram a responsabilidade de me criar e educar, não há como agradecer, mas posso tentar mostrar um pouco que os amo e fazer o possível para orgulhar vocês;

Agradeço de todo o coração à Jéssica Fernandes, minha querida e amada namorada, por toda paciência (e muita paciência!), além do auxílio que tem me dado ao longo desses anos. Sem você, nada disso teria sido possível... obrigado por tudo! Te amo demais! e espero poder um dia retribuir tudo o que tem feito por mim =)

Sem esquecer da minha querida sogra (Re!) que sempre me apoiou e me deu o maior apoio em tudo;

Ao meu Pai, que é para mim um exemplo de vida, no qual me espelho, e espero ainda poder orgulhar;

À Universidade de São Paulo e, em particular, o campus de São Carlos, onde conheci amigos, colegas, onde fiz um pouco de tudo, e acredito ter feito o melhor da minha graduação, mestrado e agora doutorado, obrigado CAASO por tudo;

Ao Instituto de Física de São Carlos que, apesar de todas as dificuldades e tropeços durante esses anos, agregou-me valores e conhecimento graças a sua incrível infraestrutura física e humana, em especial ao Grupo de Cristalografia e Laboratório de Biologia Estrutural (LBEst), que desde os primórdios da minha graduação tem sido presente no meu cotidiano e toda a convivência com o Grupo de Biofísica “Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas”;

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann pela orientação, amizade, companheirismo e por ter me dado uma oportunidade, obrigado por tudo, serei eternamente grato;

Aos meus alunos e amigos de iniciação Jéssica, Adriano, Rapha e Saia. Todos vocês foram essenciais para que esse projeto tenha sido realizável. Sobretudo, ao Adriano, pois com seu

empenho exemplável e infindáveis horas de dedicação e trabalho fizeram com que esse projeto fosse possível;

Aos Drs. Fernando Alessandro e Marcel Nakahira pela oportunidade que me concederam, um aluno ainda no primeiro semestre, e por todos os ensinamentos e amizade. A Dra. Livia Regina Manzine (“chefe”), pela amizade, carinho e toda a ajuda que me ofereceu durante todos esses anos, não há como agradecer, essa tese é parte sua também;

Ao Prof. Dr. Marin van Heel (*Faculty of Science – Universiteit Leiden – Holanda*) pela colaboração, discussões produtivas e oportunidade que me deu ao me aceitar no NeCEN (*Netherlands Center of Eletron Nanoscopy – Universiteit Leiden, Holanda*) sob sua supervisão. Ao Dr. Sacha de Carlo, Dr. Pavel Afanasyev e Bart Alewijnse pela coleta, análise prévia de dados de Cryo-EM e ajuda durante esse período de aprendizado. Também agradecer à Dra. Katie Riciluca por me aguentar por 6 meses;

Ao Dr Rodrigo Villares Portugal, por todos os finais de semana de microscópio, análises dos dados, e-mails e por ter muita paciência comigo e pela co-orientação. As discussões que tivemos foram de grande valia para meu crescimento científico. Além de agradecer ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano – CNPEM) e ao Dr. Alexandre Cassago por toda ajuda e coleta de dados de microscopia eletrônica. Aos Laboratório Nacional de Biociências (LNBio - CNPEM), especialmente o laboratório de espectroscopia e calorimetria (LEC) e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - CNPEM) pela utilização das linhas SAXS1 e MX2;

Aos Professores Mário Palma, Marinônio Cornélio e Alessandro Nascimento. Além de agradecer à infraestrutura do Departamento de Física (UNESP-São José do Rio Preto) e ao Prof. Mário Sergio Palma e Dra. Bibiana Monson ambos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS – UNESP-Rio Claro). Ao Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (Miúdo) da FFCLH-RP por toda ajuda e anos de futebol praticados;

Ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira, por ser tão chato e ser meu amigo, por todos os ensinamentos e oportunidades concedidas;

A todos os Professores da Cristalografia e da Biofísica pelo apoio e colaboração em ideias

para o andamento desse projeto;

A todos os funcionários envolvidos com esse grupo de pesquisa, Rejane, Lu, Fernando Falvo, Su, Bel, Andressa e Augusto, vocês foram fundamentais em toda ajuda fornecida, sem contar o pessoal da Graduação (Edvane, Bel e Beth) e da pós (Ricardo e Silvio) que sempre foram solícitos e quebraram incontáveis “galhos”, obrigado. De um modo geral, a todos os funcionários do IFSC, desde pessoas da infraestrutura e informática (Ivanzinho, João, Luciano, Savério e Sabá), como as meninas da biblioteca, dos laboratórios de ensino (Brêtas, Rafael, Antenor, Jae e Seu Hélio), administrativos (Maurício e Ivani) e de todo campus: Luizão, Giba, Mi, Flavinho, Mario, Tia Celly e vários outros;

A todos os amigos e colegas do grupo de Cristalografia e da Biofísica, que sempre proporcionaram momentos de descontração, seja em apostas de futebol ou meras conversas pelos corredores, cafés e ideias de projetos;

Agradeço também às agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2012/23730-1), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, 140636/2013-7) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Além do Programa “Ciência sem Fronteiras” pelo financiamento do período realizado na Universiteit Leiden (Holanda) (232251/2014-2) e do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos (DF/UFSCar) pelo período de trabalho como professor substituto (Ago/2013 – Jan/2015, 23112.002021/2013-21).

Sem deixar de esquecer, meus amigos para todas as horas.... seja para o futebol, “fazer gordice”, zoação, brincadeiras, truco na hora do almoço... os feras que sempre estão por perto: Frodo, Frutili, Ronaldo, Anderson, Link, Coxinha, Sandy, Zé, Nardão, a velha família GAPeria, a galera do MBA em “Relações Públicas” que sempre dão risada quando falo minha profissão, ao FUTSAL CAASO pelos anos de amizade e sem esquecer aqueles que são amigos de longa data, Cauê, Ozzy, Hilde, Poli, Selvagem, Álvaro, Felipe Lucas e Will, além do meu cachorro, “parcero pra todas as horas”.

**MUITO OBRIGADO A TODOS!**



*"Escolha uma ideia. Faça dessa ideia a sua vida. Pense nela, sonhe com ela, viva pensando nela. Deixe cérebro, músculos, nervos, todas as partes do seu corpo serem preenchidas com essa ideia. Esse é o caminho para o sucesso."*

**Swami Vivekananda**

12 de Janeiro de 1863 – 04 de Julho de 1902

Pensador hindu



## RESUMO

SERRÃO, V. H. B. **Caracterização das interações macromoleculares das proteínas envolvidas na síntese de selenocisteínas em *Escherichia coli***. 2017. 256p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O estudo de processos de tradução do código genético em proteínas desperta o interesse pelo seu papel central no metabolismo celular, em particular, o estudo da via de síntese de novos aminoácidos, como a selenocisteína e a pirrolisina, que resultam na expansão do código genético dos 20 aminoácidos canônicos para um total de 22 aminoácidos. A selenocisteína (Sec, U) é um aminoácido que representa a principal forma biológica do elemento selênio e sua incorporação ocorre através de um processo cotraducional em selenoproteínas como resposta ao códon UGA em fase, usualmente interpretado como códon de parada. Essa incorporação requer uma complexa maquinaria molecular distinta entre os três domínios da vida em que as selenoproteínas estão presentes: Bactéria, Arquéia e Eucária. Em *Escherichia coli*, a via se inicia com a aminoacilação do tRNA específico para a incorporação de selenocisteínas (SelC, tRNA<sup>Sec</sup>) com um resíduo de L-serina pela seril-tRNA sintetase (SerRS) formando o tRNA carregado Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> que é entregue ao complexo homodecamérico selenocisteína sintase (SelA) responsável pela conversão Ser-Sec utilizando a forma biológica de selênio entregue pela enzima selenofosfato sintetase (SelD). Uma vez carregado com L-selenocisteína, o Sec-tRNA<sup>Sec</sup> é então carregado pelo fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB) para a sua incorporação na cadeia polipeptídica nascente na posição UGA adjunta ao elemento SECIS (S*E*lenoCysteine Insertion Sequence), uma estrutura em grampo presente no RNA mensageiro que indica o códon de inserção de selenocisteínas. Uma vez que elementos contendo selênio são tóxicos para o ambiente celular, interações entre as enzimas da via se fazem necessárias, onde as enzimas participantes em procariotos são conhecidas e caracterizadas individualmente, no entanto, suas interações macromoleculares nas diferentes etapas ainda não foram caracterizadas. Este projeto visa à caracterização macromolecular e estrutural das interações entre as enzimas SelA e SelB com os RNAs participantes tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS além do ribossomo de *E. coli*. Para isso, amostras de SelA, SelB, tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS e ribossomo foram obtidas através de diferentes metodologias. Para SelA e tRNA<sup>Sec</sup> foram utilizados protocolos já estabelecidos enquanto que, para SelB, fez-se necessário a otimização do protocolo previamente publicado e, conseqüentemente, nova caracterização biofísica através de metodologias como difração circular (CD) e fluorescência intrínseca (IFS). Para análise das interações, medidas de espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS), ultracentrifugação analítica (AUC) e calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram utilizadas para determinação dos parâmetros de interação dos diferentes complexos estudados. Somado a isso, experimentos de cinética GTPásica foram realizados na formação dos complexos e, além disso, foram gerados modelos estruturais utilizando diferentes metodologias como espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) além de estudos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os estudos propostos irão auxiliar no entendimento do mecanismo de incorporação deste aminoácido em bactérias bem como nos demais domínios da vida além de elucidar o mecanismo sequencial de eventos, provendo conhecimento e desenvolvendo metodologias para sistemas complexos de interação proteína-proteína e proteína-RNA.

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



## ABSTRACT

SERRÃO, V.H.B. **Characterization of the macromolecular interactions of proteins involved in the synthesis of selenocysteines in *Escherichia coli***. 2017. 256p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The study of genetic code processes in proteins is a central role in cell metabolism, in particular the study of the synthesis pathway of new amino acids, such as selenocysteine and pyrrolysine, which resulted in the expansion of the genetic code of the 20 canonical amino acids for 22 amino acids. Selenocysteine (Sec, U) is an amino acid that represents a major biological form of selenium element and its incorporation through a co-translational process in selenoproteins in response to the in-phase UGA-codon, usually interpreted as stop-codon. This incorporation requires a complex molecular machinery distinct between the three domains of life in which, as selenoprotein has present: Bacteria, Archaea and Eukaria. In *Escherichia coli*, an initiation pathway with an aminoacylation of the tRNA specific for the incorporation of selenocysteines (SelC, tRNA<sup>Sec</sup>) with an L-serine residue by seril-tRNA synthetase (SerRS) resulting in the charged tRNA Ser-tRNA<sup>[Ser] Sec</sup> that is delivered to the homodecameric complex selenocysteine synthase (Sela), responsible for Ser-Sec conversion using the biological form of selenium delivered by the enzyme selenophosphate synthetase (SelD). Once loaded with L-selenocysteine, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> is then carried by the selenocysteine-specific elongation factor (SelB) for incorporation into the nascent polypeptide chain at the UGA position attached to the SECIS (*SElenoCysteine Insertion Sequence*) element, staple structure that indicates the insertion codon of selenocysteines. Since elements containing selenium are toxic to the cell, interactions between how pathway enzymes are made, where the enzymes participating in concepts are known and characterized individually, however, their macromolecular interactions in the different steps have not yet been characterized. This project aims at the macromolecular and structural characterization of the interactions between Sela and SelB enzymes with the RNAS tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS participants in addition to the *E. coli* ribosome. For this, as samples of Sela, SelB, tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS and ribosome were obtained through different methodologies. For Sela and tRNA<sup>Sec</sup>, protocols were used to determine parameters for SelB, it was necessary to optimize a previously published protocol and, consequently, a new biophysical characterization through methodologies such as circular dichroism (CD) and intrinsic fluorescence spectroscopy (IFS). To analyze the interactions, measurements of fluorescence anisotropy spectroscopy (FAS), analytical ultracentrifugation (AUC) and differential scanning calorimetry (DSC) were used to determine the interaction parameters of different complexes studied. In addition, GTPases activity experiments were carried out in the formation of the complexes and, in addition, we have generated models that characterize different methodologies such as small angles X-ray scattering (SAXS) and transmission electron microscopy (TEM). The proposed studies will aid in understanding the mechanism of incorporation of this amino acid into bacteria as well as the other domains of life besides elucidating the sequential mechanism of events, providing knowledge and development of methodologies for complex protein-protein and RNA-protein interaction systems.

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



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Exemplos de complexos macromoleculares. O spliceossomo (à esquerda) e o ribossomo 80S (à direita), ambos de *S. cerevisiae*, são exemplos de complexos macromoleculares cruciais para o metabolismo celular e tiveram suas estruturas elucidadas através de análise de partícula isolada por crio-microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM).<sup>5-6</sup> **40**
- Figura 2 -** Complexos macromoleculares. À esquerda são apresentados exemplos de homocomplexos permanentes (capsídeo do porcino-virus tipo 2 formado pela proteína Orf2)<sup>8</sup> e transientes (dímero da proteína Septina 7 que pode interagir com outras proteínas da família através de ambas interfaces promíscuas).<sup>9</sup> À direita, exemplificação de heterocomplexos permanentes (poro nuclear – NPC)<sup>10</sup> e transientes (heterofilamento das Septinas 2/6/7 usualmente montado no processo de citocinese).<sup>11</sup> **41**
- Figura 3 -** Exemplos de complexos macromoleculares interagentes com DNA ou membranas. (A) Heterodímero das proteínas ativadoras do ciclo circadiano em mamíferos *Bmal1* e *Clock* interagente com o *E-box* presente no DNA.<sup>14</sup> (B) Proposta de modelo de interação do complexo macromolecular *Per-complex* com o heterodímero, responsável pela repressão da transcrição dos genes *per1-3* e *cry1-2*.<sup>16</sup> (C) Estrutura por Cryo-EM do complexo ATP sintase.<sup>15</sup> **42**
- Figura 4 -** Estruturas de complexos proteína-RNA obtidas por diferentes técnicas. (A) Complexo RNase P resolvida por cristalografia de proteínas.<sup>22</sup> (B) Estrutura da RNA polimerase 2 obtida por crio-microscopia eletrônica de transmissão.<sup>25</sup> (C) Modelo de interação da RNase P por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).<sup>23</sup> (D) Estrutura da proteínas U1A em complexo com RNA obtida por ressonância magnética nuclear (RMN).<sup>24</sup> **44**
- Figura 5 -** Síntese de aminoácidos raros. Representação dos aminoácidos N-formilmetionina (fMet) e Pirrolisina (Pyl) e um esquema de síntese de cada um deles apresentado à esquerda e à direita, respectivamente. **46**
- Figura 6 -** Comparação entre os aminoácidos Sec e Cys. (A) Selenocisteína (U, Sec). (B) Cisteína (C, Cys). **48**
- Figura 7 -** A via de biossíntese e incorporação de Sec em bactérias. Esquema representado pelas estruturas das proteínas participantes da via de biossíntese de Sec que tiveram suas estruturas resolvidas por técnicas experimentais. O tRNA<sup>Sec</sup> é aminoacilado pela enzima dimérica SerRS (verde) e posteriormente reconhecido pelo complexo homodecamérico SelA (roxo) para a conversão Ser-Sec. O composto de selênio é entregue pelo dímero SelD (ciano) que está envolvido com o processo de reciclagem de selênio juntamente com a enzima dimérica CsdB (azul). Após a conversão, o Sec-tRNA<sup>Sec</sup> é encaminhado para a cadeia polipeptídica nascente pelo fator de alongação específico (SelB, amarelo) onde é incorporado através do reconhecimento do elemento SECIS e consumo de GTP. (SerRS – PDB.ID 2DQ3, em verde; SelA – PDB.ID 3W1H, em roxo; CsdB - PDB.ID 1JF9, em azul; SelD – PDB.ID 3U0O, em ciano; SelB – 4ZU9, **53**

- em amarelo e tRNA<sup>Sec</sup> – PDB.ID 3W3S, em laranja).
- Figura 8 -** Comparação do tRNA<sup>Sec</sup> para os diferentes domínios da vida. (A-C) Representação em 2D em trevo dos tRNAs<sup>Sec</sup> de *E. coli*, *H. sapiens* e *M. kandleri*, respectivamente. (D) Sobreposição tridimensional das estruturas dos tRNAs<sup>Sec</sup> e identificação de cada estrutura. (E) Sobreposição tridimensional em superfície das estruturas dos tRNAs<sup>Sec</sup>. 54
- Figura 9 -** A via de biossíntese e incorporação de Sec em arqueias e eucariotos. Esquema representado pelas estruturas das proteínas participantes da via de biossíntese de Sec em arqueias (A) e eucariotos (B) que tiveram suas estruturas resolvidas por técnicas experimentais (SerRS – PDB.ID 2CJB/4RQE, em verde; PSTK – PDB.ID 3A4L/3AM1, em roxo; SepSecS – PDB.ID 2Z67/4ZDP, em rosa; SCLY - PDB.ID 3GZC, em azul; SPS2 – PDB.ID 3FD5, em ciano; EFSec – 4ACB/5IZL, em amarelo e tRNA<sup>Sec</sup> – PDB.ID 4ADD/3A3A, em laranja, para arqueias e eucariotos respectivamente). 57
- Figura 10 -** Estado da arte dos estudos envolvendo o homodecamêro SelA. (A) Mecanismo catalítico proposto.<sup>97</sup> (B) Primeiras imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de SelA<sup>97</sup> e (C) do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, acreditando-se na estequiometria 1SelA:5tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>95</sup> (D) Análises estatísticas multivariadas (MSA) dos conjuntos de dados de SelA e SelA.tRNA<sup>Sec</sup> evidenciando a simetria D5 e, portanto, estequiometria 1SelA:10tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>95</sup> (E) Estrutura cristalográfica à 3,5 Å de resolução de SelA e (F) à 7,5 Å de resolução para o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, comprovando a estequiometria de 1:10.<sup>93</sup> 59
- Figura 11 -** Modelo de interação do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD. O complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> inicialmente formado permite a interação de 5 dímeros de SelD, formando o complexo ternário transiente SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD. 60
- Figura 12 -** Estruturas de fatores de alongação. (A) Representação da estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* indicando seus 3 domínios de ligação canônicos de EF-Tus e apresentando o domínio adicional presente apenas em bactérias. (B) Estrutura do complexo SelB.GDPNP-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> na presença do elemento SECIS resolvida por crio-microscopia eletrônica de transmissão (PDB ID: 5LZD). (C) Estrutura cristalográfica de SelB de *M. maripaludis*, uma arqueia (PDB ID: 4ACB). (D) Estrutura cristalográfica do EF canônico, EF-Tu de *T. aquaticus* (PDB ID: 1EFT). (E) Modelo proposto para interação de SelB junto ao ribossomo 70S de procariotos e (F) EFSec ao ribossomo 80S eucariótico. 63
- Figura 13 -** Esquema 2D em forma de trevo representando as regiões de reconhecimento do tRNA<sup>Sec</sup>. (A) O tRNA<sup>Sec</sup> de bactérias apresenta o dobramento ‘8+5’ nos braços acceptor e TψC e variável longo. Os braços são reconhecidos pelas enzimas SerRS (acceptor + variável), SelA (acceptor + D-loop) e SelB (acceptor + TψC + variável), além do pareamento anticódon junto ao códon 65

UGA-Sec presente no mRNA. (B) Por sua vez, o tRNA<sup>Sec</sup> dos demais organismos apresenta dobramento '9+4' nos braços acceptor e TψC e variável não tão longo. Os braços são reconhecidos pelas enzimas SerRS (acceptor + variável), PSTK (acceptor + D-loop) além de SepSecS e EFSec (acceptor + TψC + variável), e o pareamento anticódon junto ao códon UGA-Sec presente no mRNA.

- Figura 14 -** Comparação entre as diferenças estruturais do elemento SECIS. (A) SECIS para bactérias (*E. coli*) localizado logo após o códon UGA-Sec. Delimitado pelo retângulo em verde encontra-se a região reconhecida pela proteína SelB a exatamente 11 nucleotídeos do códon UGA. (B) SECIS para arqueias (*M. jannaschii*) localizado na região 3'-UTR a aproximadamente 25 nucleotídeos do códon UGA. (C) e (D) SECIS para eucariotos superiores em que respectivamente é ilustrada as formas I e II. 67
- Figura 15 -** Modelos estruturais dos complexos ribossomais. (A) Estrutura tridimensional do ribossomo 70S de procariotos obtida por cristalografia de proteínas.<sup>27</sup> (B) Estrutura tridimensional do ribossomo 80S de eucariotos obtida por cristalografia de proteínas.<sup>27</sup> (C) Complexo ribossomo.EF-Tu.tRNA<sup>fMet</sup> evidenciando a formação de estruturas macromoleculares durante a síntese de proteínas obtida por Cryo-EM.<sup>86,120</sup> (D) Complexo ribossomo.SelB.tRNA<sup>Sdc</sup>.SECIS por Cryo-EM.<sup>72</sup> 69
- Figura 16 -** Perfis dos espectros de dicroísmo circular. (A) Espectros de amostras proteicas. Proteínas majoritariamente em α-hélice, folhas-β ou estruturas irregulares são representadas em vermelho, verde e preto, respectivamente. (B) Espectros do desenovelamento de RNA estruturado em função da temperatura monitorado por VT-CD.<sup>126-128</sup> 90
- Figura 17 -** Medidas de ITC. (A) Esquema do aparato experimental utilizado. (B) Etapas do processo de titulação isotérmica em função do tempo. 97
- Figura 18 -** Medidas de DSC. (A) Esquema do aparato experimental utilizado. (B) Exemplificação do processo de transição de estados (nativo-desnaturado ou enovelado-desenovelado) e os parâmetros determinados a partir do termograma obtido 100
- Figura 19 -** Representação do experimento de espectroscopia de anisotropia de fluorescência. (A) Esquema geral do desenho experimental com o posicionamento dos polarizadores e configuração comumente utilizada em "L". (B) Modelo esquemático da polarização da luz e consequências pela influência do tamanho das partículas em solução, semelhante ao nosso modelo experimental. 102
- Figura 20 -** Representação do experimento de ultracentrifugação analítica. (A) Cella para experimentos de velocidade de sedimentação. (B) Cella para experimentos de equilíbrio de sedimentação. (C) Esquema da dinâmica do experimento de velocidade de sedimentação para 4 tempos distintos e (D) perfil das medidas para cada tempo. (E) Princípio do experimento de equilíbrio de sedimentação onde, como o próprio nome diz, há um equilíbrio 106

das espécies em solução de modo que as partículas não sedimentem totalmente e possam se manter devido à ação da difusão

- Figura 21 -** Esquema representativo dos ensaios de HDX. (A) Modelo ilustrando a incorporação de deutério nas amidas das regiões expostas ao solvente e a visualização após a proteólise. (B) Peptídeo ilustrando os átomos que o compõe, em destaque em amarelo, os hidrogênios amídicos da cadeia principal passíveis de sofrerem a troca por deutério. (C) e (D) Gráfico evidenciando o melhor processo de incorporação quando a amostra está sujeita a pH 2,5 e baixas temperaturas, respectivamente. **109**
- Figura 22 -** Esquema representativo do experimento de FTIR. (A) Modos vibracionais das Amidas I e II, regiões de estiramento das ligações C=O e N-H presentes nas ligações peptídicas. (B) Bandas de absorção das Amidas I e II em função do número de onda da radiação incidente. O processamento a partir das bandas observadas revela características fundamentais com relação aos percentuais de estruturação secundária presentes nas amostras. **112**
- Figura 23 -** Metodologia de cristalização de macromoléculas biológicas. (A) Ilustração do processo que correlaciona a concentração de agente precipitante e a solubilidade da macromolécula em solução, ilustrando as três diferentes etapas do processo de cristalização. (B) Mecanismo ilustrativo usando método *sitting drop*, ou gota sentada, mostrando a variação do tamanho da gota e, conseqüentemente, aumentando a concentração das moléculas ali presentes. Além disso, ilustrações distinguindo os métodos de gota sentada e gota suspensa, os quais possuem os mesmos processos físico-químicos. **114**
- Figura 24 -** Esquemas representativos sobre microscopia eletrônica. (A) Representação de um microscópio eletrônico com seu sistema magneto-óptico. (B) Exemplo de modelo de imagem de transmissão. A imagem observada no anteparo não revela, em sua totalidade, o objeto que a gerou. **117**
- Figura 25 -** Comparativo entre preparos de amostras para TEM. (A) Esquema apresentando a sequência de eventos no preparo de amostras para microscopia eletrônica de transmissão utilizando *negative stain* e congelamento em gelo vítreo. (B) Comparação dos preparos de amostras evidenciando diferenças entre as duas metodologias utilizadas. (C) Comparativo entre uma partícula em meio ao sal metálico e em gelo vítreo. **118**
- Figura 26 -** Esquema de uma grade de microscopia: A grade de aproximadamente 3 mm possui cerca de 400 quadrados de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$  onde cada um possui inúmeros buracos de 1  $\mu\text{m}$  onde é formado um filme fino de solução contendo a amostra de interesse. Abaixo, o esquema de como foram realizadas as coletas de dados, onde em um único buraco são coletadas 6 diferentes imagens de 7 *frames* cada uma. As imagens coletadas nas regiões em roxo foram em baixos valores de *defocus* ( $\sim -1,5 \mu\text{m}$ ), ou seja, coleta de alta resolução. Enquanto que a região representada em verde foi coletada em alto *defocus* **122**

- (~ -3,5  $\mu\text{m}$ ), o que não leva a altas resoluções favorecendo o processamento dos dados.
- Figura 27 -** Processamento de dados de TEM (A) Esquema da sequência de eventos da coleta e processamento de experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Os passos são iterativos e apresentam uma sequência previamente definida. (B) Esquema da função transferência de contraste. No espaço de frequências (espaço de *Fourier* ou espaço recíproco) a CTF é uma função que oscila e decresce até o limite de resolução dos dados coletados. Por possuir zeros e valores negativos, se faz necessário a correção da função e flipagem das fases nos dados a serem processados. **124**
- Figura 28 -** Esquema geral da técnica de duplo-híbrido dirigido. (A) Modelo da interação da quimera DBD+isca e ativação após a interação AD+presa do gene reporter. (B) Esquema da organização gênica e de interação da isca localizada no C-terminal com o promotor. (C) Mapa do vetor pLexA-C. (D) Mapa do vetor pGAD-424. **129**
- Figura 29 -** Modelagem molecular de SelB (A) Modelo estrutural de SelB de *E. coli* obtido a partir de fragmentação da sequência e busca por modelos homólogos. (B) Esquema topológico da estrutura de SelB dividida em 4 domínios (WHDs 1-4). (C) Diagrama de *Ramachandran* do modelo construído por fragmentação evidenciando 94,76% dos resíduos em regiões favoráveis e apenas 1,52% em regiões não permitidas. (D) Estrutura de SelB de *E. coli* obtida através de modelagem por homologia utilizando a estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* (PDB.ID 4ZU9) e representada pelas estruturas secundárias e colorida por domínios. (E) Sobreposição das estruturas do modelo de SelB de *E. coli* obtidos pela modelagem por homologia (colorida por domínios) da sequência *full-length* e a Estrutura cristalográfica de *AaSelB* (branco) obtendo rmsd 0,487 Å. **138**
- Figura 30 -** Comparação estrutural entre SelBs de bactéria e arqueia e EFSec humano (A) Modelo estrutural de SelB de *E. coli* sobreposto com EF-Tu bacteriano (azul). (B) Sobreposição com SelB de arqueia (amarelo) evidenciando o posicionamento divergente das WHDs 3 e 4. (C) Sobreposição estrutural com EFSec humano (lilás) semelhante à SelB de arqueias. **140**
- Figura 31 -** Modelos estruturais dos complexos macromoleculares de SelB. (A) Modelo de interação de SelB.tRNA<sup>Sec</sup> (em preto) mostrando a importância do braço variável interagente com a WHD3. (B) Modelo do complexo ternário SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (em verde), a distância determinada do último nucleotídeo de SECIS à posição *wobble* do tRNA foi de 76 Å, ou seja, 11 nucleotídeos, como descrito na literatura.<sup>72</sup> (C) Modelo estrutural do complexo ternário na entrega do tRNA<sup>Sec</sup> ao ribossomo. SelB é representada em amarelo, o tRNA<sup>Sec</sup> em laranja e o ribossomo em cinza (30S em superfície e 50S em fita). **141**
- Figura 32 -** Etapas de purificação de SelA. (A) Dessalinização em coluna HiTrap Desalting com monitoramento em 280 e 260 nm. (B) Exclusão molecular em coluna Superdex 200 HL (16/60) com monitoramento em comprimento de onda de 280 nm. A seta **143**

indica o pico referente a SelA. (C) SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna HiTrap Desalting; 4) amostra com Nycodenz® concentrada a 2 mL; 5) amostra eluída da coluna de exclusão molecular; 6) amostra eluída concentrada (concentrador de corte de 100 kDa).

- Figura 33 -** Cromatografias de exclusão molecular de SelB utilizando coluna *Superdex 75 GL (10/300)*. (A) Cromatograma da amostra purificada por cromatografia de afinidade e submetida à SEC, após a diálise, com eluição em ~9,5 mL. (B) Cromatograma da amostra após a adição da etapa de tratamento com RNase apresentando eluição em ~10,8 mL. *Inset*: curva de calibração da coluna utilizando padrões de massa molecular conhecidos. Determinação da massa molecular de SelB em ~87 kDa, ou seja, conformação monomérica em solução **144**
- Figura 34 -** Confirmação da obtenção de SelB de *E. coli*. (A) SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) extrato proteico bruto; 3) eluído diretamente da coluna de afinidade; 4) lavagem da coluna de afinidade com 10 mM de imidazol; 5) amostra eluída da coluna de de afinidade com 100 mM de imidazol; 6) amostra após a cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 (10/300)*. (B) *Western blot* para identificação da *His-TAG* das mesmas amostras citadas acima e na mesma ordem. (C) Identificação e cobertura da sequência de SelB de *E. coli* por espectrometria de massas da amostra tripsinizada do gel de poliacrilamida 15%. **147**
- Figura 35 -** Análise de possíveis contaminações com nucleotídeos endógenos. Cromatograma da coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters) monitorando a absorvância em 253 nm utilizando os padrões i) tampão E, ii) GDP, iii) GTP e iv) GDP+GTP além das amostras SelB1 e SelB2, purificadas das cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460, respectivamente. O tempo de retenção de GDP (5,2 min) e GTP (5,9 min). **148**
- Figura 36 -** Amplificação dos genes de interesse. Resultado da amplificação do gene *selC* (A), *secis* (B) e *alaS* (C). 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) gene *selC* de *E. coli* (121 pb), *secis* (75 pb) e *alaS* (81 pb). **149**
- Figura 37 -** Espectros de VT-CD monitorando o enovelamento dos RNAs: tRNA<sup>Sec</sup> (A), SECIS (B) e tRNA<sup>Ala</sup> (C) e representação bidimensional da estrutura em trevo para os tRNAs e de SECIS. **150**
- Figura 38 -** Ensaio de atividade *in vitro* por HPLC. Cromatograma da coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters) monitorando a absorvância em 253 nm utilizando os padrões i) tampão E, ii) GDP, iii) GTP e iv) GDP+GTP além das amostras dos complexos macromoleculares estudados. O tempo de retenção de GDP (4,4 min) e GTP (5,4 min). **152**
- Figura 39 -** Medidas espectroscópicas para comparação das amostras de SelB purificadas de ambas as cepas de expressão. (A) Espectros de CD **154**

das amostras SelB – *E. coli* BL21 — SelB – *E. coli* WL81460 — e VT-CD resultando em  $T_m$ s de  $(48,2 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$  e  $(48,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , respectivamente. Espectros normalizados indicando a semelhança entre as amostras. (B) Espectros de emissão dos triptofanos de SelB (excitação 295 nm) também comparando as cepas e determinação do ponto de máximo analisando a derivada da curva obtida, o que mostrou a conservação em 333 nm, indício de internalização dos resíduos aromáticos.

- Figura 40 -** Medidas de VT-CD. Os complexos de SelB.GTP (A) e SelB.GDP (B) analisados em condições saturantes dos nucleotídeos resultaram em  $T_m$ s de  $(50,3 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  e  $(49,1 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ , respectivamente. A  $T_m$  de SelB<sub>apo</sub> sob mesmas condições experimentais  $(48,2 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$ . 157
- Figura 41 -** Medidas de ITC na interação com os nucleotídeos de guanina. Os complexos de SelB.GTP (A) e SelB.GDP (B) analisados por ITC resultaram em  $K_D^{\text{GTP}} = (124 \pm 8) \text{ nM}$  (ou,  $0,124 \pm 0,008 \mu\text{M}$ ) e não determinado para  $K_D^{\text{GDP}}$ . 158
- Figura 42 -** Medidas de IFS na interação com o tRNA<sup>Sec</sup>. (A) Representação do modelo estrutural de SelB representado em ribbon com os resíduos de triptofanos destacados em roxo. As setas indicam as regiões preditas para interação com GTP (azul), tRNA<sup>Sec</sup> (laranja) e o elemento SECIS (vermelho). (B) Bandas de emissão de SelB à 50 nM e posterior adição de GTP [100  $\mu\text{M}$ ] com incremento da concentração de tRNA<sup>Sec</sup> utilizando excitação em 295 nm e monitoramento entre 303 – 510 nm com filtro de 295 nm. A linha tracejada indica o máximo de emissão observado em 333 nm. (C) Curva de máximo de intensidade de emissão em 333 nm normalizado relacionado à concentração de tRNA<sup>Sec</sup> titulado, evidenciando o perfil de interação específica sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com o ajuste de Hill mostrado na equação 12. 160
- Figura 43 -** Medidas de FAS. (A) Curva experimental normalizada da interação de tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu\text{M}$ ] e incremento da concentração de SelB utilizando excitação em 480 nm com filtro de 515 nm. (B) Analogamente ao item (A), curva normalizada da interação de SECIS (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu\text{M}$ ] e incremento da concentração de SelB e (C) Curva utilizada como controle negativo normalizada da interação com o tRNA<sup>Ala</sup> (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu\text{M}$ ] e incremento da concentração de SelB. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de Hill (curva em vermelho). 162
- Figura 44 -** Medidas de FAS para determinação da formação do complexo quaternário. (A) Curva experimental normalizada da interação de tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu\text{M}$ ] e incremento da 164

concentração do complexo SelB.GTP.SECIS. (B) Curva normalizada da interação de SECIS (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho).

- Figura 45 -** Medidas de FAS para determinação da formação de complexos na presença de SelA. Curva experimental normalizada da interação de SelA.tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração de SelB. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho). 165
- Figura 46 -** Certificação de qualidade do ribossomo (NEB). (A) SDS-PAGE 10% enviado como controle pela empresa (NEB) contendo marcador de massa molecular e uma amostra de ribossomo do mesmo lote adquirido. (B) SDS-PAGE 10% da amostra de ribossomo checado como controle de qualidade da amostra adquirida comparado ao marcador de massa molecular e o ribossomo. (C) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão em preparo por contraste negativo do ribossomo preparado em tampão E, confirmação da morfologia, monodispersividade e tamanho das partículas esperado para o complexo ribossomal de *E. coli* (25 nm). 166
- Figura 47 -** Medidas de FAS da interação com o ribossomo. (A) Curva experimental normalizada da interação de SelB.tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração de ribossomo. (B) Curva normalizada da interação de SelB.SECIS (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração de ribossomo e (C) Curva experimental normalizada da interação de SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração de ribossomo. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho). 168
- Figura 48 -** Proposta de modelo sequencial de interação para a incorporação de Sec em bactérias. SelB ativada pela presença de um GTP em seu domínio N-terminal reconhece os braços acceptor, T $\Psi$ C e variável do tRNA<sup>Sec</sup> em complexo com SelA. Uma vez retirado, o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> reconhece a porção apical do elemento SECIS através do domínio C-terminal de SelB e, posteriormente, realiza a entrega do Sec.tRNA<sup>Sec</sup> junto ao sítio A do ribossomo para a incorporação de Sec na selenoproteína 170

- nascente.
- Figura 49 -** Análises de velocidade de sedimentação. Picos correspondentes à SelB e complexos para o experimento de velocidade de sedimentação a 25 °C sob rotação de 40.000 rpm. **171**
- Figura 50 -** Análises de sedimentação em equilíbrio. Curvas experimentais das amostras SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Ala</sup> para o experimento utilizando três razões estequiométricas (0,5:1; 1:1 e 2:1 de SelB:tRNAs) nas velocidades 3.000, 8.000, 12.000 e 15.000 rpm. **173**
- Figura 51 -** Medidas de ITC por injeção única e determinação da variação de entalpia dos complexos. Os complexos de SelB.GTP (A), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (B) e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS analisados por ITC resultaram nos valores termodinâmicos expressos na Tabela 8. **175**
- Figura 52 -** Ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa em condições nativas. Foram utilizadas as amostras SelB, tRNA<sup>Sec\*</sup> e SECIS como controles à 1 μM e titulações de concentrações em razões estequiométricas (0,5:1; 1:1 e 2:1). **177**
- Figura 53 -** Termogramas das análises de DSC dos complexos formados. **178**
- Figura 54 -** Mapeamento da superfície acessível ao solvente de SelB através de HDX. (A) *Heat map* da estrutura primária de SelB para os tempos 5 min e 30 min de incorporação de deutério. Legenda do percentual de incorporação: 0-10% - azul escuro, 10-12,5% - azul, 12,5-20% - azul claro, 20-25% - ciano, 25-30% - verde escuro, 30-45% - verde claro, 45-55% amarelo, 55-70% - laranja, 70-80% marrom e 80-100% vermelho. *Heat map* da taxa de incorporação de deutério, para o tempo de 5 min (B) e 30 min (C), no modelo estrutural de SelB obtido por modelagem por homologia representado em *cartoon* e superfície. **181**
- Figura 55 -** Mapeamento da superfície acessível ao solvente dos complexos de SelB através de HDX. (A) *Heat map* da estrutura primária de SelB para o tempo de 30 min de incorporação de deutério para os complexos SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Legenda do percentual de incorporação: 0-10% - azul escuro, 10-12,5% - azul, 12,5-20% - azul claro, 20-25% - ciano, 25-30% - verde escuro, 30-45% - verde claro, 45-55% amarelo, 55-70% - laranja, 70-80% marrom e 80-100% vermelho. *Heat map* da taxa de incorporação de deutério, para o complexo ternário (B) e quaternário (C), no modelo estrutural de SelB obtido por modelagem por homologia representado em *cartoon* e superfície. **183**
- Figura 56 -** Quantificação das estruturas secundárias de SelB e variação na presença dos RNAs (A) Análise da banda da amida-I de SelB.GTP com ajuste da curva de deconvolução pelas 7 gaussianas ( $\beta_{\perp}$  - 1610 cm<sup>-1</sup>,  $\beta_{\parallel}$  - 1623 cm<sup>-1</sup>,  $\beta_{\perp}$  - 1633 cm<sup>-1</sup>, randômicas - 1644 cm<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -hélices - 1654 cm<sup>-1</sup>, volta - 1674 cm<sup>-1</sup>,  $\beta_{\perp}$  - 1690 cm<sup>-1</sup>). (B) Espectro de diferença SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> - SelB.GTP. (C) Espectro de diferença SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS - SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. **185**
- Figura 57 -** Análise 2D dos espectros de FTIR. (A) Análise do espectro sincrôno e (B) do espectro assíncrono, indicando a formação **187**

- preferencial de estruturas secundárias em  $\alpha$ -hélices.
- Figura 58 -** Resultados das curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. (A) Curvas de espalhamento experimental das amostras SelB.GTP (●), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (▲) e SelB.GTPtRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (■). (B) Gráfico representando o início das curvas de espalhamento utilizados para a determinação do Raio de *Guinier* das amostras SelB.GTP (●), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (▲) e SelB.GTPtRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (■), resultando nos raios 4,37; 4,82 e 5,56 nm, respectivamente. 188
- Figura 59 -** Curvas de distribuição de probabilidade  $p(r)$  obtida pela Transformada de *Fourier* das curvas de espalhamento de raios-X. São mostradas as  $p(r)$  das amostras SelB.GTP (□), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (○) e SelB.GTPtRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (▲). A partir desses dados foi possível determinar o diâmetro máximo das partículas em solução como sendo: 14,65; 15,0 e 18,77 nm, respectivamente. 189
- Figura 60 -** Modelos à baixa resolução dos envelopes moleculares dos complexos SelB.GTP, SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Os envelopes moleculares apresentados em esferas (cinza) foram ajustados com as estruturas dos complexos gerados por modelagem molecular (seções 4.1.1 e 4.1.2) em que SelB foi representada em *cartoon* e colorida em *rainbow*. 190
- Figura 61 -** Gráfico de *Kratky* dos complexos analisados revelando a flexibilidade dessas moléculas em solução. 192
- Figura 62 -** Resultados dos experimentos de SAXS para o tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*. (A) Curvas de espalhamento experimental de tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Curvas de distribuição de probabilidade  $p(r)$  obtida pela Transformada de *Fourier* das curvas de espalhamento de raios-X, resultando no  $D_{\text{máx}}$  9,5 nm. (C) Modelos à baixa resolução dos envelopes moleculares do tRNA<sup>Sec</sup>. O envelope molecular apresentado em esferas (cinza) foi ajustado com a estrutura cristalográfica do tRNA<sup>Sec</sup> humano (PDB.ID 3A3A) representado em *cartoon*. 193
- Figura 63 -** Ensaios de cristalização de SelB e seus complexos. (A) Cristal obtido para a amostra SelB.GTP com o kit comercial CS (Hampton Research) condição A04. (B) Cristal do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS kit SG1 (Molecular Dimensions) condição E03. (C) Cristal do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS kit Morpheus (Molecular Dimensions) condição A03. (D) Cristal obtido para a amostra SelB.GTP com o kit comercial JCSG+ HT-96 (Molecular Dimensions) condição F01. Todos esses cristais foram obtidos no sistema automatizado *HoneyBee* 963 (DigiLab) com micro gotas de 0,2  $\mu$ L de amostra e mesmo volume de solução do poço em placas de 96 ensaios simultâneos no método de *sitting drop* e as imagens dos cristais foram coletadas utilizando um estereo-microscópio Discovery.V20 acoplado a uma câmera AxioCam MRc-5 (Zeiss) e software integrado. 195
- Figura 64 -** Visualização dos complexos macromoleculares por TEM. (A) 197

Imagem de ribossomo de *E. coli* corretamente associado, monodisperso e com dimensões esperadas (~ 25 nm). (B) Complexo ribossomo.SelB.GTP. (C) Complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. (D) Complexo ribossomo.SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Todas as imagens foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Tecnai G<sup>2</sup>F20 HRTEM *single-tilt* (Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE/DeMa - UFSCar) operando em 200 kV em uma camera TIA 1Mp (FEI) de alta resolução utilizando 1 segundo de exposição e -5 µm de *defocus*.

**Figura 65 -** Processamento de dados do conjunto controle do complexo ribossomal. (A) Imagens de ribossomo de *E. coli*. (B) Partículas selecionadas para a reconstrução tridimensional pelo processamento utilizando o pacote IMAGIC-4D.<sup>151</sup> As linhas superiores de cada bloco de partículas representa a partícula isolada e logo abaixo sua respectiva reprojeção obtida do modelo tridimensional reconstruído. As reprojeções foram utilizadas como referências para a melhoria do alinhamento roto-translacional das partículas e, conseqüentemente, melhoria no modelo tridimensional reconstruído.

198

**Figura 66 -** Reconstrução tridimensional do complexo ribossomal de *E. coli*. Através do processamento de dados e atribuição angular às 120 imagens selecionadas foi possível obter um modelo estrutural, representado em superfície azul, à 40 Å de resolução do ribossomo de *E. coli* que ajustou com a estrutura cristalográfica recentemente melhorada (PDB. ID 5IT8), representada em fitas e hélices em preto.

199

**Figura 67 -** Processamento de dados do conjunto controle do complexo ribossomo.SelB.GTP. (A) Imagens coletadas do complexo ribossomo.SelB.GTP. (B) Partículas selecionadas para a reconstrução tridimensional pelo processamento utilizando o pacote IMAGIC-4D.<sup>151</sup> As linhas superiores de cada bloco de partículas representa a partícula isolada e logo abaixo sua respectiva reprojeção obtida do modelo tridimensional reconstruído.

201

**Figura 68 -** Visualização dos complexos macromoleculares ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS por TEM. (A) Imagens coletadas do complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Imagens coletadas do complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.

202

**Figura 69 -** Determinação da CTF. Função de transferência de contraste (CTF) experimental (diagonal superior esquerda) e calculada (diagonal inferior direita) das primeiras 54 imagens adquiridas desse conjunto de dados. Isso permitiu a identificação dos valores de defocagem para aquelas que possuem um bom ajuste entre ambas as curvas, como, por exemplo, as imagens 2; 6; 35 e 53. Contudo, as imagens que possuem um ajuste incorreto entre ambas as curvas (28; 31 ou 34, por exemplo) foram descartadas do processamento pela indefinição dos valores de *defocus* utilizado.

203

- Figura 70 -** Visualização das imagens de SelA.tRNA<sup>Sec</sup> em preparo criogênico, evidenciado a baixa relação sinal/ruído, o que torna praticamente impossível a determinação precisa da posição das partículas nas imagens. 204
- Figura 71 -** Modelo estrutural de SelA. Modelo obtido por reconstrução tridimensional de um conjunto de dados heterogêneo resultando em um modelo à 15 Å de resolução com simetria D5. Em destaque na caixa em preto, as 48 referências geradas randomicamente utilizadas para o processo de *particle picking*. 205
- Figura 72 -** Análise dos dados por MSA. (A) Auto-imagens (*eigenimages*) obtidas evidenciando a simetria D5 das partículas do complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Algumas *classsums* (*class averages*) calculadas utilizando uma média de 20 membros/classe. (C) 10 *classsums* selecionadas para os primeiros ciclos de reconstrução tridimensional. (D) Reprojeções do modelo tridimensional obtido após alguns ciclos MRA-MSA. 207
- Figura 73 -** Reconstrução tridimensional do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*. Através do processamento de dados e atribuição angular foi possível obter um modelo estrutural, representado em densidade vermelha, à 18 Å de resolução e comparada com a estrutura de SelA previamente utilizada para o *particle picking*, representada em superfície amarela. 208
- Figura 74 -** Reconstrução tridimensional do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli* após etapas de alinhamento. O complexo é representado pela densidade vermelha e SelA é representada em superfície amarela. 209
- Figura 75 -** Medidas de FAS dos complexos de SelA. (A) Curva experimental normalizada da interação de tRNA<sup>Sec</sup> à 500 nM (490 nM + 10 nM marcado com fluoresceína) em complexo com 500 nM de SelA em concentrações saturantes de ATP [100 µM] e incremento da concentração de SelD utilizando excitação em 492 nm com filtro de 515 nm. (B) Analogamente ao item (A), curva normalizada da interação do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> em concentrações saturantes de Se<sup>2+</sup> [100 µM] e incremento da concentração de SelD e (C) concentrações saturantes de ATP [100 µM] + Se<sup>2+</sup> [100 µM]. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho). 211
- Figura 76 -** Correção da câmera *a posteriori*. Utilizando normalização através dos valores da média de densidade (A) e de *sigma* (B), foi possível corrigir as imperfeições da câmera. (C) A soma total da média de densidade mostra pontos que são decorrentes de pixels danificados com o passar do tempo. (D) A soma total de *sigma* das imagens revela algumas faixas com variação nos valores esperados. Em vermelho, os destaques para defeitos encontrados nas imagens. 212
- Figura 77 -** Resultado do alinhamento dos *frames* no espaço real. (A) Imagem (*movies*, ou seja, somatória dos 7 *frames*) não alinhada. (B) Imagem da mesma área de exposição, no entanto, após o 213

- alinhamento dos *frames*.
- Figura 78 -** Comparativo de bons e maus ajustes da CTF. Acima, as imagens que geraram as CTFs apresentadas, abaixo, antes (à esquerda) e após (à direita) ao alinhamento dos *frames* e ajuste das curvas de CTF. É possível observar o alinhamento no espaço recíproco (abaixo), ficando evidente que o alinhamento dos *frames* (direita) incrementa a resolução do conjunto de dados, fato esse observado pelo grande número de *Thon Rings* e melhor ajuste com a CTF teórica. 214
- Figura 79 -** Seleção das referências para o primeiro *particle picking* automatizado. (A) Exemplo de *movie* com alto contraste utilizado na primeira parte do processamento de dados. A caixa branca indica uma partícula em orientação “*top-view*” e a caixa preta indica uma partícula em orientação “*side-view*”. (B) 8 referências utilizadas para o *particle picking* através de CCF. Por fim, o histograma dos valores de *defocus*, mostrando que existem duas populações de *defocus* bem destacadas, em torno de 1,5  $\mu\text{m}$  (346 imagens) e 3,5  $\mu\text{m}$  (55 imagens). 215
- Figura 80 -** Análise dos dados por MSA do complexo ternário. (A) Auto-imagens (*eigenimages*) obtidas evidenciando a simetria D5 das partículas do complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD. (B) Algumas *classsums* (*class averages*) calculadas utilizando uma média de 50 membros/classe. (C) 25 *classsums* selecionadas para os primeiros ciclos de reconstrução tridimensional. 216
- Figura 81 -** Reconstrução tridimensional do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD de *E. coli* após etapas de limpeza do conjunto de dados. O complexo é representado pela densidade azul, SelA é representada em superfície amarela e o complexo binário em densidade vermelha. 217
- Figura 82 -** Reconstrução tridimensional do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD de *E. coli* após etapas de alinhamentos das partículas. O complexo é representado pela densidade azul, SelA é representada em superfície amarela e o complexo binário em densidade vermelha. 219
- Figura 83 -** Construção do truncamento  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli*. (A) Modelo esquemático do truncamento no domínio N-terminal da enzima SelA de *Escherichia coli*. Os oligonucleotídeos estão representados em vermelho. (B) Resultado da amplificação do gene  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli* em gel de agarose 1% 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) gene  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli* (1492 pb), 221
- Figura 84 -** Resultados da conformação oligomérica e atividade da construção  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli*. (A) SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna *HiTrap Desalting*; 4) sobrenadante da amostra precipitada com sulfato de amônio; 5) amostra com Nycodenz® concentrada a 2 mL; 6) amostra eluída do concentrador de corte de 100 kDa; 7) amostra eluída concentrada após a cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 16/600*. (B) 222

Eletroforese nativa em gel 8-25: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra purificada após a cromatografia de exclusão molecular. (C) Controle negativo to teste do benzil-viologênio com a cepa *E. coli* JS1 transformada com pET29(+) fechado. (D) Ensaio de complementação funcional de  $\Delta 1-28$  *selA*-pET29(+). (E) Controle positivo com a cepa *E. coli* JS1 transformada com *selA*-pET29a(+).

**Figura 85 -** Ensaio de autoativação do sistema de DH em *S. cerevisiae* dos genes clonados no vetor isca pLexA-C.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Condições da PCR para a amplificação dos genes de interesse.	<b>88</b>
<b>Tabela 2 -</b>	Condições da reação de transcrição <i>in vitro</i> .	<b>89</b>
<b>Tabela 3 -</b>	Parâmetros da coleta de dados do complexo ternário SelA.tRNA <sup>Sec</sup> .SelD.	<b>121</b>
<b>Tabela 4 -</b>	Comparação das cepas de expressão e quantificação do RNA presente na amostra.	<b>145</b>
<b>Tabela 5 -</b>	Análise do percentual de estruturas secundárias e da intensidade de emissão dos triptofanos de SelB.	<b>155</b>
<b>Tabela 6 -</b>	Valores da interação de SelB com os nucleotídeos de guanina.	<b>158</b>
<b>Tabela 7 -</b>	Constantes de dissociação e parâmetros termodinâmicos dos complexos macromoleculares dependentes de SelB.	<b>169</b>
<b>Tabela 8 -</b>	Resultados de AUC. Valores de coeficiente de sedimentação em função da concentração, massa molecular e raio de <i>Stokes</i> para as soluções das Equações de <i>Lamm</i> .	<b>172</b>
<b>Tabela 9 -</b>	Valores de constantes de dissociação para formação de complexos.	<b>174</b>
<b>Tabela 10 -</b>	Parâmetros termodinâmicos dos complexos de SelB.	<b>176</b>
<b>Tabela 11 -</b>	Parâmetros termodinâmicos dos complexos de SelB por DSC.	<b>179</b>
<b>Tabela 12 -</b>	Percentual de estruturas secundárias para cada complexo macromolecular analisado.	<b>186</b>
<b>Tabela 13 -</b>	Dados obtidos pelas análises de SAXS e determinação de parâmetros hidrodinâmicos..	<b>191</b>
<b>Tabela 14 -</b>	Condições favoráveis de cristalização de SelB.	<b>194</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>3'-UTR</i>	Região não codificante na extremidade 3'-OH do mRNA	<i>FDH</i>	fluorescência Formato desidrogenase H
Å	Ângstrom	<i>FT</i>	Transformada de <i>Fourier</i>
<i>ACN</i>	Acetonitrila	<i>FTIR</i>	Espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
<i>AMP</i>	Adenosina Monofosfato	<i>GTP</i>	Guanosina trifosfato
<i>ADP</i>	Adenosina Difosfato	<i>GDP</i>	Guanosina difosfato
<i>aaRS</i>	Aminoacil-tRNA sintetase	<i>HDX</i>	Troca hidrogênio-deutério acoplado à espectrometria de massas
<i>ATP</i>	Adenosina Trifosfato	<i>HPLC</i>	Cromatografia Líquida de Alta <i>performance</i>
<i>AUC</i>	Ultracentrifugação analítica	<i>IFS</i>	Espectroscopia de fluorescência intrínseca
<i>BLAST</i>	<i>Basic local alignment search tool</i>	<i>IPTG</i>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
<i>CCF</i>	Função de correção cruzada	<i>ITC</i>	Calorimetria de titulação isotérmica
<i>CD</i>	Dicroísmo circular	<i>LB</i>	Luria broth
<i>CsdB</i>	Selenocisteína Liase	<i>Lys</i>	Lisina
<i>CTP</i>	Citidina Trifosfato	<i>MS</i>	Espectrometria de Massas
<i>CTF</i>	Função de transferência de contraste	<i>MSA</i>	Análise estatística multivariada
<i>C-terminal</i>	Porção carboxi terminal da sequência polipeptídica	<i>Mp</i>	Mega pixel
<i>Cryo-EM</i>	Crio-microscopia eletrônica de transmissão	<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>Cys</i>	Cisteína	<i>NeCEN</i>	<i>Netherland Centre of Electron Nanoscopy</i>
<i>Da</i>	Dalton	<i>NS-EM</i>	Microscopia eletrônica de transmissão em contraste negativo
<i>DH</i>	Interação <i>in vivo</i> por duplo-híbrido dirigido	<i>N-terminal</i>	Porção amino terminal da sequência polipeptídica
<i>dNTP</i>	Desoxirribonucleotídeos fosfatados	<i>DTT</i>	Ditiotreitol
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico	<i>mRNA</i>	RNA mensageiro
<i>DO<sub>600nm</sub></i>	Densidade óptica (600 nm)	<i>Met</i>	Metionina
<i>DSC</i>	Calorimetria de varredura diferencial	<i>min</i>	minutos
<i>EDTA</i>	Ácido Tilenodiamino Tetra-Acético	<i>m/v</i>	Razão massa por volume
<i>EF</i>	Fator de Elongação	<i>NPC</i>	Complexo do poro
<i>EFSec</i>	Fator de alongação específico para incorporação de Sec		
<i>FAS</i>	Espectroscopia de anisotropia de		

	nuclear	<i>tRNA<sup>Sec</sup></i>	tRNA de Inserção de Selenocisteínas
<i>Orf</i>	Fase aberta de leitura	<i>VT</i>	Variação térmica
<i>OMS</i>	Organização mundial de saúde	<i>UTP</i>	Uridina trifosfato
<i>PBST</i>	Tampão fosfato-salino com Tween-20	<i>WB</i>	<i>Western blot</i>
<i>PCA</i>	Análises de componentes principais	<i>WHDs</i>	<i>winged-helix domain</i>
<i>PDB</i>	<i>Protein Data Bank</i>		
<i>PLP</i>	Piridoxal 5'-fosfato		
<i>PMSF</i>	Fluoreto de fenilmetanossulfonilo		
<i>PPi</i>	Pirofosfato inorgânico		
<i>Pyl</i>	Pirrolisina		
<i>Qubit</i>	Espectrofotômetro portátil (Thermo Fisher)		
<i>RBPs</i>	<i>RNA binding proteins</i>		
<i>RMN</i>	Ressonância magnética nuclear		
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico		
<i>rpm</i>	Rotações por minuto		
<i>SAXS</i>	Espalhamento de raios-X a baixo ângulo		
<i>SBP2</i>	<i>SECIS binding protein</i>		
<i>SDS-PAGE</i>	Eletroforese em gel de dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida		
<i>SeBP</i>	<i>Selenium-binding protein</i>		
<i>Sec</i>	Selenocisteína		
<i>SEC</i>	Comatografia por Exclusão Molecular		
<i>SECIS</i>	Sequência Específica de Incorporação de Selenocisteínas		
<i>SCLY</i>	Selenocisteína liase		
<i>SelA</i>	Selenocisteína sintase		
<i>SelB</i>	Fator de alongação específico para incorporação de Sec tRNA <sup>Sec</sup>		
<i>SelC</i>			
<i>SelD, SPS</i>	Selenofosfato sintetase		
<i>Ser</i>	Serina		
<i>SerRS</i>	Seril-tRNA Sintetase		
<i>Taq DNA polimerase</i>	DNA polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>		
<i>tRNA</i>	RNA de transferência		
<i>TEM</i>	Microscopia eletrônica de transmissão		
<i>T<sub>m</sub></i>	Temperatura de <i>melting</i>		

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>37</b>
1.1 Complexos macromoleculares	39
1.1.1 Complexos proteínas-RNAs	42
1.2 Biossíntese de aminoácidos raros	44
1.2.1 O selênio e sua importância	46
1.2.2 Selenocisteína e selenoproteínas	47
1.3 A via de biossíntese e incorporação de selenocisteína	48
1.3.1 A biossíntese de Sec em bactérias	49
1.3.2 A biossíntese de Sec em arqueias e eucariotos	53
1.4 A enzima selenocisteína sintase (SelA) e suas interações transientes	58
1.5 O fator de alongação específico para incorporação de Sec em bactérias, SelB	61
1.6 Os RNAs específicos para o reconhecimento da via de incorporação de Sec e o ribossomo	64
1.6.1 tRNA <sup>Sec</sup>	64
1.6.2 Elemento SECIS	65
1.6.3 O ribossomo	67
<b>Capítulo 2 – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS</b>	<b>71</b>
2.1 Objetivos gerais	73
2.1.1 Determinação de novo protocolo de obtenção do fator de alongação específico para incorporação de Sec (SelB) bem como a determinação da presença de moléculas endógenas	73
2.1.2 Caracterização das interações dos complexos moleculares formados nas etapas finais da via de incorporação de Sec em <i>E. coli</i>	73
2.1.3 Obtenção de modelos estruturais dos complexos macromoleculares responsáveis pela etapa de conversão Ser-Sec e entrega do tRNA <sup>Sec</sup>	74
2.1.4 Realização de análises <i>in vivo</i> para a determinação da importância do domínio N-terminal de SelA e para as interações dos complexos da via de incorporação de Sec	74
2.2 Objetivos específicos	74
<b>Capítulo 3 – TÉCNICAS E MÉTODOS UTILIZADOS</b>	<b>77</b>
3.1 Análises <i>in silico</i> : construção de um modelo estrutural e compreensão dos complexos formados	79
3.1.1 Modelo estrutural de SelB de <i>E. coli</i>	79
3.1.2 <i>Docking</i> para formação dos modelos dos complexos macromoleculares	80
3.2 Expressão e purificação das amostras proteicas de interesse	81
3.2.1 Homodecâmero SelA	82
3.2.2 O fator de alongação específico, SelB, estabelecimento de um novo protocolo	83
3.2.2.1 Confirmação da amostra de interesse por espectrometria de massas	85
3.2.2.2 Confirmação da amostra de interesse por <i>western blot</i>	85
3.3 Obtenção dos RNAs: tRNA <sup>Sec</sup> e elemento SECIS	86

3.3.1	Amplificação dos genes <i>selc</i> , <i>secis</i> e <i>alaS</i>	86
3.3.2	Transcrição <i>in vitro</i> e confirmação do enovelamento por variação térmica monitorado por dicroísmo circular (VT-CD)	88
3.3.3	Marcação com fluoróforo específico	91
3.4	Determinação de contaminantes endógenos em SelB	91
3.4.1	Detecção de RNAs endógenos através de método fluorimétrico	92
3.4.2	Amostras GTP-free (HPLC)	92
3.4.3	Ensaio de atividade <i>in vitro</i> por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	93
3.5	Comparação entre as cepas de expressão utilizadas	94
3.5.1	Dicroísmo circular (CD)	94
3.5.2	Fluorescência intrínseca (IFS)	95
3.6	Análises da formação dos complexos	96
3.6.1	Interação com nucleotídeos	96
3.6.1.1	Variação térmica monitorada por dicroísmo circular (VT-CD)	96
3.6.1.2	Interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	97
3.6.1.3	Calorimetria de varredura diferencial (DSC)	99
3.6.2	Interação com RNAs e parceiros da via de biossíntese de Sec	100
3.6.2.1	Supressão da emissão dos triptofanos (IFS)	100
3.6.2.2	Espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)	101
3.6.2.3	Ultracentrifugação analítica (AUC)	104
3.6.2.4	Determinação da entalpia de interação por injeção única na calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	107
3.6.2.5	Análise de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa em condições nativas	107
3.7	Análise da estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial (DSC) dos complexos envolvendo SelB	108
3.8	Mapeamento da superfície de interação de SelB por troca hidrogênio-deutério	108
3.9	Mudanças conformacionais de SelB medidas por espectroscopia de infra-vermelho	110
3.10	Análises estruturais dos complexos	112
3.10.1	Modelos a baixa resolução de SelB e seus complexos	112
3.10.2	Tentativas de cristalização	114
3.10.3	Estudos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	115
3.10.3.1	Complexos de interação com ribossomo preparados por contraste negativo (NS-EM)	118
3.10.3.2	Complexos transientes preparados em gelo vítreo (Cryo-EM)	120
3.11	Análises de interação <i>in vivo</i>	127
3.11.1	Construção de truncamentos de <i>selA</i> – amplificação e clonagem	127
3.11.2	Ensaio de complementação funcional e estado conformacional dos truncamentos de SelA	127
3.11.3	Ensaio de interação das proteínas da via de incorporação de Sec em <i>E. coli</i> por meio de análises de Duplo-Híbrido dirigido em <i>S. cerevisiae</i>	128
<b>Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>		<b>135</b>
4.1	Análises <i>in silico</i> , a estrutura de SelB e seus domínios de	137

	interação	
4.1.1	Modelos estruturais de SelB de <i>E. coli</i>	137
4.1.2	Modelos dos complexos macromoleculares	139
4.2	Expressão e purificação das amostras proteicas de interesse	142
4.2.1	Homodecâmero SelA	142
4.2.2	O fator de alongação específico SelB. Determinação de um novo protocolo de purificação. Presença de RNAs endógenos copurificados e amostras GTP/GDP <sub>free</sub>	143
4.3	Obtenção dos RNAs: tRNA <sup>Sec</sup> , elemento SECIS e tRNA <sup>Ala</sup> . Amplificação dos genes <i>selc</i> , <i>secis</i> e <i>alaS</i> e confirmação do enovelamento dos transcritos por dicroísmo circular	149
4.3.1	Ensaio de atividade GTPásica <i>in vitro</i>	151
4.4	Comparação entre as cepas de expressão utilizadas para obtenção de SelB	152
4.4.1	Perfil de enovelamento e temperatura de <i>melting</i> das amostras	153
4.4.2	Posicionamento dos triptofanos de SelB	154
4.5	Análises da formação dos complexos	156
4.5.1	Interação com nucleotídeos	156
4.5.1.1	Formação dos complexos analisando a variação das T <sub>m</sub> s	156
4.5.1.2	Medidas de interações com nucleotídeos por técnica calorimétrica	157
4.5.2	Interação com RNAs e parceiros da via de biossíntese de Sec	159
4.5.2.1	Supressão da emissão dos triptofanos (IFS)	159
4.5.2.2	Formação dos complexos macromoleculares: experimentos de espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)	161
4.5.2.3	Confirmação dos complexos formados por ultracentrifugação analítica	171
4.5.2.4	Determinação da entalpia de interação por injeção única na calorimetria de titulação isotérmica (ITC)	174
4.5.2.5	Análise de mobilidade eletroforética	176
4.6	Análise da estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial dos complexos envolvendo SelB	178
4.7	Mapeamento da superfície de interação de SelB com os RNAs específicos	180
4.8	Mudanças conformacionais de SelB na interação com os RNAs	184
4.9	Análises estruturais dos complexos	187
4.9.1	Modelos a baixa resolução de SelB e seus complexos	188
4.9.2	Tentativas de cristalização	193
4.9.3	Estudos por microscopia eletrônica de transmissão	195
4.9.3.1	Complexos de interação com ribossomo	196
4.9.3.2	Complexos transientes preparados em gelo vítreo (Cryo-EM): SelA.tRNA <sup>Sec</sup> e SelA.tRNA <sup>Sec</sup> .SelD	202
4.9.3.2.1	Correções da câmera de detecção direta	212
4.9.3.2.2	<i>Particle picking</i> , processamento de dados e primeiro modelo estrutural	214
4.9.3.2.3	Processo iterativo de melhoria dos modelos estruturais	218
4.10	Análises das interações <i>in vivo</i>	220
4.10.1	Construção de truncamentos de <i>selA</i> – amplificação e clonagem. Ensaio de complementação funcional e estado	220

4.10.2	oligomérico Ensaio de interação das proteínas da via de incorporação de Sec de <i>E. coli</i> por meio de análises de Duplo-Híbrido dirigido em <i>S. cerevisiae</i>	223
	<b>Capítulo 5 – CONCLUSÕES</b>	<b>225</b>
	<b>Capítulo 6 – PERSPECTIVAS</b>	<b>231</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>235</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>249</b>
	Anexo A – Artigos publicados durante o doutorado	251
	Anexo B – Artigos submetidos	253
	Anexo C – Artigos em preparação e prêmios	255

*Capítulo I*  
*INTRODUÇÃO*

*"A lógica pode levar de um ponto A a um ponto B.  
A imaginação pode levar a qualquer lugar."*

**Albert Einstein**

14 de Março de 1879 – 18 de Abril de 1955

Físico



Neste capítulo serão apresentados os principais tópicos sobre complexos proteicos e sua importância em maquinarias moleculares de interações proteína-proteína e proteína-ácidos nucleicos. Posteriormente, será descrita a maquinaria de incorporação e biossíntese do vigésimo primeiro aminoácido - a selenocisteína - em procariotos e uma breve comparação com essa via bioquímica presente em arqueias e eucariotos. A necessidade de interações específicas entre proteínas para o correto reconhecimento molecular, focos desse trabalho, serão apresentados ao longo deste capítulo.

## 1.1 Complexos macromoleculares

Diferentes processos celulares requerem uma complexa sequência de eventos para que ocorram de maneira específica e regulada ao longo de vias bioquímicas os quais participam. Mecanismos como conversão energética, comunicação intracelular, tradução do código genético ou mesmo regulação do ciclo circadiano são eventos mediados por interações entre macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos) presentes no ambiente celular.<sup>1</sup> Recentemente, inúmeros estudos mostraram que essas funções biológicas são orientadas por complexos de maquinarias macromoleculares interligados e interagentes<sup>2</sup> sugerindo que tais processos não são eventos isolados, o que leva a ampliação do nosso conhecimento sobre as macromoléculas para a compreensão do complexo sistema de interação entre essas: o interactoma celular.<sup>3</sup>

Vários dos complexos macromoleculares foram amplamente caracterizados e estudados ao longo dos últimos 20 anos,<sup>4</sup> tais como, por exemplo, o spliceossomo e o ribossomo representados na Figura 1.<sup>5-6</sup> Nota-se que cada complexo macromolecular atua de maneira regulatória e se insere em uma hierarquia celular, onde cada complexo ou componente de uma determinada via bioquímica participa de maneira específica dentro de uma cadeia de eventos extremamente definidos.<sup>4</sup>

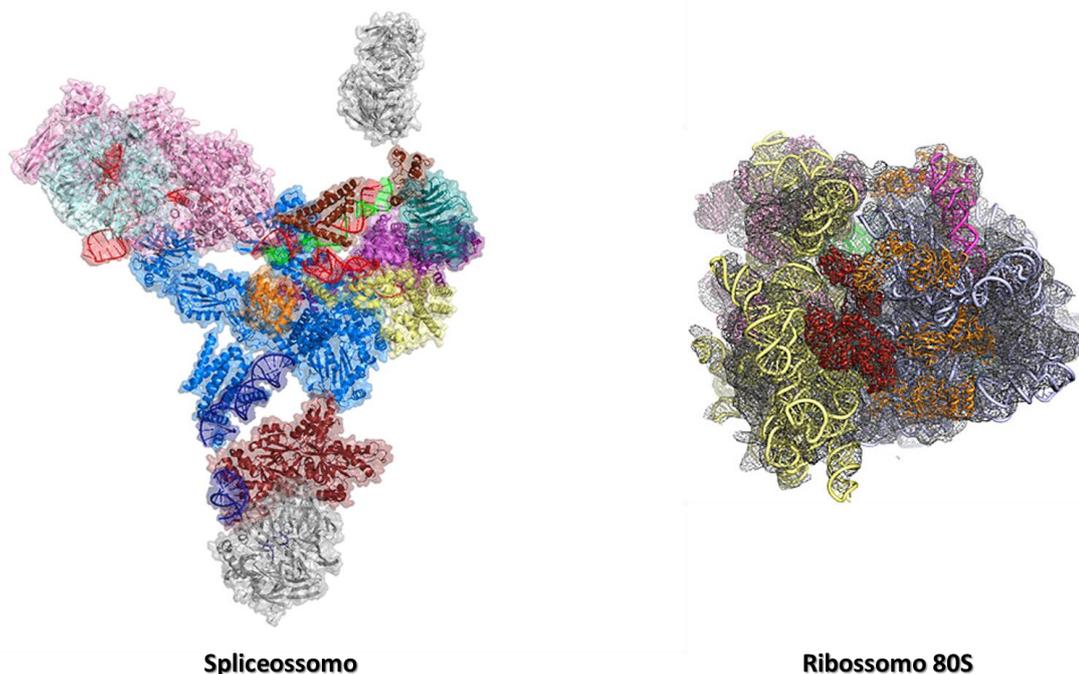


Figura 1 – Exemplos de complexos macromoleculares. O spliceossomo (à esquerda) e o ribossomo 80S (à direita), ambos de *S. cerevisiae*, são exemplos de complexos macromoleculares cruciais para o metabolismo celular e tiveram suas estruturas elucidadas através de análise de partícula isolada por crio-microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM).<sup>5-6</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o pleno conhecimento dos processos biológicos é necessário estudos minuciosos dos complexos macromoleculares envolvidos nas vias bioquímicas, bem como a compreensão das interações aos quais estes participam. Em sua maioria, complexos macromoleculares são mediados por interações entre proteínas responsáveis por funções biológicas específicas. Esses complexos podem ser categorizados como *homocomplexos*, formados pela repetição da mesma subunidade proteica, ou *heterocomplexos*, os quais são formados pelas interações de subunidades proteicas distintas.<sup>7</sup> Além disso, essas interações podem ser do tipo *transiente*, onde a interação ocorre durante um período relativamente curto de tempo para que ocorra a função biológica pretendida, ou mesmo *permanente*, onde o complexo é estável e perene (Figura 2).<sup>7</sup>

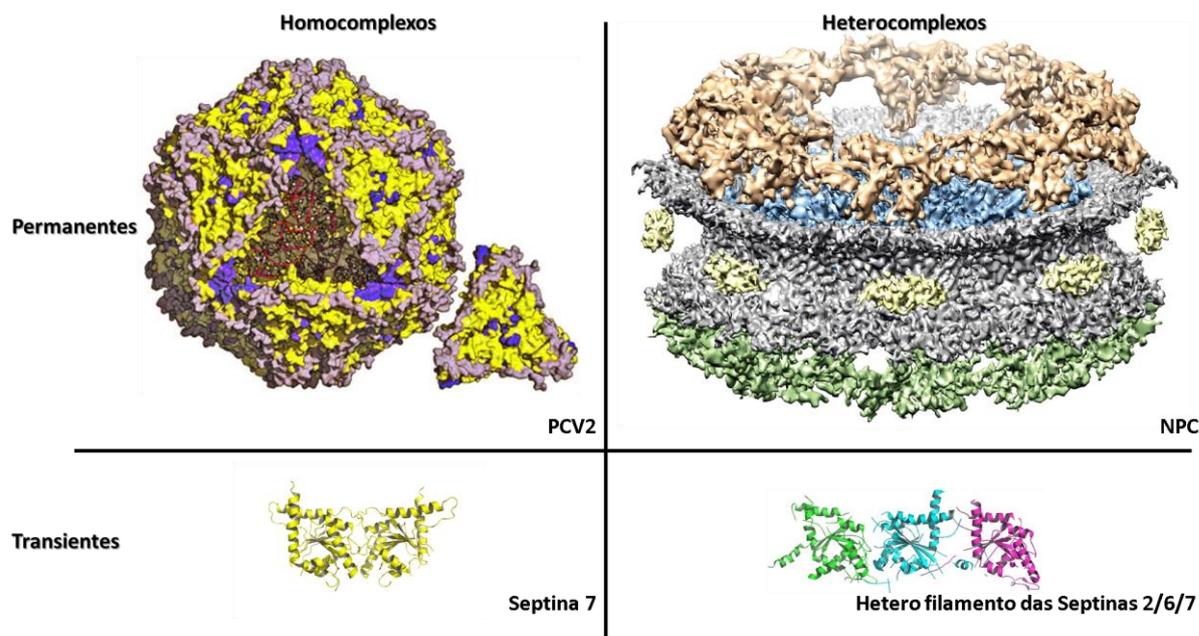


Figura 2 – Complexos macromoleculares. À esquerda são apresentados exemplos de homocomplexos permanentes (capsídeo do porcino-virus tipo 2 formado pela proteína Orf2)<sup>8</sup> e transientes (dímero da proteína Septina 7 que pode interagir com outras proteínas da família através de ambas interfaces promíscuas).<sup>9</sup> À direita, exemplificação de heterocomplexos permanentes (poro nuclear – NPC)<sup>10</sup> e transientes (heterofilamento das Septinas 2/6/7 usualmente montado no processo de citocinese).<sup>11</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além de complexos de interação entre proteínas, existem complexos de interações envolvendo subunidades proteicas e macromoléculas celulares distintas, como lipídeos ou mesmo ácidos nucleicos. Regulação de transcrição gênica e reparo de danos à molécula de DNA são alguns exemplos de complexos envolvendo a interação entre proteína-DNA em processos vitais para o metabolismo celular (Figura 3).<sup>12</sup> Essas interações vêm sendo caracterizadas através de diferentes metodologias *in vitro*<sup>13</sup> ou *in vivo*<sup>14</sup> tornando possível a compreensão dos mecanismos de interação desses complexos macromoleculares.

Estudos mostram que complexos envolvendo macromoléculas são responsáveis por processos essenciais e extremamente específicos, tais como a síntese de ATP, essencial ao metabolismo dos organismos vivos<sup>15</sup> ou mesmo a regulação do ciclo circadiano de mamíferos.<sup>16</sup> No primeiro exemplo, um *heterocomplexo permanente* transmembrânico é responsável pela produção de moléculas de ATP utilizando gradiente eletroquímico.<sup>15</sup> Já no segundo exemplo, *heterocomplexos transientes* interagem com seqüências específicas do DNA (*E-box*) regulando a transcrição de genes (*cry1-2* e *per1-3*). Este é um processo de autorregulação através de um mecanismo de *feed-back* negativo, controlando a concentração intracelular dessas proteínas (*Cry1-2* e *Per1-3*) e sua degradação. Permitindo, deste modo, o

controle periódico do ciclo circadiano molecular da célula.<sup>14,16</sup>

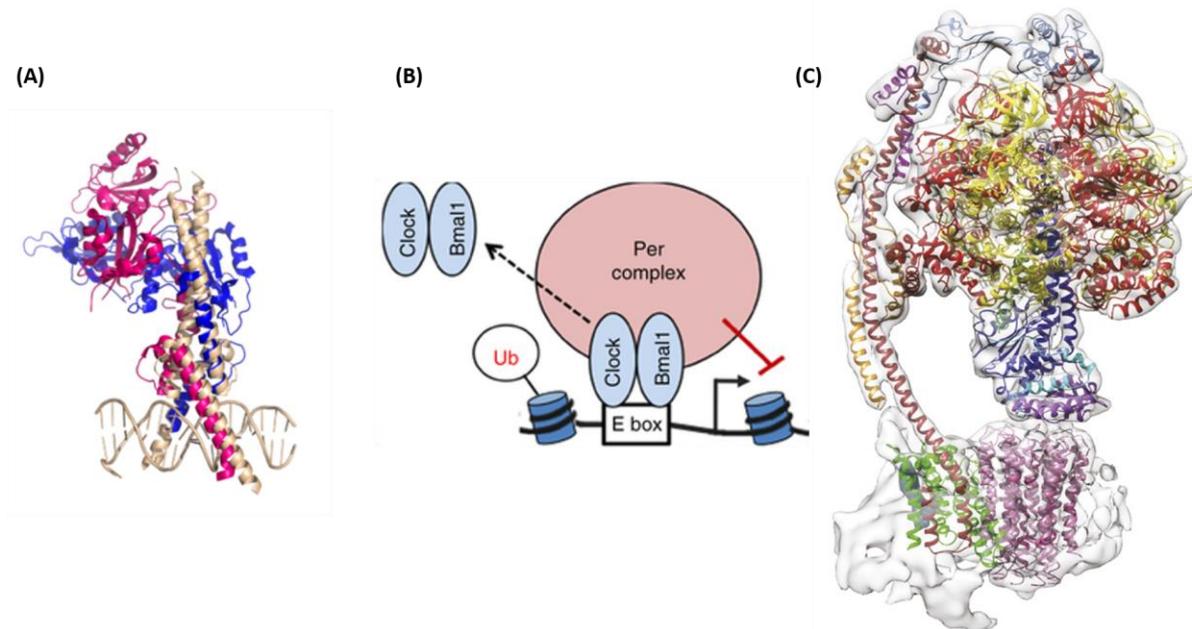


Figura 3 – Exemplos de complexos macromoleculares interagentes com DNA ou membranas. (A) Heterodímero das proteínas ativadoras do ciclo circadiano em mamíferos *Bmal1* e *Clock* interagente com o *E-box* presente no DNA.<sup>14</sup> (B) Proposta de modelo de interação do complexo macromolecular *Per-complex* com o heterodímero, responsável pela repressão da transcrição dos genes *per1-3* e *cry1-2*.<sup>16</sup> (C) Estrutura por Cryo-EM do complexo ATP sintase.<sup>15</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além das interações do tipo proteína-DNA, os complexos proteína-RNA fazem parte de outra categoria de complexos envolvendo proteínas e ácidos nucleicos. Estudos envolvendo esse tipo de complexo ganha destaque dada a relevância das moléculas de RNAs exercendo diferentes funções dentro do ambiente celular, como a sinalização de eventos. A transmissão de informação intracelular na forma de RNA mensageiro (mRNA) ou RNA de transferência (tRNA) é primordial para o metabolismo celular, além de outras funções já previamente conhecidas das moléculas de RNAs.<sup>17</sup>

### 1.1.1 Complexos proteínas – RNAs

Interações entre proteínas e RNAs desempenham papéis cruciais para a vida. Por exemplo, as interações proteína-RNA mediam processos metabólicos tais como *splicing*, poliadenilação, estabilidade de RNA mensageiro, localização e tradução.<sup>18</sup> Além disso, muitas destas proteínas de ligação ao RNA estão associadas à doenças em humanos como câncer ou doenças cardíacas.<sup>19</sup> Logo, fica evidente que RNA *binding proteins* (RBPs) ou proteínas de

ligação a RNA, são essenciais em vários processos do metabolismo celular, como por exemplo, a regulação da expressão gênica, através do controle em cada etapa do processamento do RNA.<sup>20</sup>

Interações proteína-RNA, usualmente, possuem elevada especificidade, como, por exemplo, na aminoacilação de resíduos específicos no tRNA adequado.<sup>21</sup> Comparando com complexos formados somente por subunidades proteicas, a quantidade de possibilidades de estados oligoméricos conhecidos de complexos proteína-RNA é inferior. No entanto, inúmeros complexos dessa natureza vêm sendo caracterizados através de técnicas biofísicas, bioquímicas ou estruturais, o que culminou no aumento significativo da quantidade de estudos realizados para esses complexos macromoleculares.<sup>21</sup>

Dada à relevância biológica, técnicas estruturais como cristalografia de proteínas,<sup>22</sup> espalhamento de raios-X a baixo ângulo<sup>23</sup>, ressonância magnética nuclear<sup>24</sup> e criomicroscopia eletrônica de transmissão<sup>25</sup> vêm sendo empregadas para a obtenção de informações estruturais de complexos proteína-RNA (Figura 4). Vias bioquímicas, como biossíntese de aminoácidos ou mesmo o processo de *splicing*, são alvos de um grande esforço para a compreensão dos mecanismos de interação, reconhecimento e especificidade, dado o papel fundamental da molécula de RNA nesses processos.<sup>26</sup>

As interações dos diversos componentes celulares indicam a extrema complexidade das maquinarias moleculares envolvidas nos processos bioquímicos, mostrando-se como uma nova fronteira para a compreensão dos processos que ocorrem no ambiente celular. Na biossíntese de aminoácidos, por exemplo, fica evidente a participação de complexos macromoleculares de modo transiente.

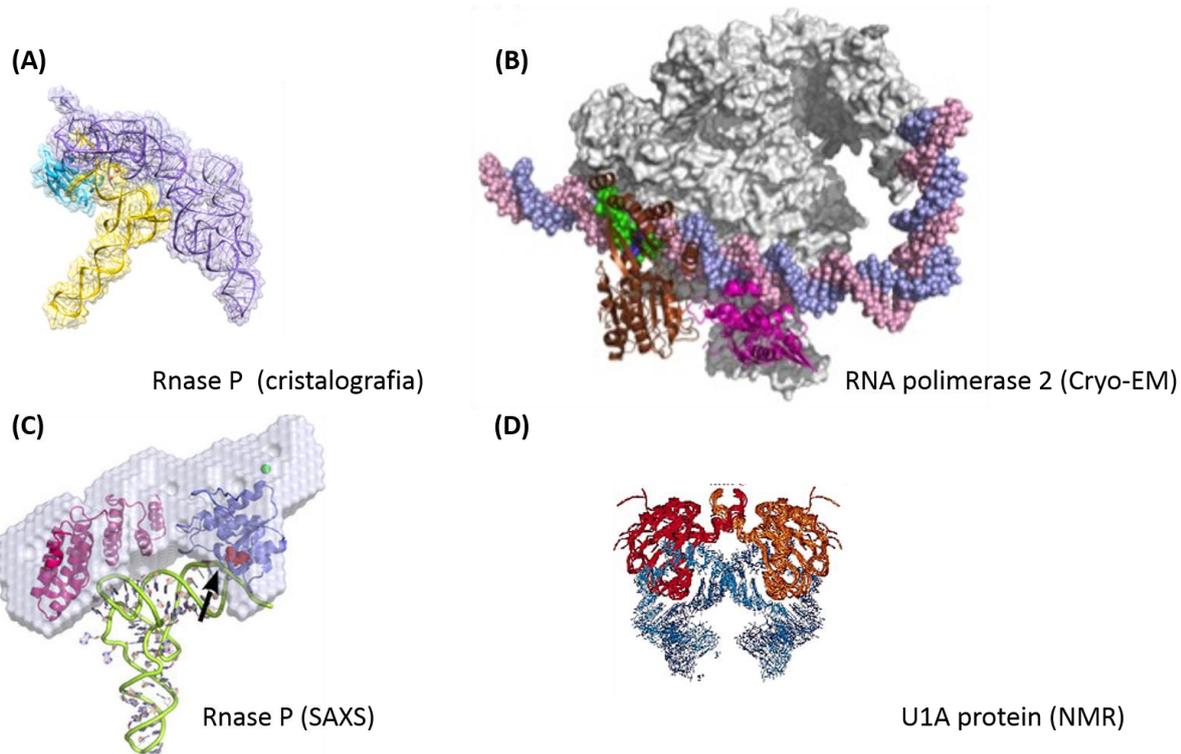


Figura 4 – Estruturas de complexos proteína-RNA obtidas por diferentes técnicas. (A) Complexo RNase P resolvida por cristalografia de proteínas.<sup>22</sup> (B) Estrutura da RNA polimerase 2 obtida por criomicroscopia eletrônica de transmissão.<sup>25</sup> (C) Modelo de interação da RNase P por espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).<sup>23</sup> (D) Estrutura da proteínas U1A em complexo com RNA obtida por ressonância magnética nuclear (NMR).<sup>24</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 1.2 Biossíntese de aminoácidos raros

A priori, todos os 20 aminoácidos usualmente conhecidos são proteínogênicos, ou seja, são precursores de proteínas sendo incorporados às suas cadeias polipeptídicas.<sup>27</sup> Verificou-se que esses aminoácidos estão relacionados com o reconhecimento através de sistemas de autoaminoacilação de ribozimas. Assim, os aminoácidos não proteínogênicos teriam sido excluídos pelo sucesso evolutivo contingente das formas de vida baseadas em nucleotídeos.<sup>2,27</sup> Outras razões têm sido oferecidas para explicar por que certos aminoácidos específicos não são geralmente incorporados em proteínas. No entanto, a existência de outros 3 aminoácidos adicionais que podem ser incorporados por mecanismos especiais de tradução mudou esse cenário.<sup>2,27</sup>

A descoberta dos aminoácidos não usuais N-formilmetionina, pirrolisina, e selenocisteína mudou a compreensão sobre os aminoácidos canonicamente utilizados na síntese de proteínas e também ampliou o conhecimento sobre os processos de biossíntese

cotraducional de aminoácidos não usuais.

Em bactérias, o códon de iniciação AUG, usualmente interpretado como códon de iniciação e inserção de metionina (Met, M) pode ser interpretado como códon de inserção de N-formilmetionina (fMet), que é um derivado do aminoácido metionina pela adição de um grupo formil à extremidade amino-terminal. Esse aminoácido está relacionado ao sistema imune intracelular, permitindo a diferenciação entre proteínas endógenas e exógenas (Figura 5-A)<sup>2</sup>. A adição do grupo formil à metionina é catalisada pela enzima metionil-tRNA formiltransferase (E.C. 2.1.2.9) e essa modificação ocorre após o tRNA<sup>fMet</sup> ter sido carregado com o resíduo de metionina pela aminoacil-tRNA sintetase específica, a metionil-tRNA sintetase (E.C. 6.1.1.10). O resultado dessa aminoacilação, Met-tRNA<sup>fMet</sup>, será posteriormente modificado para fMet-tRNA<sup>fMet</sup> para ser entregue dirigidamente ao sítio A do ribossomo e incorporado juntamente ao códon de iniciação AUG.<sup>28</sup>

Já em organismos procarióticos metanogênicos (arqueias), um aminoácido cujo códon de reconhecimento é o UGA, usualmente interpretado como códon de terminação (“*stop-codon*”), pode também ser interpretado como códon de inserção de pirrolisina (Pyl, O) (Figura 5-B), descoberta essa realizada em 2002.<sup>29</sup> Esse aminoácido é encontrado geralmente no sítio ativo de metiltransferases, enzimas participantes do processo de detoxificação celular pela metilação de elementos tóxicos.<sup>30</sup> No mecanismo de biossíntese atualmente aceito, uma via bioquímica específica de síntese e incorporação é utilizada para realizar a conversão de L-lisina para pirrolisina. Nesse processo, a enzima metil-ornitina sintase (PylB, E.C. 5.4.99.58) realiza a conversão de L-lisina (Lys, K) para (3R)-3-metil-D-ornitina<sup>31</sup>, então a enzima PylC, uma enzima membro da família carbamoil-fosfato sintetase (E.C 6.3.5.5), faz a adição de uma outra molécula de L-lisina ao intermediário de ornitina. Por fim, uma terceira enzima, pirrolisina sintase (PylD, E.C. 6.1.6.3) atua na retirada de uma molécula de amônia seguido de uma ciclização e uma desidratação, formando assim a L-pirrolisina.<sup>29-31</sup> Um RNA de transferência não usual, tRNA<sup>Pyl</sup> codificado pelo gene *pylT*, é então carregado com o resíduo de L-pirrolisina pela enzima PylS (E.C. 6.1.1.26), a pirrolisil-tRNA sintetase, que pertence à classe II das aminoacil-tRNA sintetases. Dessa forma, o Pyl-tRNA<sup>Pyl</sup> resultante é dirigido ao ribossomo para incorporação junto ao códon UGA pelo EF-Pyl, fator de elongação específico para incorporação de Pyl, usualmente codificado como códon de parada (PDB.ID 3WND).

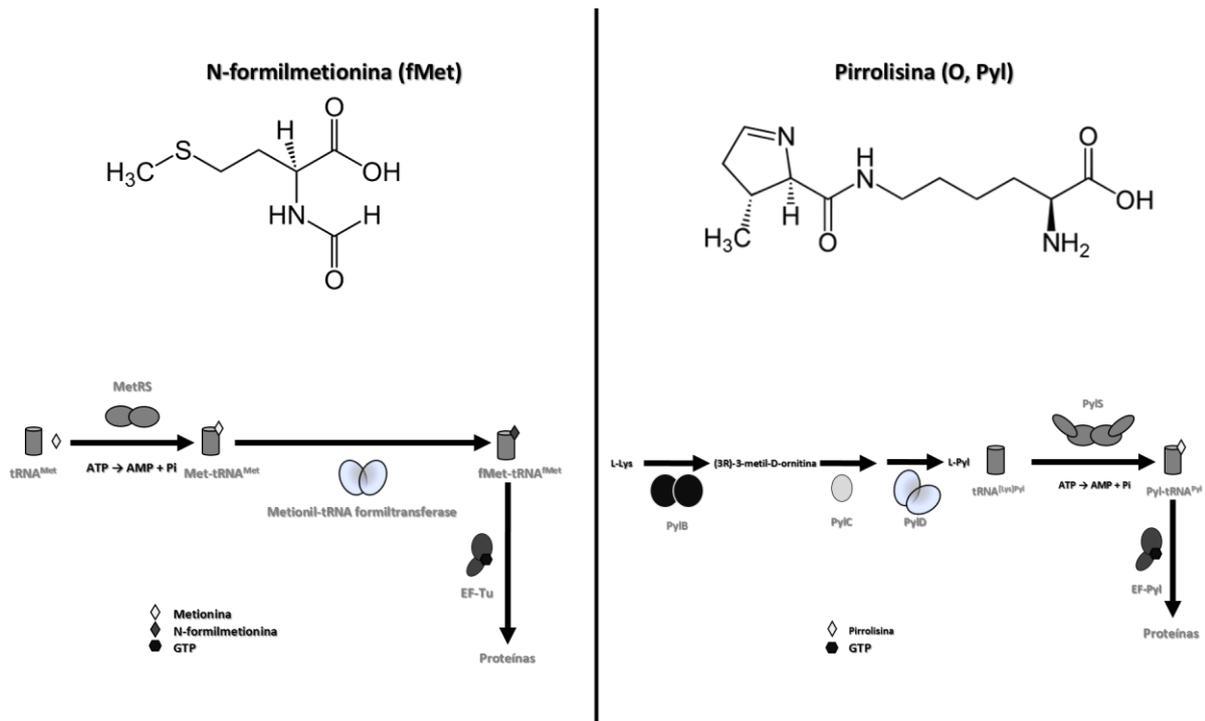


Figura 5 – Síntese de aminoácidos raros. Representação dos aminoácidos N-formilmetionina (fMet) e Pirrolisina (Pyl) e um esquema de síntese de cada um deles apresentado à esquerda e à direita, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além desses dois aminoácidos previamente listados, um terceiro aminoácido não usual se destaca, não somente pela sua complexa via de biossíntese, mas também por ser o único encontrado nos três domínios da vida (*Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*) - a selenocisteína (Sec, U) (Figura 6-A).<sup>32</sup> Esse aminoácido também é codificado e inserido junto à cadeia polipeptídica pelo reconhecimento do códon UGA e sua biossíntese será amplamente discutida nas sessões subsequentes. Apesar de amplamente descritos, os mecanismos de biossíntese desses aminoácidos não canônicos ainda não foram totalmente caracterizados e compreendidos, sendo alvos de estudos atualmente.<sup>33</sup>

### 1.2.1 O selênio e sua importância

Descoberto pelo químico sueco Jöns Jakob Berzelius em 1817, o selênio chamou a atenção pela sua elevada toxicidade.<sup>34</sup> Animais que se alimentavam de plantas de folhas escuras (acumuladoras de selênio) apresentavam sintomas como perda de apetite, paralisias recorrentes, podendo chegar até à morte.<sup>35</sup> A primeira evidência concreta de envenenamento por selênio foi registrada em 1856 pela morte de cavalos que tiveram sua dieta

minuciosamente investigada.<sup>34-35</sup> Em 1957, quase um século depois, foram publicadas as primeiras evidências da importância desse elemento relacionado à saúde humana.<sup>36</sup>

Recentemente, estudos mostraram que esse elemento é essencial à nutrição humana e que seu consumo médio para adultos deve ser 55 e 70 µg/dia para mulheres e homens, respectivamente.<sup>36</sup> Patologias diversas vêm sendo relacionadas ao baixo consumo de selênio na dieta: distúrbios neurológicos como *Alzheimer* e *Parkinson* tem sido intensificados quando indivíduos diminuem a dieta diária de selênio.<sup>36-38</sup> Além disso, uma endemia conhecida como doença de *Keshan*, está relacionada à ausência da ingestão de quantidades mínimas necessárias de selênio na dieta dos indivíduos. Trata-se de uma cardiomiopatia congestiva potencialmente fatal, observada na região de Heilongjian, ao nordeste da China, devido ao fato do solo ser extremamente pobre em selênio, acometendo principalmente mulheres e crianças.<sup>33-39</sup>

Em contrapartida, concentrações elevadas de selênio são extremamente tóxicas,<sup>33</sup> sendo a quantidade diária máxima recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de 400 µg/dia.<sup>33,36</sup> De mesmo modo, organismos unicelulares também possuem concentrações intracelulares ideais de selênio. A resistência de bactérias à metalóides tóxicos, como selênio, arsênio e telúrio, vêm sendo amplamente caracterizada.<sup>40</sup> Para *Escherichia coli*, evidências mostraram que a resistência ao selênio está diretamente relacionada a processos de desintoxicação celular através da utilização desse elemento como aceptor de elétrons na cadeia respiratória em situações de estresse anaerobiótico<sup>41</sup> ou metabolismo de síntese de selenoproteínas utilizando selenometionina ou selenocisteína.<sup>42</sup> Em ambos os processos de desintoxicação, o selênio pode ser utilizado em diferentes formas: selenito ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ) ou selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ).

## 1.2.2 Selenocisteína e selenoproteínas

A selenocisteína (Sec, U), também conhecida como vigésimo primeiro aminoácido, é o único aminoácido raro presente nos três domínios da vida: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*.<sup>43</sup> Esse aminoácido possui como característica marcante a presença de um grupo selenol (HSe) em sua cadeia lateral (Figura 6-A). Considerado semelhante ao aminoácido cisteína (Cys, C) por apresentar um não-metal em sua cadeia lateral (grupo tiol, HS) (Figura 6-B), a selenocisteína se diferencia em alguns aspectos sutis. A estrutura eletrônica do átomo de selênio gera o ânion selenolato, base conjugada de Sec, mais estável do que o correspondente tiolato do resíduo de Cys, implicando em diferenças significativas nos valores de pKa de Sec

(5,2) e Cys (8,5). O menor valor de pKa permite que o aminoácido selenocisteína se encontre ionizado em pHs fisiológicos e, conseqüentemente, apresente maior potencial de redução.<sup>44</sup>

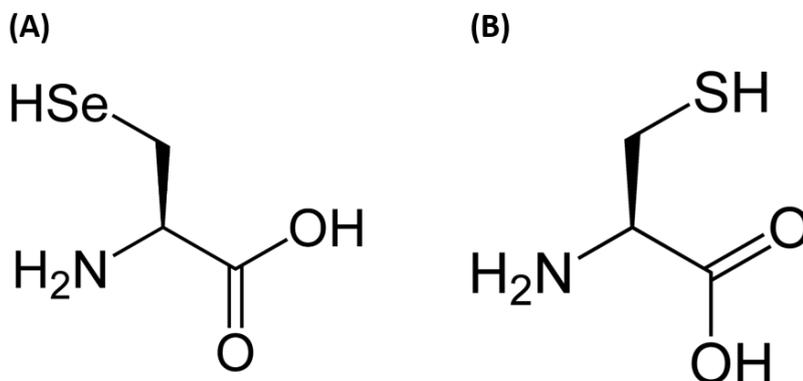


Figura 6 – Comparação entre os aminoácidos Sec e Cys. (A) Selenocisteína (U, Sec). (B) Cisteína (C, Cys).  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Selenoproteínas por sua vez, é a conotação dada às proteínas que possuem aminoácidos que contêm o elemento selênio, como a selenometionina ou selenocisteína. Essas proteínas usualmente possuem atividades catalíticas diversas tais como: peroxidases, glutathionas redutases, tioredoxinas, sintetases e algumas hidrogenases, ou seja, em sua grande maioria são enzimas de oxi-redução com a presença de Sec em seu sítio ativo.<sup>45</sup>

### 1.3 A via de biossíntese e incorporação de selenocisteína

Na biossíntese de proteínas, cada trinca de nucleotídeos (códon) presente no RNA mensageiro (mRNA) é reconhecido através de um pareamento de bases específico por um anticódon pertencente a uma molécula de RNA de transferência (tRNA), previamente aminoacilado por uma aminoacil-tRNA sintetase específica.<sup>27</sup> A cadeia polipeptídica é então formada ao passo que o ribossomo se desloca através do mRNA até atingir um códon de terminação (UAG, UAA ou UGA)<sup>2,27</sup> e a eficiência de translação é intrinsecamente relacionada à disponibilidade das moléculas de tRNAs ao longo desse processo.<sup>2</sup>

Considerando a proposta descrita por Francis Crick no final da década de 1960, o código genético é degenerado e os 20 aminoácidos naturais são codificados por 2, 4 ou 6 combinações de códons distintos, com exceção dos aminoácidos Met e Trp que são codificados por códons simples (AUG e UGG, respectivamente).<sup>2,27</sup>

No entanto, Diamond e colaboradores descreveram em 1982, um inusitado supressor seril-tRNA<sub>UCA</sub> (agora conhecido como seril-tRNA<sup>Sec</sup>) do canônico códon de terminação UGA.<sup>46</sup> Após três décadas de esforços, mostrou-se que esta molécula de RNA incomum funciona como uma molécula transportadora na qual o 21º aminoácido, selenocisteína (Sec, U) é sintetizada através de eventos cotraducionais.<sup>47</sup>

A biossíntese da selenocisteína (Sec) é um processo conservado nos três domínios da vida, com divergências sutis ao compararmos essa via bioquímica nos diversos organismos.<sup>33</sup> Diferentemente dos demais aminoácidos, Sec não tem sua interpretação direta do código genético.<sup>48</sup> A codificação depende de um mecanismo denominado recodificação traducional, onde o códon UGA passa a ser interpretado como um códon de inserção de Sec pela presença de um elemento de estrutura secundária no mRNA em forma de “grampo” (*hairpin*), denominada *SelenoCysteine Incorporation Sequence* (SECIS).<sup>48-49</sup> Este elemento é distinto entre os domínios que apresentam a via de biossíntese de selenocisteína.

Análises genéticas prévias permitiram identificar quatro produtos gênicos responsáveis pela incorporação cotraducional de Sec em selenoproteínas em bactérias: *selA*, *selB*, *selC* e *selD*,<sup>50</sup> que serão apresentadas na próxima sessão desse trabalho, sendo que para *E. coli*, essa via de biossíntese é estudada há mais de 30 anos, e significativos avanços nas identificações dos elementos participantes dessa via bioquímica já foram obtidos.<sup>33</sup> Especificamente, observou-se que mutações no gene *selC* bacteriano afetavam diretamente a incorporação de selênio em selenoproteínas através de ensaios utilizando medidas de complementação funcional da enzima formato desidrogenase (FDH, E.C. 1.2.1.2),<sup>50</sup> em que cepas *selC* deficientes não apresentavam atividade FDH-H e FDH-N, comumente observada em condições de estresse oxidativo. Contudo, tRNAs contendo selenouridina não foram afetados.<sup>51-52</sup> Caracterizações posteriores demonstraram que o gene *selC* é monocistrônico e codifica para tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>50</sup> Por outro lado, os outros genes *sel* codificam para proteínas envolvidas na conversão de serina-selenocisteína (Ser-Sec) e codificação UGA-Sec para a incorporação de selenocisteína em *E. coli*. Estes genes estão organizados nos operons *selAB* e *selD-topB* (onde o gene *topB* codifica a topoisomerase III).<sup>50</sup> Já em eucariotos, a identificação e compreensão da maquinaria de incorporação de Sec vêm sendo alvo de diversos estudos, no entanto, ainda não foi completamente elucidada.<sup>33</sup>

### 1.3.1 A biossíntese de Sec em bactérias

A via de biossíntese e incorporação de Sec vêm sendo amplamente estudada desde o

final da década de 80,<sup>43</sup> sendo que em bactérias, especialmente *Escherichia coli*, todas as etapas e macromoléculas participantes são conhecidas.<sup>41</sup>

O primeiro passo da biossíntese de Sec é a aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup> pela enzima dimérica seril-tRNA sintetase (SerRS, E.C. 6.1.1.11), uma aminoacil-tRNA sintetase de classe II e enovelamento contendo uma folha- $\beta$  antiparalela flanqueada por  $\alpha$ -hélices.<sup>53</sup> Diferentemente dos outros aminoácidos, Sec não requer uma enzima específica para sua incorporação em seu tRNA específico, uma vez que SerRS reconhece unicamente os braços acceptor e variável, não utilizando o anticódon como região de interação.<sup>53</sup> O particular reconhecimento do braço variável ocorre pelo domínio N-terminal em forma de um *coiled-coil*, corroborados pelas estruturas cristalográfica recentemente obtidas, evidenciando o reconhecimento também dos braços: variável, D-loop e T $\psi$ C do tRNA<sup>Sec</sup> pelo domínio em *coiled-coil* de SerRS.<sup>54-55</sup>

A aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup> ocorre em duas etapas. A primeira, a adenilação, produz L-seril-adenilato a partir de L-serina (Ser) com consumo de ATP. Posteriormente, o intermediário L-seril-AMP é formado para então ocorrer a segunda etapa, onde o grupo L-seril é transferido para a extremidade 3'-OH do tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, resultando no Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>.<sup>53-55</sup> A estequiometria de interação entre SerRS e tRNA<sup>Sec</sup> ainda é desconhecida *in vivo*, uma vez que estudos em solução e as estruturas cristalográficas resolvidas até o momento apresentam ambas as razões estequiométricas possíveis de 1SerRS<sub>dímero</sub>: 1 ou 2 tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>55</sup>

Em bactérias, a SerRS entrega o tRNA aminoacilado com L-serina para o complexo homodecamérico selenocisteína sintase (Sela, E.C. 4.2.1.-), uma enzima piridoxal-5' fosfato (PLP) dependente.<sup>56-58</sup> Esse complexo é responsável pela conversão Ser-Sec através de duas reações sequenciais. O primeiro passo consiste na formação de uma base de Schiff entre o grupo  $\alpha$ -amino do resíduo de L-Ser ligado ao tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> com o grupo formil do PLP covalentemente ligado ao resíduo de lisina catalítico de Sela.<sup>56-58</sup> Essa configuração promove a desidratação de Ser e formação do intermediário aminoacrilil-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, que por sua vez está covalentemente ligado à Sela através do braço acceptor e do PLP. O segundo passo reacional consiste na transferência do monoselenofosfato através de uma substituição nucleofílica, o que resulta no selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup>, ou Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>56-58</sup> A enzima Sela será amplamente abordada na seção 1.4 deste capítulo.

O composto de selênio entregue, monoselenofosfato (H<sub>2</sub>SePO<sub>3</sub>), é a forma mais abundante de selênio encontrada no ambiente celular e apresenta baixa toxicidade.<sup>40-42</sup> Ele é produto da enzima dimérica selenofosfato sintetase (Seld, E.C. 2.7.9.3) através do consumo de seleneto (HSe<sup>-</sup>) e ATP. O mecanismo proposto de reação para essa enzima consiste na

fosforilação da cisteína catalítica (C17 em *E. coli*) pela retirada do  $\gamma$ -fosfato da molécula de ATP e posterior transferência para o seleneto através de uma reação de hidrólise, resultando em monoselenofosfato e AMP.<sup>59</sup> Uma vez que compostos de selênio apresentam elevada toxicidade, a interação entre as proteínas da via de biossíntese de Sec foi proposta como hipótese para não haver eventuais danos celulares causados por esses compostos.<sup>60</sup> A interação de SelD para a entrega do  $\text{H}_2\text{SePO}_3$  para o complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup> foi recentemente caracterizada por meio de ensaios de espectroscopia de anisotropia de fluorescência e outras técnicas biofísicas, mostrando a formação de um complexo ternário transiente SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD com constante de interação de aproximadamente 750 nM e dimensões de 27 e 4,5 nm quando observada em “*top*” e “*side*” views, respectivamente.<sup>60</sup>

No entanto, as células obtêm selênio da natureza em sua forma inorgânica ( $\text{Se}^0$ ) e requerem um mecanismo de conversão para formas orgânicas de selênio antes de serem utilizados nas biossínteses de aminoácidos.<sup>40-42</sup> A enzima dimérica PLP-dependente selenocisteína liase (CsdB, E.C. 4.4.1.16) é responsável pela reciclagem de compostos de selênio e enxofre nas células,<sup>61</sup> podendo utilizar formas inorgânicas desses não-metais ou mesmo a reutilização dos aminoácidos Sec e Cys provindo da degradação de proteínas.<sup>62</sup> Em *E. coli*, CsdB apresenta maior atividade específica utilizando L-Sec como substrato em comparação com L-Cys<sup>63</sup> e a reação enzimática consiste na utilização do resíduo Cys364, na presença do PLP, em um ataque nucleofílico ao aminoácido L-Sec. Dessa forma, o  $\text{Se}^0$  é liberado espontaneamente do intermediário formado ao longo da reação de “deselenização”.<sup>63</sup> Dada a elevada toxicidade desses compostos, a interação para a entrega do produto reacional de CsdB para SelD foi proposta por inúmeros autores,<sup>33,59-60</sup> porém não sendo descrita experimentalmente na literatura até o momento.

Por fim, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> deve ser entregue no sítio aminoacil (sítio A) do ribossomo (50S & 30S em procariotos). A inserção Sec junto ao códon UGA (Sec-UGA) é promovida através de um mecanismo de distinção do códon de parada para o códon de inserção de Sec pela presença de um elemento de estrutura secundária no mRNA em forma de grampo denominado *Selenocysteine Insertion Sequence* (SECIS).<sup>48,64</sup> Em bactérias, SECIS é localizado imediatamente após o códon UGA e possui cerca de 20-25 nucleotídeos compondo cinco elementos estruturais distintos que o caracterizam como sendo SECIS-*form* I: hélice I (localizada próxima ao códon UGA-SECIS); *loop* interno; SECIS *core* (um pareamento do tipo não-Watson-Crick); hélice II e *loop* apical que pode apresentar diferentes sequências, formato e posições para cada gene.<sup>64</sup> Estudos mostraram que o *loop* apical é crucial para incorporação de Sec em bactérias através de reconhecimento do domínio C-terminal pelo

fator de alongação específico para incorporação de Sec, SelB,<sup>65</sup> indicando a especificidade desse elemento estrutural, que será discutido em mais detalhes na seção 1.6.

Em *E. coli*, o selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup> é entregue ao ribossomo mediado pelo fator de alongação SelB<sup>66</sup>. Esse fator de alongação distinto é o responsável pelo reconhecimento do elemento SECIS presente no mRNA através do domínio C-terminal ou WHD4 (*winged-helices domain*). Já o reconhecimento do Sec-tRNA<sup>Sec</sup> (especificamente dos braços acceptor, variável e T $\psi$ C), ocorre por meio dos domínios centrais WHDs 2 e 3. A entrega ao ribossomo é possível pelo reconhecimento da subunidade L11 ribossomal (através do domínio N-terminal, homólogo à outros fatores de alongação (EFs) e sendo um domínio com enovelamento canônico de *Small-GTPases*).<sup>66-71</sup>

O complexo SelB.GTP.Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS é reconhecido pelo complexo ribossomal para a incorporação de Sec e esse complexo teve sua estrutura elucidada por análises de partícula isolada (*single particle analysis* – CryoEM).<sup>72</sup> A via de biossíntese de Sec em bactérias está representada através do esquema da Figura 7-A e as estruturas cristalográficas (SerRS – PDB.ID 2DQ3; SelA – PDB.ID 3W1H; CsdB - PDB.ID 1JF9; SelD – PDB.ID 3U0O; SelB – 4ZU9 e tRNA<sup>Sec</sup> – PDB.ID 3W3S) na Figura 7-B. Os detalhes de SelB serão abordados na seção 1.5 deste capítulo e ao longo desse projeto de doutorado.

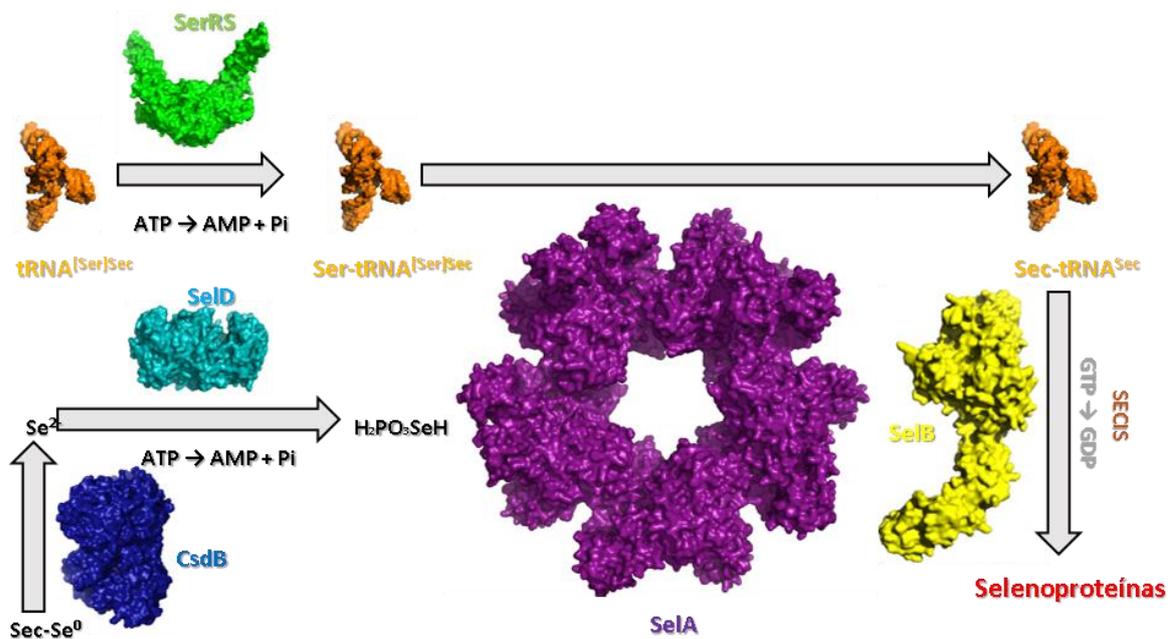


Figura 7 – A via de biossíntese e incorporação de Sec em bactérias. Esquema representado pelas estruturas das proteínas participantes da via de biossíntese de Sec que tiveram suas estruturas resolvidas por técnicas experimentais. O tRNA<sup>Sec</sup> é aminoacilado pela enzima dimérica SerRS (verde) e posteriormente reconhecido pelo complexo homodécamerico Sela (roxo) para a conversão Ser-Sec. O composto de selênio é entregue pelo dímero Seld (ciano) que está envolvido com o processo de reciclagem de selênio juntamente com a enzima dimérica CsdB (azul). Após a conversão, o Sec-tRNA<sup>Sec</sup> é encaminhado para a cadeia polipeptídica nascente pelo fator de alongação específico (SelB, amarelo) onde é incorporado através do reconhecimento do elemento SECIS e consumo de GTP. (SerRS – PDB.ID 2DQ3, em verde; Sela – PDB.ID 3W1H, em roxo; CsdB - PDB.ID 1JF9, em azul; Seld – PDB.ID 3U00, em ciano; SelB – 4ZU9, em amarelo e tRNA<sup>Sec</sup> – PDB.ID 3W3S, em laranja).

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 1.3.2 A biossíntese de Sec em arqueias e eucariotos

Brevemente, comparando-se a via de biossíntese e incorporação de Sec em arqueias e em eucariotos, nota-se a maior complexidade em relação a via em bactérias, por envolver um número maior de proteínas nesse processo. O passo inicial, a aminoacilação do tRNA específico (tRNA<sup>Sec</sup>) ocorre de maneira semelhante ao previamente descrito para bactérias, uma vez que as aminoacil-tRNA sintetases (aaRS) apresentam enovelamento e função extremamente conservados entre uma grande variedade de organismos, indicando atuação através do mesmo mecanismo de ação para os diferentes domínios.<sup>33,53</sup>

Interessantemente, a principal diferença estrutural no início da via de biossíntese de Sec consiste na variação do paramento de bases nos braços acceptor e T $\psi$ C do tRNA<sup>Sec</sup> de ‘8+5’ (bactérias) para ‘9+4’ (arqueias e eucariotos), porém mantendo a soma total de pareamentos (13) e ainda distinto dos tRNAs canônicos (‘7+5’)<sup>73</sup> (Figura 8). O mecanismo de reconhecimento dos tRNAs<sup>Sec</sup> em outros domínios ainda não foi completamente caracterizado. No entanto, das informações previamente conhecidas em bactérias, pode-se inferir que as regiões de reconhecimento esperado sejam semelhantes às de bactérias (Figura 8).

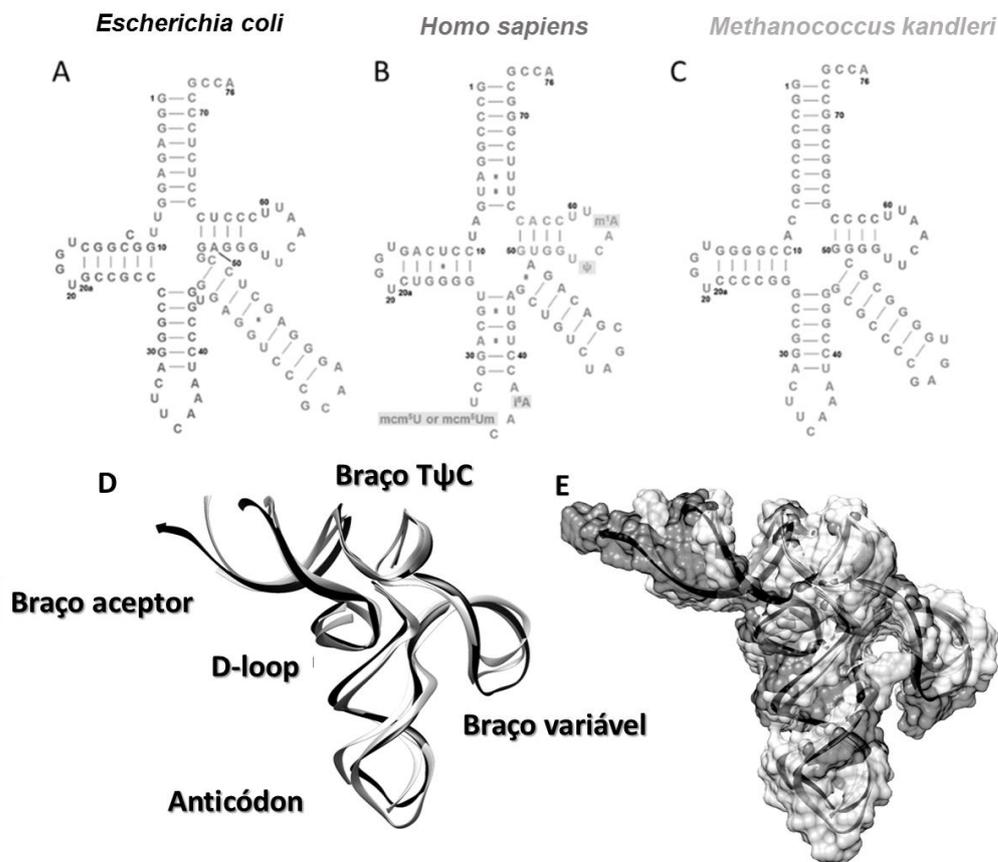


Figura 8 – Comparação do tRNA<sup>Sec</sup> para os diferentes domínios da vida. (A-C) Representação em 2D em trevo dos tRNAs<sup>Sec</sup> de *E. coli*, *H. sapiens* e *M. kandleri*, respectivamente. (D) Sobreposição tridimensional das estruturas dos tRNAs<sup>Sec</sup> e identificação de cada região do mesmo. (E) Sobreposição tridimensional em superfície das estruturas dos tRNAs<sup>Sec</sup>.

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>†</sup>

A conversão Ser-Sec por sua vez diverge totalmente entre bactérias e os demais organismos. Em bactérias, como já mencionado, a enzima homodecamérica SslA é a responsável pela conversão do seril-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> em selenocisteil-tRNA<sup>Sec</sup> através do

<sup>†</sup> Em colaboração com o Dr. Ivan Rosa e Silva (IFSC/USP).

composto de selênio e presença do PLP.<sup>33,74</sup> No entanto, em arqueias e eucariotos esse passo reacional é dividido em duas etapas.

A primeira etapa após a aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup> é realizada pela enzima dimérica O-fosfoseril-tRNA<sup>Sec</sup> quinase (PSTK, E.C. 2.7.1.164).<sup>75</sup> Essa enzima é responsável pelo reconhecimento e interação com o Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> através dos braços acceptor e *D-loop* desse tRNA com seu domínio N-terminal proteico, o qual apresenta enovelamento homólogo ao mesmo domínio de Sela (feixe de 3  $\alpha$ -hélices) e responsável por sua oligomerização.<sup>75-76</sup> A reação consiste na fosforilação do grupo  $\gamma$ -hidroxila do Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> através do consumo de ATP, resultando no Sep-tRNA<sup>[Sep]Sec</sup>, ou O-fosfo-L-seril-tRNA<sup>[Sep]Sec</sup> e liberação de ADP.<sup>75-76</sup>

A conversão Sep-Sec por sua vez é mediada pela enzima tetramérica O-fosfoseril-selenocisteil sintase (SepSecS, E.C. 2.9.1.2).<sup>77</sup> Essa enzima também é PLP dependente e autoregulada alostericamente pela presença de uma subunidade dimérica não catalítica,<sup>78</sup> ou seja, o tetrâmero pode interagir com apenas 1 Sep-tRNA<sup>Sec</sup> funcionalmente.<sup>78</sup> O motivo desse mecanismo ainda não foi completamente solucionado, uma vez que ambas as subunidades diméricas que formam o tetrâmero são idênticas. SepSecS apresenta um enovelamento do tipo *Sela-like* e seu N-terminal é o responsável pelo reconhecimento do Sep-tRNA<sup>[Sep]Sec</sup> através dos braços acceptor, T $\Psi$ C e variável.<sup>79</sup> Dada a especificidade da biossíntese de Sec, foi proposto que o complexo macromolecular PSTK.Sep-tRNA<sup>[Sep]Sec</sup>.SepSecS é formado de maneira transiente para a entrega específica do tRNA à próxima enzima da via.<sup>76-79</sup> No mecanismo proposto, SepSecS hidroliza o grupo O-fosfoseril utilizando monoselenofosfato em uma substituição nucleofílica, analogamente ao descrito para o mecanismo de Sela.<sup>79</sup>

Assim como bactérias, o monoselenofosfato é entregue por uma enzima dimérica selenofosfato sintetase 2 (SPS2, E.C. 2.7.9.3) que realiza a conversão seleneto à monoselenofosfato com a utilização de ATP através do mesmo mecanismo proposto para a enzima bacteriana SelD dada a elevada conservação funcional dessa enzima ao se comparar entre diferentes organismos.<sup>33,80</sup> Estudos prévios mostraram que o  $K_M$  de SPS2 e de SelD para seleneto é de 20  $\mu$ M,<sup>81,82</sup> o que são concentrações extremamente tóxicas para a célula. Esse fato indica a possibilidade de haver interações sítio específicas para a entrega desses compostos, assim como proposto anteriormente.<sup>60</sup> Eucariotos possuem duas isoformas de SPS (SPS 1 e SPS2) sendo somente a segunda biologicamente ativa para o consumo de seleneto.<sup>83</sup> Contudo, SPS1 é proposta como sendo uma das enzimas responsáveis pela reciclagem de Sec a partir de selenoproteínas juntamente com a selenocisteína liase.<sup>84</sup>

As *Nifs-like proteins*, enzimas relacionadas ao metabolismo e reconhecimento de

enxofre e/ou selênio<sup>33</sup> podem ser nomeadas diferentemente. A *selenium-binding protein* (SeBP) em arqueias ou *selenocysteine lyase* (SCLY) em eucariotos, são homólogas da selenocisteína liase bacteriana apresentada na seção anterior. Essa classe de enzimas cataliza irreversivelmente a “deselenização” a partir de Se<sup>0</sup> ou L-Sec resultando em seleneto e alanina (E.C. 4.4.1.16).<sup>85-86</sup> Seu mecanismo descrito é análogo ao apresentado previamente para bactérias e possuem enovelamento extremamente conservado sendo proposta a possível interação entre SPS2.SeBP/SCLY,<sup>33,80,85</sup> porém não demonstrada experimentalmente até o momento.

Sec-tRNA<sup>Sec</sup> maduro deve, por fim, ser encaminhado para o ribossomo. Para isso, um EF específico para incorporação de Sec (EFSec) é recrutado para o reconhecimento do tRNA específico e encaminhamento deste ao sítio A do complexo ribossomal.<sup>86</sup> Diferentemente de SelB, o EFSec apresenta somente três WHDs (*winged-helix domain*) em forma de cálice, sendo ausente a WHD4 responsável pelo reconhecimento do elemento SECIS.<sup>87</sup> O domínio N-terminal é extremamente conservado à SelB e outros EFs canônicos, porém as WHD2 e WHD3 (responsáveis por interagir com o tRNA<sup>Sec</sup>) possuem grande flexibilidade conformacional comprovada pelas estruturas utilizando diferentes análogos de GTP.<sup>87</sup> O EFSec de arqueias e de eucariotos, sobretudo de humanos, são estruturalmente semelhantes apresentando algumas peculiaridades com relação à flexibilidade nos domínios centrais.<sup>88</sup> Os braços do tRNA<sup>Sec</sup> reconhecidos por EFSec são os mesmos que por SelB, apesar de não haver nenhuma estrutura com esses complexos até o momento. A diferença fundamental consiste na ausência da WHD4 e a necessidade de uma outra proteína responsável pelo reconhecimento do elemento SECIS e do EFSec, a SECIS *binding protein* (SBP2).<sup>89</sup>

SBP2 são proteínas que apresentam elevada especificidade ao elemento SECIS, sobretudo à região do motivo não Watson-Crick presente na alça central formada, sendo descritas somente em eucariotos até o momento.<sup>90</sup> Em arqueias, ainda não se sabe qual o mecanismo de reconhecimento do elemento SECIS para a incorporação de Sec.<sup>91</sup> Diferentemente de bactérias, o elemento SECIS em arqueias e eucariotos está contido no 3'UTR (região não codificante no 3' do mRNA), dobrando-se sobre o UGA-Sec códon com o auxílio da SBP2 (descrito em eucariotos).<sup>92</sup> Estudos mostraram que SBP2 é responsável pela coordenação de um complexo EFSec.Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.SBP2 que é dirigido ao UGA-Sec e, conseqüentemente, ao sítio A do ribossomo e possui dois domínios: ligação ao RNA (L7, região rica em lisinas) e ligação ao ribossomo.<sup>92</sup>

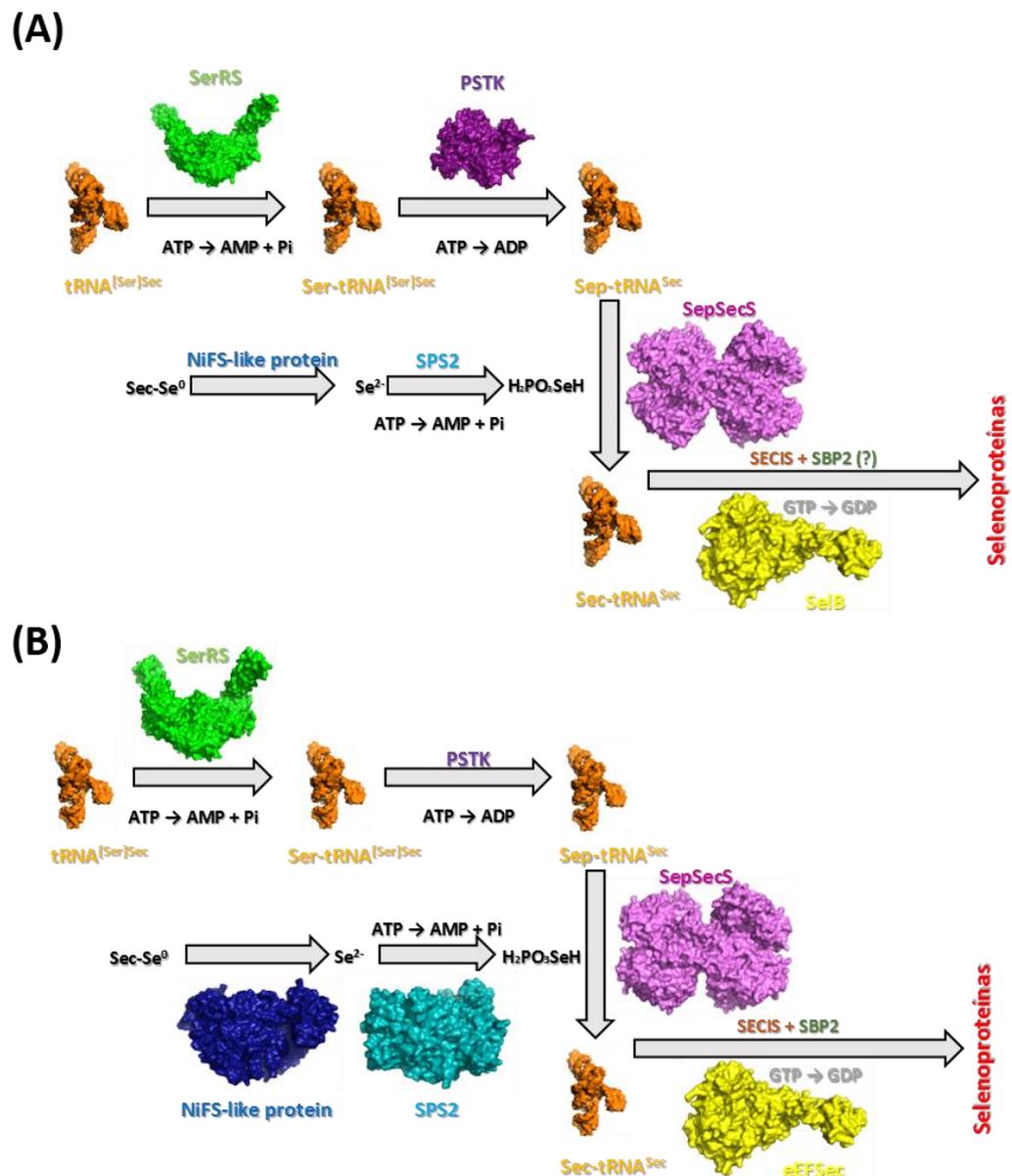


Figura 9 – A via de biossíntese e incorporação de Sec em arqueias e eucariotos. Esquema representado pelas estruturas das proteínas participantes da via de biossíntese de Sec em arqueias (A) e eucariotos (B) que tiveram suas estruturas resolvidas por técnicas experimentais (SerRS – PDB.ID 2CJB/4RQE, em verde; PSTK – PDB.ID 3A4L/3AM1, em roxo; SepSecS – PDB.ID 2Z67/4ZDP, em rosa; SCLY - PDB.ID 3GZC, em azul; SPS2 – PDB.ID 3FD5, em ciano; EFSec – 4ACB/5IZL, em amarelo e tRNA<sup>Sec</sup> – PDB.ID 4ADD/3A3A, em laranja, para arqueias e eucariotos respectivamente).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No entanto, a entrega de Sec ao ribossomo e formação desse complexo macromolecular (EFSec.GTP.Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.SBP2.SECIS.ribossomo) não é totalmente compreendido até o momento, sobretudo pela ausência de informações estruturais de SBP2s. As vias de biossíntese de Sec em arqueia e eucariotos estão representadas no esquema da Figura 9 com as estruturas cristalográficas (SerRS – PDB.ID 2CJB/4RQE; PSTK – PDB.ID

3A4L/3AM1; SepSecS – PDB.ID 2Z67/4ZDP; SCLY - PDB.ID 3GZC; SPS2 – PDB.ID 3FD5; EFSec – 4ACB/5IZL e tRNA<sup>Sec</sup> – PDB.ID 4ADD/3A3A, para arqueias e eucariotos respectivamente).

#### 1.4 A enzima selenocisteína sintase (SelA) e suas interações transientes

Como já mencionado anteriormente, o complexo homodecamérico Sec sintase (SelA, E.C. 4.2.1.-) é responsável pela conversão Ser-Sec através da incorporação de monoseleno fosfato por intermédio de uma substituição nucleofílica.<sup>33,56-58</sup> Essa enzima PLP-dependente é descrita desde o início dos anos 90,<sup>56-58</sup> e teve sua estrutura cristalográfica resolvida somente em 2015.<sup>93</sup> Desde os primórdios o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> também tem sido alvo de inúmeros estudos.<sup>93-97</sup> Essa macromolécula possui conformação oligomérica de um pentâmero de dímeros, formando um homodecamêro, em *Escherichia coli* onde cada subunidade monomérica tem 463 resíduos de aminoácidos e massa molecular aproximada de 50,6 kDa.<sup>56</sup>

Inicialmente, acreditou-se que o complexo binário fosse constituído por um heterocomplexo formado por 1 SelA<sub>decâmero</sub> interagindo com 5 moléculas de Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, em outras palavras, 10 SelA<sub>monômero</sub>:5 tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>57</sup> Somente há alguns anos atrás a correta razão estequiométrica foi determinada (1SelA<sub>decâmero</sub>:10tRNA<sup>Sec</sup>),<sup>95</sup> o que corroborou com a estrutura cristalográfica publicada pouco tempo após à 7.5 Å de resolução para esse heterocomplexo de *Aquifex aeolicus*, uma espécie de bactéria ancestral termofílica, cuja identidade sequencial de SelA entre *A. aeolicus* e de *Escherichia coli* é de 30%.<sup>93</sup> O dobramento '8+5' dos braços acceptor e TψC propiciam a distância ideal para que a extremidade Sec-3' do Sec-tRNA<sup>Sec</sup> se posicione junto ao PLP covalentemente ligado à lisina (K295, em *E. coli*).<sup>56,93,97</sup>

O domínio N-terminal de SelA reconhece o D-loop do tRNA<sup>Sec</sup>, sendo vital para a especificidade.<sup>93,98</sup> Além disso, o domínio formado por um feixe de três α-hélices é o responsável pela decamerização do homocomplexo, tornando-o biologicamente ativo, pois sem o arcabolo catalítico formado na interface entre os dímeros, essa enzima não é ativa em sua conformação dimérica,<sup>98</sup> assim como mostrado para o gene putativo *MjselA* de *Methanococcus jannaschii*, uma arqueia.<sup>99</sup>

O mecanismo de reação, previamente descrito na seção 1.3.1, é aceito desde 1991,<sup>97</sup> porém a cinética de incorporação não foi estabelecida até o momento. Estudos de interação recentes dos complexos macromoleculares envolvendo SelA de *E. coli* mostraram a interação com o tRNA<sup>Sec</sup> em solução, porém não determinou-se uma constante de interação por não ser

possível saturar o sistema.<sup>95</sup> No entanto, esse estudo comprovou a estequiometria de interação entre SelA e o tRNA<sup>Sec</sup> em solução, corroborado posteriormente pela estrutura cristalográfica.<sup>93</sup> A Figura 10 ilustra os avanços do conhecimento do complexo SelA principalmente com a utilização de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão.

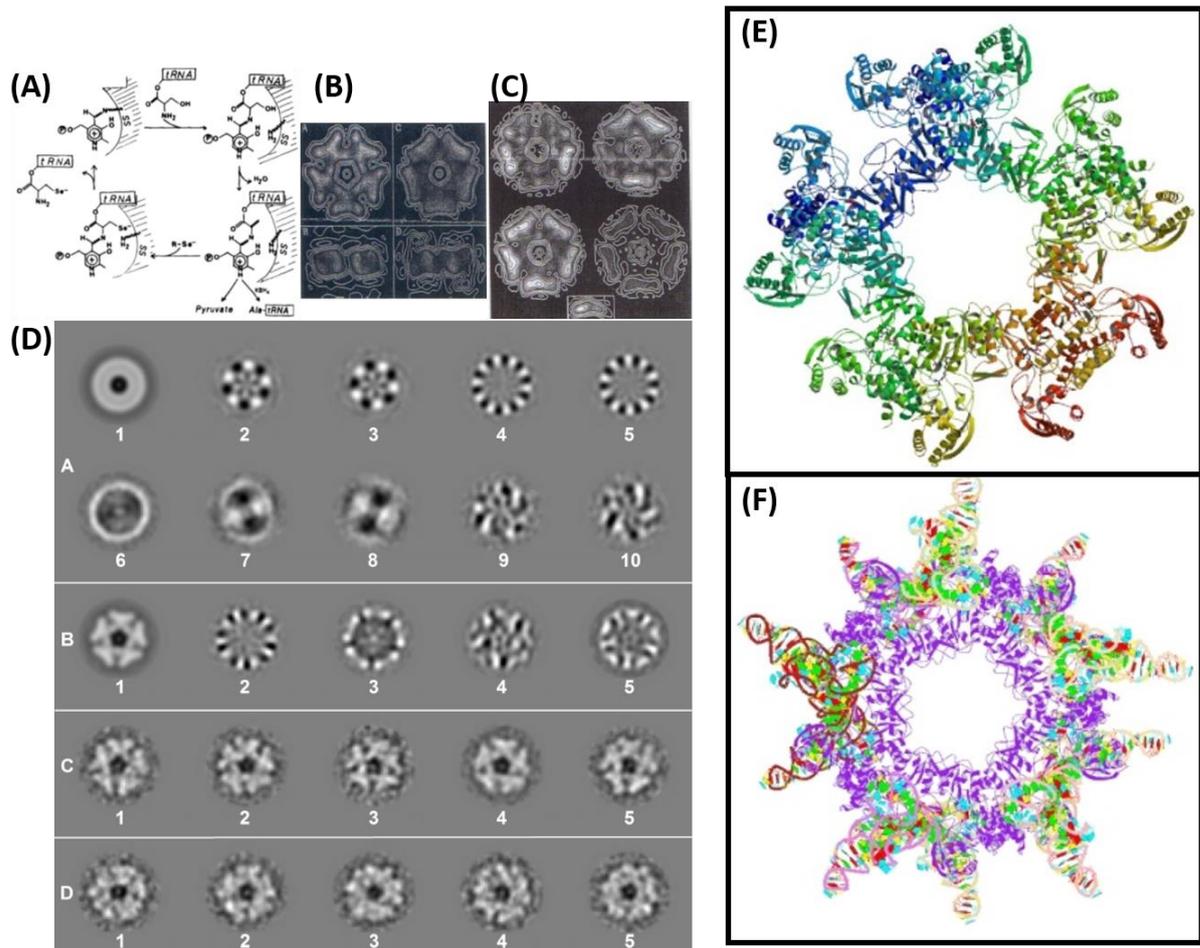


Figura 10 – Estado da arte dos estudos envolvendo o homodecamêro SelA. (A) Mecanismo catalítico proposto.<sup>97</sup> (B) Primeiras imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de SelA<sup>97</sup> e (C) do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, acreditando-se na estequiometria 1SelA:5tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>95</sup> (D) Análises estatísticas multivariadas (MSA) dos conjuntos de dados de SelA e SelA.tRNA<sup>Sec</sup> evidenciando a simetria D5 e, portanto, estequiometria 1SelA:10tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>95</sup> (E) Estrutura cristalográfica à 3,5 Å de resolução de SelA e (F) à 7,5 Å de resolução para o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, comprovando a estequiometria de 1:10.<sup>93</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Desde 2005, complexos envolvendo SelA e SelD de *E. coli* são alvos de estudos do grupo coordenado pelo Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann do Instituto de Física de São Carlos (IFSC/USP) através de projetos de pós-graduação envolvendo 4 alunos do grupo de pesquisa<sup>100-104</sup> que resultaram em 4 publicações até o momento.<sup>60,94-96</sup> Em 2015, a formação do complexo transiente responsável pela entrega de selênio foi caracterizada bioquímica e biofisicamente.<sup>60</sup> O complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> interage com SelD, resultando em um complexo de dimensões nanométricas de aproximadamente 1,3 MDa. Esse estudo também mostrou que deleções dos domínios N-terminal de ambas as enzimas (SelA e SelD) além de torná-las inativas em suas respectivas reações bioquímicas, também impossibilitam a interação para a formação do complexo ternário.<sup>60</sup> Um esquema do reconhecimento para a formação do complexo ternário está representado na Figura 11.

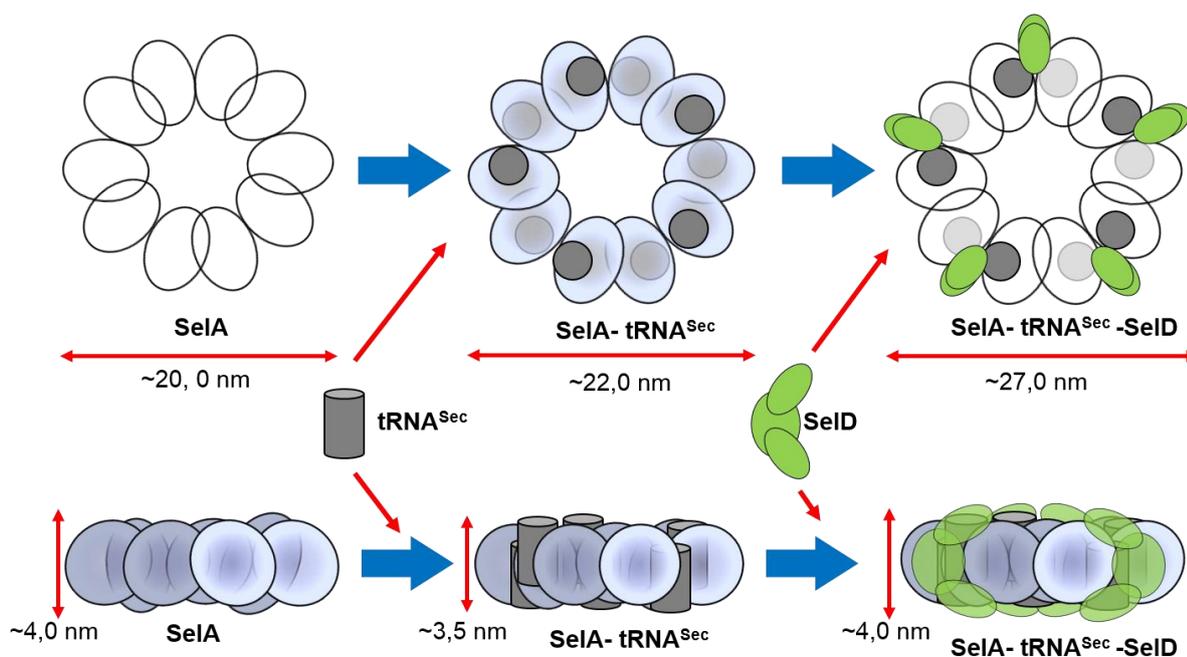


Figura 11 – Modelo de interação do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD. O complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> inicialmente formado permite a interação de 5 dímeros de SelD, formando o complexo ternário transiente SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD.  
Fonte: Adaptada de SILVA et al.<sup>60</sup>

Apesar de todos os esforços anteriores, estudos envolvendo SelA continuam motivando vários grupos de pesquisas, uma vez que essa enzima exclusiva de bactérias tem um papel fundamental na biossíntese desse aminoácido intrigante. Por conta disso, as interações nas quais SelA participa na via de síntese de Sec continuam sendo pesquisadas.

## 1.5 O fator de alongação específico para incorporação de Sec em bactérias, SelB

O fator de alongação responsável pela incorporação específica de Sec em bactérias é denominado SelB e, em *E. coli*, possui 614 resíduos e massa molecular de aproximadamente 69 kDa.<sup>66-72</sup> Inicialmente descrito no início da década de 90,<sup>66</sup> SelB possui três domínios de interação previstos subdivididos em quatro WHDs (*winged-helix domain*). O domínio N-terminal GTPásico é um domínio EFTu *like* com enovelamento canônico dentre os EFs com topologia  $\alpha/\beta$  e sofre modificação conformacional durante a hidrólise GTP na presença de magnésio.<sup>66,72,87,105-106</sup> É responsável pela hidrólise do nucleotídeo energético e reconhecimento na interação com a proteína ribossomal L11 na entrega do tRNA<sup>Sec</sup> aminoacilado ao sítio A do ribossomo.<sup>72</sup> O domínio de reconhecimento ao Sec-tRNA<sup>Sec</sup> é constituído por dois domínios WHDs (2 e 3) com enovelamento do tipo barril- $\beta$ .<sup>70,72</sup> Por fim, o domínio C-terminal único (domínio IV ou WHD4) para bactérias possui um enovelamento de quatro motivos WHD em tandem para o reconhecimento do elemento SECIS.<sup>88</sup>

SelB se caracteriza como uma proteína com enovelamento do tipo  $\alpha/\beta$  onde, majoritariamente, a contribuição é de estruturas do tipo folhas- $\beta$  encontradas no domínio de interação ao tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>70,72</sup> Trabalhos anteriores estabeleceram protocolos de expressão e purificação de SelB, porém com baixo rendimento ao longo do processo.<sup>107</sup>

Durante anos, o único estudo que apresentava informações estruturais de SelB baseou-se em modelagem comparativa com base nas estruturas experimentais dos EFs canônicos, e posterior suposição do enovelamento dos domínios que não apresentavam estruturas homólogas determinadas.<sup>69</sup> Na última década, estruturas dos truncamentos do domínio C-terminal (WHDs 3 e 4) foram resolvidas por cristalografia de proteínas<sup>88</sup> bem como a estrutura de SelB de *A. aeolicus* (PDB.ID 4ZU9).<sup>70</sup> Recentemente, a estrutura de SelB de *E. coli* foi resolvida em complexo com o tRNA<sup>Sec</sup>, elemento SECIS e ribossomo através de análise de partícula isolada (Cryo-EM) (PDB.ID 5LZB).<sup>72</sup> Todas as estruturas apresentam um formato característico em cálice.<sup>69-72,87</sup> Com base nas estruturas resolvidas, é sabido que para *EcSelB* os resíduos D115, T113, A147 e V152 são responsáveis pela interação com os nucleotídeos e magnésio e os resíduos T192, R235 e H223 são os responsáveis pela interação específica ao resíduo de Sec presente na extremidade 3'OH do tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>70,72</sup> As estruturas do domínio C-terminal, responsável pela interação ao SECIS, e uma extensão da WHD3, responsável pelo reconhecimento ao Sec-tRNA<sup>Sec</sup> do organismo *M. maripaludis* (PDB.ID 2PJP)<sup>88</sup> e o elemento SECIS de *Moorella thermoacetica* (PDB.ID 2PLY)<sup>108</sup> foram determinadas por cristalografia de proteínas, sendo construções truncadas que apresentam

30% de identidade ao domínio C-terminal de SelB de *E. coli*. Através da estrutura obtida por crio-microscopia eletrônica foi possível notar a extrema flexibilidade do domínio C-terminal<sup>72</sup> e que as mudanças conformacionais são intrinsecamente dependentes da presença de GTP.<sup>87</sup> Esses estudos estruturais mostram a existência de uma região flexível que interconecta as porções WHD2 e WHD3 proporcionando uma maior conformação de liberdade para o domínio composto pelas hélices WHD3 e WHD4, que por sua vez interagem com o elemento SECIS, enquanto os domínios WHD1 e WHD2 interagem com o ribossomo durante a tradução. Este reposicionamento pode ajustar SelB ao local de entrada relativo do ribossomo para diferentes mRNAs que codificam Sec.<sup>72</sup>

Ensaio de calorimetria de titulação isotérmica foram utilizados para o estudo da interação entre SelB e os nucleotídeos GTP, GDP e análogos não hidrolisáveis, permitindo a determinação de constantes de afinidades corroboradas com estudos de fluorescência relativa posteriormente. As constantes na faixa do baixo micromolar 0,7  $\mu\text{M}$  e 12  $\mu\text{M}$  para GTP e GDP, respectivamente, denotam a importância dessas moléculas energéticas para o processo de tradução.<sup>105,106</sup> Assim como outros EFs, SelB é GTP dependente para a entrega do tRNA aminoacilado na correta posição. Fluorescência relativa também foi utilizada para a determinação da interação com o tRNA<sup>Sec</sup> e, embora tenha sido possível a determinação de uma constante de afinidade aparente, não se determinou a estequiometria de ligação empiricamente<sup>105</sup> e nem existem indícios dos valores de constantes de dissociação dos demais complexos aos quais SelB participa durante a biossíntese de Sec.

Diferentemente dos demais EFs que reconhecem os braços aceptores e anticódon, SelB reconhece o dobramento '8+5' diferenciado da hélice acceptor-T $\Psi$ C, permitindo um reconhecimento específico a esses 13 nucleotídeos do Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, distinguindo-o dos demais tRNAs.<sup>67,109</sup> A estrutura obtida por crio-microscopia eletrônica em 2016 veio contribuir com os dados em solução indicando que o braço variável também é essencial para o reconhecimento específico.<sup>72,109</sup>

Uma vez o tRNA<sup>Sec</sup> não sendo amplamente abundante na célula,<sup>33</sup> os mecanismos de entrega e incorporação de Sec-tRNA<sup>Sec</sup> aos ribossomos devem ser sincronizados, e não simplesmente eventos aleatórios. Dessa maneira, é possível inferir que no decorrer da via de incorporação pode haver a interação entre Sela e SelB para a entrega de Sec-tRNA<sup>Sec</sup> (primeira etapa) e, posteriormente, a interação entre SelB.GTP.Sec-tRNA<sup>Sec</sup> com o ribossomo (segunda etapa), para a incorporação do aminoácido no polipeptídeo nascente, direcionado pelo reconhecimento do elemento SECIS. Esses eventos são dependentes de interações com GTP, na primeira etapa, e com o elemento SECIS, segunda etapa, já parcialmente

caracterizados na literatura.<sup>33,70,72-73,105-109</sup> A Figura 12 mostra os avanços das informações estruturais de SelB ao longo das últimas duas décadas e o estado da arte das informações envolvendo essa importante macromolécula. SelB foi amplamente estudada ao longo desse projeto a fim de caracterizar a formação de todos os complexos macromoleculares aos quais essa molécula é participante na via de biossíntese de Sec em *E. coli*, sendo um papel crucial para a bioquímica da célula dada a necessidade de elevada eficiência no processo de incorporação desse aminoácido.

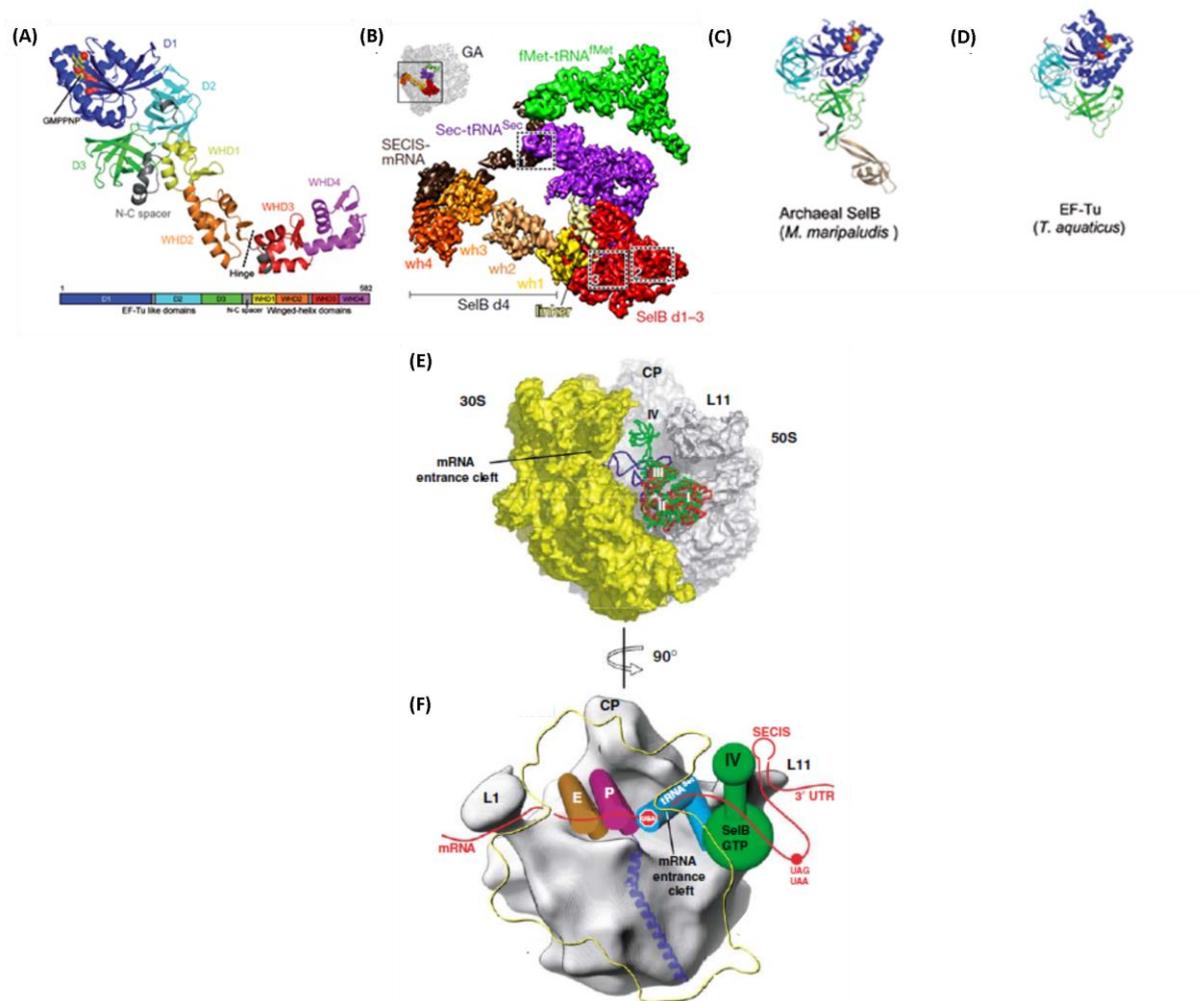


Figura 12 – Estruturas de fatores de elongação. (A) Representação da estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* indicando seus 3 domínios de ligação canônicos de EF-Tus e apresentando o domínio adicional presente apenas em bactérias. (B) Estrutura do complexo SelB.GDPNP-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> na presença do elemento SECIS resolvida por crio-microscopia eletrônica de transmissão (PDB ID: 5LZD). (C) Estrutura cristalográfica de SelB de *M. maripaludis*, uma arqueia (PDB ID: 4ACB). (D) Estrutura cristalográfica do EF canônico, EF-Tu de *T. aquaticus* (PDB ID: 1EFT). (E) Modelo proposto para interação de SelB junto ao ribossomo 70S de procaríotos e (F) EFSec ao ribossomo 80S eucariótico.  
 Fonte: Adaptada de FERNANDES.<sup>110</sup>

## 1.6 Os RNAs específicos para o reconhecimento da via de incorporação de Sec e o ribossomo

A via de biossíntese de Sec, assim como já apresentado anteriormente, possui macromoléculas responsáveis pelo reconhecimento específico e codificação de Sec, sendo eles o tRNA<sup>Sec</sup> e o elemento SECIS, possibilitando a incorporação diferenciada junto ao ribossomo. Devido a essas peculiaridades, serão separadamente apresentadas essas macromoléculas e suas características.

### 1.6.1 tRNA<sup>Sec</sup>

O tRNA de incorporação de Sec em bactérias é o maior encontrado nesse organismo, possuindo 95 nucleotídeos e um enovelamento único com 8 bases pareadas (pb) em seu braço aminoacil acceptor e 5 no braço T $\psi$ C,<sup>111</sup> o que resulta em um pareamento conhecido como ‘8+5’. Além disso, o tRNA<sup>Sec</sup> apresenta um longo braço variável contendo 22 nucleotídeos.<sup>112</sup> Apesar dos tRNAs do tipo II (tRNA<sup>Ser</sup> e tRNA<sup>Leu</sup>) também apresentarem braço variável extenso, esses tRNAs apresentam enovelamento canônico do tipo ‘7+5’.<sup>111-113</sup> O braço dihidrouridina (*D-loop*) é composto por 10 nucleotídeos, sendo 6 deles pareados no braço e 4 no *loop*, o que também diverge dos demais tRNAs onde esse pareamento é do tipo 3/4 no braço e 7/12 no *loop*. Por fim, o braço de decodificação (anticódon) possui uma trinca ACU, complementar ao códon de inserção de Sec, UGA [Figura 13]. Apesar de um enovelamento característico, estudos recentes mostraram que a flexibilidade da estrutura terciária do tRNA<sup>Sec</sup> é essencial para sua função e correta acomodação na interação junto aos complexos de interesse.<sup>72,93,111-113</sup> Essas diferenças estruturais indicam a potencial necessidade de divergência não somente na sequência (limitada por apenas 4 possibilidades de bases, à menos de edições nas moléculas de tRNAs) mas também no enovelamento para o reconhecimento da maquinaria de conversão Ser-Sec.

Como previamente publicado para *E. coli*, a enzima SerRS produz Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> através da interação e reconhecimento específicos do braço acceptor do tRNA<sup>Sec</sup>, onde haverá a aminoacilação no terminal CCA-OH3’, e também do braço variável, o que a difere de outras aminoacil-tRNA sintetase que usualmente reconhecem braços acceptor e anticódon.<sup>55</sup> A obtenção de Sec-tRNA<sup>Sec</sup> é realizada pela enzima SelA através do reconhecimento específico do braço acceptor (onde haverá a conversão Ser-Sec) e *D-loop*.<sup>93</sup> SelB, por sua vez, reconhece os braços acceptor, variável e T $\psi$ C para a correta acomodação junto ao sítio A do ribossomo<sup>72</sup> e

pareamento do anticódon com a sequência UGA presente no mRNA.<sup>72</sup> Portanto, todos os elementos estruturais do tRNA<sup>Sec</sup> possuem função de reconhecimento crucial para a biossíntese e incorporação de Sec. No entanto, não sendo plenamente caracterizados os mecanismos e constantes de tais interações nas formações dos complexos proteínas-RNA transiente dessa via bioquímica. Bem como já caracterizada as interações do tRNA<sup>Sec</sup> com outras proteínas da biossíntese de Sec, esse tRNA específico foi utilizado ao longo desse trabalho e será discutido sua especificidade com SelB e outros complexos formado nessa via bioquímica.

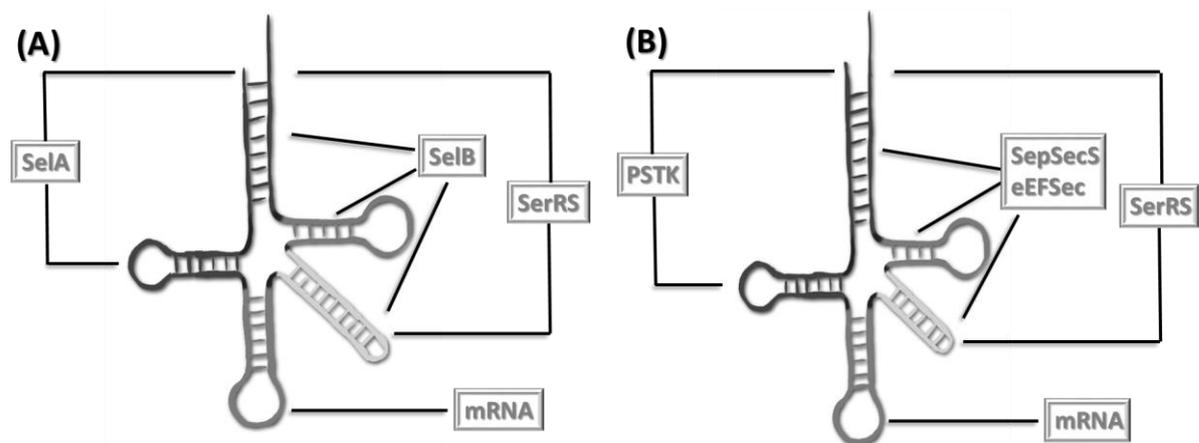


Figura 13 – Esquema 2D em forma de trevo representando as regiões de reconhecimento do tRNA<sup>Sec</sup>. (A) O tRNA<sup>Sec</sup> de bactérias apresenta o dobramento ‘8+5’ nos braços acceptor e TψC e variável longo. Os braços são reconhecidos pelas enzimas SerRS (acceptor + variável), SelA (acceptor + D-loop) e SelB (acceptor + TψC + variável), além do pareamento anticódon junto ao códon UGA-Sec presente no mRNA. (B) Por sua vez, o tRNA<sup>Sec</sup> dos demais organismos apresenta dobramento ‘9+4’ nos braços acceptor e TψC e variável não tão longo. Os braços são reconhecidos pelas enzimas SerRS (acceptor + variável), PSTK (acceptor + D-loop) além de SepSecS e EFSec (acceptor + TψC + variável), e o pareamento anticódon junto ao códon UGA-Sec presente no mRNA.

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>††</sup>

## 1.6.2 Elemento SECIS

Os elementos SECIS se diferenciam entre os domínios da vida, contudo todos possuem a mesma função de codificação UGA-Sec.<sup>114</sup> Como mencionado, o elemento SECIS consiste em um grampo (*hairpin*) estruturado em forma de alça e *loop*.<sup>64</sup> SECIS possui duas conformações biologicamente ativas possíveis. SECIS-form I é a forma canônica sendo composta por hélice I (localizada próxima ao códon UGA-SECIS); *loop* interno; SECIS *core*

<sup>††</sup> Em colaboração com a aluna de doutorado Ana Laura Lima (IFSC/USP).

(um pareamento do tipo não-Watson-Crick formada por laços assimétricos contendo A-G); hélice II (conservada em tamanho e posição) e *loop* apical que pode apresentar diferentes seqüências, formatos e posições para cada gene.<sup>64</sup> SECIS-*form* II se diferencia pela presença de uma hélice III extra, deslocando a alça apical e gerando uma alça interna (Figura 14).<sup>64,114</sup>

O elemento SECIS de *E. coli* contém pelo menos 40 nucleotídeos que formam uma alça na estrutura do mRNA, contudo, apenas os 17 pb na região superior da estrutura de alça são suficientes para permitir a incorporação de Sec. Em bactérias, o SECIS está imediatamente após ao UGA-Sec e a alça apical, responsável pelo reconhecimento da WHD4 de SelB, dista 11 nucleotídeos da posição de codificação de Sec.<sup>115-116</sup>

Já em eucariotos, SECIS está localizado na região 3'UTR (região não codificante no 3' do mRNA), dobrando-se sobre o UGA-Sec códon com o auxílio da SBP2 e, o tamanho das alças são extremamente variáveis para cada gene codificante para selenoproteínas.<sup>117</sup> Como EFSec não reconhece diretamente o SECIS, hipóteses de regiões de reconhecimento pela SBP2 vem sendo analisadas, onde o pareamento não Watson-Crick contido no início da hélice II tem se mostrado com os resultados mais interessantes através de análises de ensaios de mobilidade eletroforética nativa para diferentes mutantes de SECIS.<sup>118</sup> Apesar da existência de elementos SECIS em arqueias, o assunto ainda não é amplamente compreendido dada a ausência de proteínas reconhecedoras desse elemento estrutural do mRNA.<sup>119</sup>

Um questionamento ainda não solucionado, em bactérias, consiste no processo de despareamento e repareamento das bases de SECIS enquanto o ribossomo, eventualmente um polissomo, está em processo de tradução. A forma como o ribossomo deve necessariamente desestruturar o elemento SECIS, o mecanismo de novo reconhecimento e remontagem do SECIS e as proteínas interagentes ainda são questões que não foram completamente elucidadas. Esses questionamentos já não se aplicam às arqueias e eucariotos, uma vez que a distância do elemento SECIS ao UGA-Sec códon permite que se dobre sobre a posição correta com o auxílio da maquinaria (EFSec e SBP2).<sup>33,119</sup>

A construção do elemento SECIS bacteriano para tiorredoxina, uma selenoproteína, foi utilizada ao longo desse trabalho e será discutida sua especificidade com SelB para a formação dos complexos macromoleculares na presença do ribossomo e do tRNA específico.

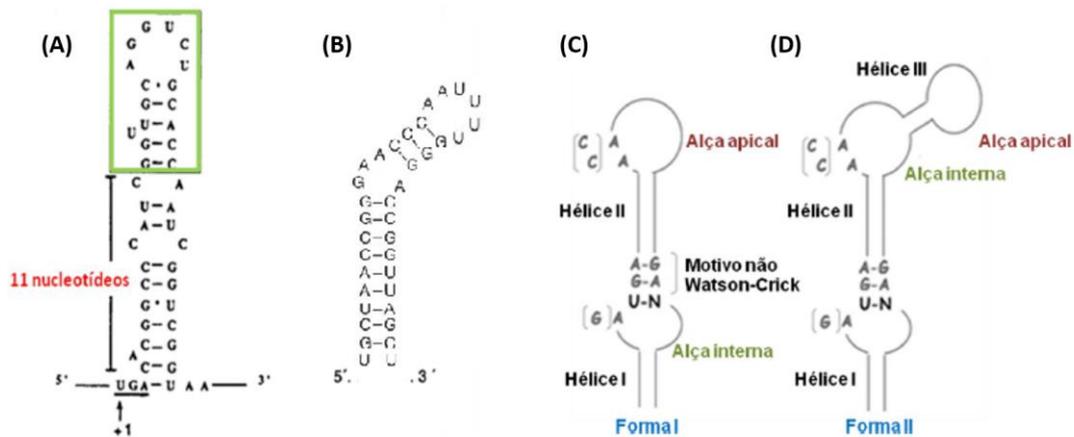


Figura 14 – Comparação entre as diferenças estruturais do elemento SECIS. (A) SECIS para bactérias (*E. coli*) localizado logo após o códon UGA-Sec. Delimitado pelo retângulo em verde encontra-se a região reconhecida pela proteína SelB a exatamente 11 nucleotídeos do códon UGA. (B) SECIS para arqueias (*M. jannaschii*) localizado na região 3'-UTR a aproximadamente 25 nucleotídeos do códon UGA. (C) e (D) SECIS para eucariotos superiores em que respectivamente é ilustrada as formas I e II.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

### 1.6.3 O ribossomo

O ribossomo é um heterocomplexo constituído por proteínas e RNAs ribossomais (rRNAs) composto principalmente por duas subunidades (50S & 30S em procarionotos e 60S & 40S em eucariotos) formando os ribossomos 70S e 80S, respectivamente.<sup>86</sup> O ribossomo possui 3 sítios com funções específicas, o sítio de aminoacil (sítio A, ou sítio de entrada) que é o responsável por acomodar tRNA aminoacilado pareado com seu códon complementar do mRNA. O sítio peptidil (sítio P, ou sítio de processamento), responsável por posicionar o tRNA junto a cadeia polipeptídica nascente e o sítio de saída (sítio E) ocupado pelo tRNA sem o seu aminoácido, sendo liberado do complexo ribossomal.<sup>86</sup>

A iniciação da tradução envolve a ligação da subunidade ribossomal pequena (30S em *E. coli*) à extremidade 5' do mRNA com o auxílio de fatores de iniciação, IF.<sup>120</sup> A incorporação de aminoácidos se inicia quando o aminoacil-tRNA se liga ao seu correspondente códon no mRNA no sítio A ribossomal.<sup>2,86,120</sup> Assim, é formada uma ligação peptídica entre o aminoácido do tRNA no sítio A e o aminoácido do tRNA carregado presente no sítio subsequente, sítio P.<sup>2,86,120</sup> A cadeia polipeptídica crescente é transferida para o tRNA presente no sítio A e, em seguida, ocorre a translocação ribossômica, transferindo o tRNA não carregado no sítio P para o sítio E.<sup>2,86,120</sup> O aminoacil-tRNA que está presente no sítio A, carregado com a cadeia polipeptídica, é então movido para o sítio P e o tRNA presente no

sítio E é liberado do complexo, permitindo assim a entrada de outro aminoacil-tRNA no sítio A para reiniciar o processo.<sup>2,86,120</sup> A energia necessária para este processo é proporcionada por hidrólise de GTP ligada a fatores de alongação, especificamente os EF-G em procariotos.<sup>2,120</sup> A terminação da síntese do polipeptídeo ocorre quando o sítio A pareia-se com um dos três diferentes códons de parada de tradução (UAA, UAG ou UGA).<sup>2,86</sup>

A entrega dos aminoacil-tRNAs no sítio A do ribossomo envolve uma classe de proteínas chamada Fatores de Elongação, previamente introduzidos na seção 1.5.<sup>27</sup> Em procariotos, existem três fatores de alongação conhecidos: EF-Tu, responsável pela mediação da entrada do aminoacil-tRNA em um sítio A livre; EF-Ts que fornecem o fator de troca de nucleotídeos de guanina (GTP) para EF-Tu e o EF-G envolvido na translocação do tRNA e mRNA no processo de alongação.<sup>2,27,86,120</sup> Além da complexa maquinaria que o ribossomo denota, algumas subunidades dessa macromolécula se destacam pela sua importância na aquisição do aminoacil-tRNA, como por exemplo a subunidade ribossomal L11 responsável pelo reconhecimento da molécula de GTP ativado presente nos sítios ativos dos EFs e permitindo a interação EF.tRNA.ribossomo.<sup>86,120</sup>

Apesar de serem muito semelhantes, os fatores de alongação apresentam algumas diferenças. O fator eucariótico eEF-1 apresenta duas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ , onde a subunidade  $\alpha$  equivale à EF-Tu e a subunidade  $\beta\gamma$  à EF-Ts em procariotos.<sup>27</sup> O segundo fator de alongação, eEF-2 é o equivalente ao EF-G procariótico.<sup>2,27</sup> Algumas estruturas EFs foram resolvidas recentemente, algumas das quais são complexos ribossomo-EFs,<sup>2,27,72,120</sup> incluindo o complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS, o que ajuda a elucidar a interação de EFs em tradução e no processo de incorporação de Sec em selenoproteínas. A figura 15 ilustra a comparação entre o ribossomo 70S e 80S dos organismos procarióticos e eucarióticos, respectivamente e também mostra estruturas de complexos ribossomo.EFs recentemente obtidas.

O ribossomo de *E. coli* também foi utilizado ao longo desse trabalho e será discutida sua especificidade com SelB para a formação dos complexos macromoleculares na entrega do tRNA<sup>Sec</sup>.

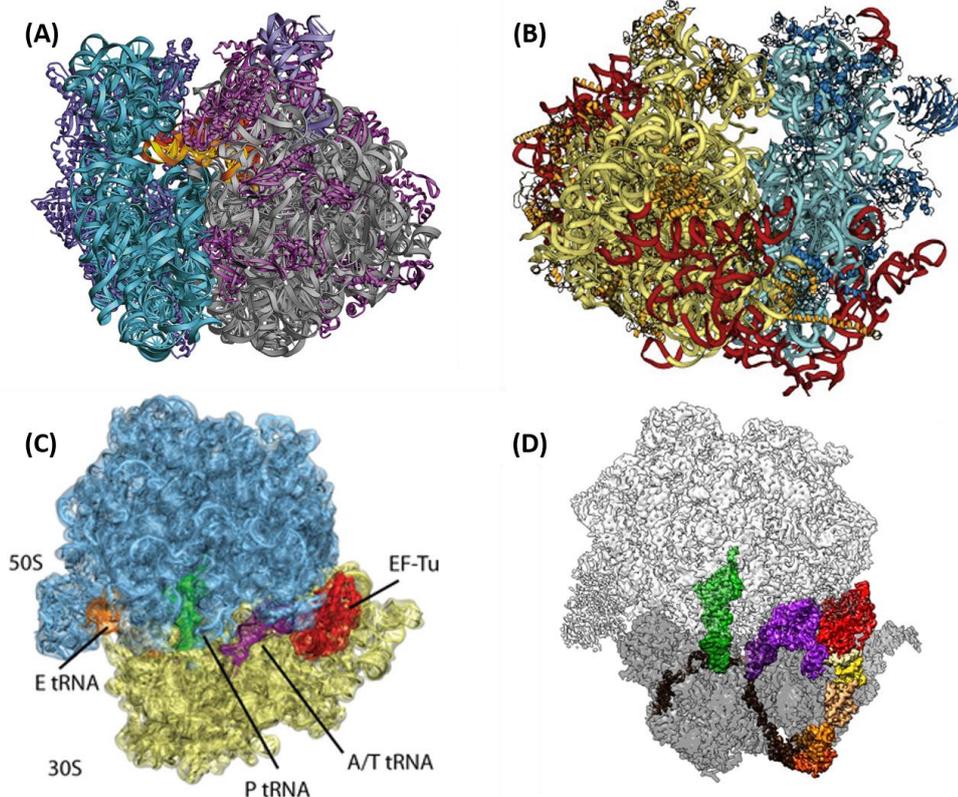


Figura 15 – Modelos estruturais dos complexos ribossomais. (A) Estrutura tridimensional do ribossomo 70S de procariotos obtida por cristalografia de proteínas.<sup>27</sup> (B) Estrutura tridimensional do ribossomo 80S de eucariotos obtida por cristalografia de proteínas.<sup>27</sup> (C) Complexo ribossomo.EF-Tu.tRNA<sup>Met</sup> evidenciando a formação de estruturas macromoleculares durante a síntese de proteínas obtida por Cryo-EM.<sup>86,120</sup> (D) Complexo ribossomo.SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS por Cryo-EM.<sup>72</sup>

Fonte: Adaptada de NELSON; COX.<sup>27</sup>; FISCHER et al.<sup>72</sup>; RODNINA; WINTERMEYER.<sup>86,120</sup>

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar as interações macromoleculares da via de biossíntese de Sec em *E. coli*, sobretudo, as interações envolvendo o tRNA<sup>Sec</sup> específico, o complexo homodecamérico Sela, o fator de alongação específico SelB, o elemento de codificação para o códon UGA-Sec (SECIS) e o ribossomo. Modelos *in silico* foram gerados para uma compreensão dos complexos macromoleculares analisados. Experimentalmente, análises de interação proteína-proteína e proteína-RNA foram realizadas através de técnicas espectroscópicas como fluorescência intrínseca, anisotropia de fluorescência e dicroísmo circular além de técnicas microcalorimétricas. Estudos em solução como ultracentrifugação analítica e mobilidade eletroforética nativa também foram utilizados

visando contribuir com os dados provindos das demais metodologias utilizadas. Técnicas estruturais como espalhamento de raios-X a baixo ângulo, microscopia eletrônica de transmissão e cristalografia de proteínas foram aplicadas para os complexos estudados. Por fim, estudos *in vivo* de complementação funcional e ensaios de interação através da técnica de duplo-híbrido dirigido foram realizados. Os resultados obtidos contribuem diretamente com o conhecimento de complexos macromoleculares de interação proteína-proteína e proteína-RNA, auxiliando a compreensão do interactoma celular e fortalecendo o entendimento da via de biossíntese e incorporação de Sec em bactérias, fundamental para a plena identificação dos mecanismos celulares de detoxificação.

*Capítulo II*  
**OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS**

*"Se você não está disposto a arriscar, esteja disposto a uma vida comum."*

**Emanuel James "Jim" Rohn**

17 de Setembro de 1930 – 05 de Dezembro de 2009

Empreendedor



## 2.1 Objetivos gerais

Este projeto teve como objetivo principal estabelecer um novo protocolo que proporcionasse um maior rendimento na obtenção de SelB de *Escherichia coli*, bem como estudos estruturais e determinação das interações macromoleculares às quais essa molécula é participante da via de biossíntese de Sec. Além disso, estudos envolvendo o complexo homodecamérico SelA do mesmo organismo foram realizados *in vivo* e *in vitro* para compreensão de seus domínios assim como a estrutura dos complexos transientes aos quais essa macromolécula participa.

### 2.1.1 Determinação de novo protocolo de obtenção do fator de alongação específico para incorporação de Sec (SelB) bem como a determinação da presença de moléculas endógenas

O rendimento na purificação de SelB era aproximadamente de 0,2 mg para cada litro de cultura<sup>107</sup> e não foi descrito a presença de nucleotídeos ou RNAs endógenos copurificados. Medidas de absorvância em 253 nm utilizando sonda específica para RNA e cromatografia líquida de alta *performance* foram aplicados para a determinação da presença e quantificação dessas moléculas endógenas. Mediante a esses resultados um novo protocolo de purificação foi empregado, bem como comparações de rendimento ou da presença de moléculas endógenas copurificadas entre diferentes cepas de *E. coli*.

### 2.1.2 Caracterização das interações dos complexos moleculares formados nas etapas finais da via de incorporação de Sec em *E. coli*

A via de biossíntese de Sec é extremamente específica e possui elevada taxa de incorporação em situações de estresse oxidativo.<sup>60</sup> Os complexos foram analisados através de técnicas biofísicas como fluorescência intrínseca dos resíduos aromáticos, anisotropia de fluorescência, ultracentrifugação analítica, mobilidade eletroforética em gel de agarose e medidas microcalorimétricas.

### 2.1.3 Obtenção de modelos estruturais dos complexos macromoleculares responsáveis pela etapa de conversão Ser-Sec e entrega do tRNA<sup>Sec</sup>

No início deste projeto de doutorado havia somente estudos estruturais de SelB de arqueias e de construções truncadas de SelB de bactérias.<sup>69,71,108</sup> Além disso, não havia estudos estruturais conclusivos de Sela e dos complexos aos quais essa molécula participava.<sup>60,93-98</sup> Portanto, estudos estruturais de SelB *in silico* foram realizados para inferir a estrutura dos complexos SelB dependentes e, além disso, foram realizados experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo juntamente com ensaios de cristalização dos complexos de SelB. A fim de corroborar com esses dados, o mapeamento da superfície de interação dos complexos foi realizada por análise de espectrometria de massas com troca hidrogênio/deutério e as mudanças conformacionais através de espectros de infra-vermelho. Somado a isso, estudos dos complexos transientes de Sela foram realizados por criomicroscopia eletrônica de transmissão, técnica atual para a obtenção de modelos de alta resolução.

### 2.1.4 Realização de análises *in vivo* para a determinação da importância do domínio N-terminal de Sela e para as interações dos complexos da via de incorporação de Sec

Uma vez que ensaios *in vivo* em sistema bacterianos são complicados de serem realizados, foram propostos experimentos de complementação funcional para a determinação da função do domínio N-terminal de Sela. Além disso, experimentos de duplo-híbrido dirigidos foram realizados para a determinação das interações macromoleculares das proteínas pertencentes à via de biossíntese de Sec em *E. coli*.

## 2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer novo protocolo de expressão e purificação de SelB de *E. coli*;
- Quantificar a presença das moléculas endógenas: RNAs através de absorvância específica (Qubit) e nucleotídeos por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC);
- Comparar o rendimento da expressão de SelB entre as cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460 por meio de dicroísmo circular (CD) e fluorescência intrínseca dos

- resíduos aromáticos (IFS) para a determinação de um novo protocolo de expressão;
- Analisar a interação e formação dos complexos macromoleculares utilizando Fluorescência Intrínseca (IFS), Anisotropia de Fluorescência (FAS), Ultracentrifugação Analítica (AUC), mobilidade eletroforética, além de técnicas microcalorimétricas, como calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e calorimetria de varredura diferencial (DSC);
  - Realizar ensaios de cristalização e tentativas de difração;
  - Realizar o preparo de grades em condições de contraste negativo para Microscopia Eletrônica de Transmissão (NS-EM). Com esse conjunto de dados, realizar análise de partícula isolada atrelada à análise estatística multivariada;
  - Construir um modelo teórico, através de ferramentas de bioinformática, dos complexos;
  - Analisar a veracidade das interfaces de contato através da metodologia de espectrometria de massas com troca hidrogênio-deutério (HDX);
  - Comprovar a movimentação das estruturas secundárias em solução por espectroscopia de infra-vermelho (FTIR);
  - Realizar coleta de dados e resolução estrutural dos complexos transientes, em preparo criogênico, em microscópio de alta resolução. Esta etapa foi realizada no período de doutorado sanduíche no Netherland Centre of Electron Nanoscopy (NeCEN) da *Universiteit Leiden* (Holanda);
  - Verificar a importância do domínio N-terminal de Sela para a atividade através de ensaios de complementação funcional realizados *in vivo*;
  - Determinar as interações da via de biossíntese de Sec de *E. coli* através de experimentos de duplo-híbrido dirigido em *S. cerevisiae*.



*Capítulo III*  
*TÉCNICAS E MÉTODOS UTILIZADOS*

*"Descobri que, quanto mais eu trabalho, mais sorte eu pareço ter."*

**Thomas Jefferson**

13 de Abril de 1743 – 04 de Julho de 1826

3º Presidente norte-americano



O objetivo desse capítulo é o esclarecimento simples e objetivo das técnicas e metodologias utilizadas no decorrer deste projeto de doutorado.

Todos os experimentos da interação com a proteína SelB foram realizados em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes durante sua iniciação científica e, posteriormente, ao longo de seu projeto de mestrado. Os experimentos também contaram com a participação da aluna de mestrado Jéssica Fernandes Scortecci. Além destes, este projeto contou com a colaboração de vários pesquisadores de diferentes centros, que estão mencionados em cada sub-tópico deste capítulo, denotando suas importantes contribuições e auxílios no *design* experimental, realização das medidas e ajuda no tratamento e interpretação dos dados a fim de obter uma resposta biológica plausível.

### **3.1 Análises *in silico*: construção de um modelo estrutural e compreensão dos complexos formados**

No início desse projeto não havia informações estruturais relevantes sobre SelB de *E. coli*, a menos de estruturas das WHDs 3 e 4 truncadas e resolvidas por cristalografia de proteínas.<sup>69,71</sup> Por conta disso, estudos *in silico* para obtenção de um modelo estrutural de SelB foram realizados.

#### **3.1.1 Modelo estrutural de SelB de *E. coli***

Inicialmente, a sequência de SelB da cepa *E. coli* K-12 (W3110) (GI# 388479650 / YP# 491844.1), contida no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) codificante para 614 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 68867,4 Da, foi utilizada na busca por sequências de proteínas homólogas cujas estruturas já foram obtidas por métodos experimentais. A ferramenta Protein BLAST (NCBI) foi utilizada para encontrar uma estrutura molde analisando o banco de dados de estruturas de proteínas (PDB – *Protein Data Bank*).

Inicialmente, na ausência de um modelo tridimensional obtido experimentalmente que houvesse cobertura elevada da sequência de interesse, foi realizada uma busca por possíveis estruturas homólogas que serviriam de molde para a construção de um modelo estrutural para SelB. A busca utilizando BLASTp contra o PDB resultou em diferentes domínios conservados como descrito anteriormente. Com isso, utilizou-se as sequências truncadas para cada um dos domínios de SelB (domínio N-terminal GTPase e domínio C-terminal – reconhecimento ao

SECIS).

Para o domínio N-terminal, foi utilizada a plataforma I-TASSER<sup>121</sup> empregando como molde a estrutura do fator de alongação EF-Tu de *Escherichia coli* (PDB ID 1DG1). Já o domínio C-terminal, que possui estrutura parcialmente resolvida, foi utilizado o programa MODELLER 9.0<sup>122</sup> com o molde da estrutura cristalográfica desse domínio de SelB de *E. coli* (PDB ID 2UWM). Ambos os modelos foram fusionados e validados utilizando o servidor MOLPROBITY.<sup>123</sup>

Posteriormente, a estrutura cristalográfica de uma proteína homóloga foi resolvida (PDB. ID 4ZU9).<sup>70</sup> Assim, as coordenadas dessa molécula foram utilizadas como molde para a construção do modelo através da submissão da sequência de SelB de *E. coli* ao servidor I-TASSER.<sup>121</sup>

Os modelos gerados foram separados em clusters baseados nas restrições espaciais dos modelos com maior homologia à sequência inteira (podendo ser utilizado um único modelo e, neste caso, a estrutura cristalográfica de SelB de *Aquifex aeolicus* – PDB ID. 4ZU9 foi utilizada como molécula molde) e os modelos com o melhores (menores) valores energéticos foram otimizados e ranqueados. O modelo estrutural de SelB de *E. coli* selecionado foi o que apresentou menores valores de energia e rmsd (*root-mean-square deviation*) quando sobreposto com a molécula molde.

O modelo estrutural obtido foi submetido às análises do Molprobability<sup>123</sup> para sua validação. Sua visualização foi realizada nos softwares Pymol 1.3 (Schrödinger) e Chimera 1.5.3.<sup>124</sup> Além disso, o modelo gerado foi comparado com o modelo estrutural obtido através dos fragmentos dos domínios de SelB inicialmente.

### 3.1.2 Docking para formação dos modelos dos complexos macromoleculares

Uma vez obtido e validado o modelo estrutural de SelB, os modelos estruturais dos complexos macromoleculares aos quais SelB é participante também foram gerados através de análises *in silico* utilizando sobreposição e alinhamento tridimensional com estruturas obtidas por métodos experimentais. O modelo estrutural de SelB provindo da modelagem utilizando a estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* (PDB.ID 4ZU9) foi escolhido para as análises comparativas.

Inicialmente, o modelo estrutural de SelB foi alinhado tridimensionalmente, através do domínio N-terminal, com a estrutura cristalográfica do EF-Tu bacteriano (PDB. ID 1ETU). Posteriormente, dada a semelhança desse domínio N-terminal, as estruturas de SelB de

arquêia (PDB.IDs 4AC9 e 4ACB) foram alinhadas, permitindo uma análise do posicionamento dos domínios WHD 2 e 3. Analogamente, a recente estrutura de eEFSec humano (PDB.ID 5IZK) foi alinhada através do domínio N-terminal. A título de comparação, outras duas estruturas de EFs foram alinhadas (PDB.IDs 3FIC e 1MJ1), sendo que ambas as estruturas foram resolvidas em complexo com as subunidades ribossomais. Além disso, o fator de terminação (*release factor*, PDB.ID 2WRI) também foi alinhado junto a esse domínio.

Por sua vez, o domínio C-terminal, responsável pela interação ao elemento SECIS, possui estrutura cristalográfica, em complexo com um fragmento do *loop*-apical, resolvida por um truncamento no resíduo F487 (PDB.ID 2PJP). Esta estrutura foi alinhada juntamente à WHD4 do modelo estrutural de SelB juntamente com o truncamento no resíduo D431 (PDB.ID 2UWM).

A estrutura obtida por crio-microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM) do ribossomo em complexo com o EF-Tu juntamente com o tRNA<sup>fMet</sup> (PDB.ID 1MJ1) permitiu inferir o posicionamento do tRNA no complexo EF.tRNA; com isso a estrutura do tRNA<sup>Sec</sup> (PDB.ID 3A3A) foi alinhada ao tRNA<sup>fMet</sup>, o que possibilitou determinar o posicionamento do tRNA<sup>Sec</sup> junto à SelB através da comparação das sobreposições.

Por fim, o complexo ribossomal bacteriano (PDB.IDs 2WRI – 30S e 2WRJ – 50S) foi utilizado como molde para a sobreposição do modelo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS, empregando como referência o posicionamento tridimensional do complexo EF-Tu.tRNA<sup>fMet</sup> no sítio A do ribossomo. Esses modelos de interação permitiram inferir importantes posições de interação, tanto no tRNA<sup>Sec</sup> como em SelB, que foram elucidadas posteriormente por meio experimental ao longo desse projeto de doutorado, do projeto de mestrado do aluno Adriano de Freitas Fernandes e, mais recentemente, através da estrutura por Cryo-EM do complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> em diferentes estados conformacionais na entrega de Sec ao sítio A do ribossomo (PDB.IDs 5LZF, 5LZE, 5LZD, 5LZC, 5LZB e 5LZA).

### 3.2 Expressão e purificação das amostras proteicas de interesse

Ao longo desse projeto, as proteínas Sela e SelB foram purificadas utilizando protocolos previamente descritos,<sup>94,100-104</sup> apenas com otimizações em algumas etapas a fim de aumentar o rendimento do processo de purificação. Além disso, outras amostras utilizadas de maneiras pontuais nesse projeto, como SelD e CsdB, ambas proteínas da via de biossíntese de Sec em *E. coli* foram cedidas gentilmente pela aluna de mestrado Jéssica Fernandes

Scortecci para experimentos de interação por medidas de espectroscopia de anisotropia de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão. Portanto, os protocolos de obtenção dessas amostras não serão descritos neste tópico.

### 3.2.1 Homodecâmero Sela

O complexo homodecamérico Sela de *E. coli* é alvo de estudos no grupo do Prof. Dr. Otavio Thiemann desde 2005, como já mencionado, e teve seu protocolo de expressão e purificação estabelecido pela Dra Lívia Regina Manzine.<sup>94</sup>

Brevemente, a construção *selA*-pET29a(+), cuja marca de seleção foi trocada para ampicilina, foi transformada em cepa *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ -DE3). Essa cepa possui marca de seleção canamicina e é uma cepa bacteriana *selC* (-), portanto, não produz o tRNA<sup>Sec</sup>,<sup>94,104</sup> o que possibilita a purificação da amostra Sela livre da contaminação de tRNA<sup>Sec</sup> endógeno como já descrito em trabalhos anteriores.<sup>94-95,104</sup>

Inóculos de 10 mL de meio LB contendo canamicina (30  $\mu$ g/mL) e ampicilina (25  $\mu$ g/mL) foram incubados por 16 h à 37 °C sob contínua agitação de 80 rpm. Posteriormente, foi realizada a ampliação de escala de 1:100 em volume na presença da mesma concentração de antibióticos utilizados. Prosseguiu-se com crescimento celular à 37 °C, 150 rpm por aproximadamente 3 h até a densidade óptica (D.O.<sub>600nm</sub>) de 1,0 quando 0,1 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo) foi adicionado e a indução foi conduzida por mais 2 horas nessa mesma temperatura e agitação. As células foram centrifugadas à 4.500 rpm por 45 min a 4 °C.

Para a lise celular, as células foram ressuspensas em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5 contendo 10  $\mu$ M piridoxal 5' fosfato (PLP, Sigma-Aldrich), uma vez que Sela é uma enzima PLP-dependente. Adicionou-se lisozima [10  $\mu$ g/mL] mantendo incubado por 30 min em gelo e, posteriormente, a lise foi concluída utilizando pulsos de ultrassom (20 s de duração, espaçados por um intervalo de tempo de 45 s por 5 min). O extrato celular foi centrifugado à 13.500 rpm por 45 min a 4 °C para a obtenção do extrato proteico bruto.

A primeira etapa de purificação utilizada foi a precipitação pelo método de *salting-out*. O extrato proteico bruto foi colocado em um béquer em banho de gelo e mantido sob agitação constante de aproximadamente 60 rpm. Adicionou-se lentamente sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) macerado, que promove a precipitação seletiva de proteínas, até atingir concentração máxima de 25% (m/v) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por volume de extrato proteico, permanecendo por 15 min sob agitação branda seguido de nova etapa de centrifugação à

13.500 rpm por 45 min à 4 °C.

O precipitado proteico foi então ressuspenso em tampão de lise (20 mM de fosfato de potássio pH 7,5) e aplicado na coluna *HiTrap Desalting* (GE) acoplada em sistema de cromatografia líquida (ÄKTA-GE) para a retirada do excesso de sulfato de amônio utilizado para precipitação. Às frações obtidas da amostra, adicionou-se 20% (m/v) de Nycodenz® preparado em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5. Esse composto orgânico está relacionado à preservação da forma e conformação oligomérica em técnicas de ultracentrifugação de células e complexos macromoleculares em análises de sedimentação.<sup>125</sup> Após 30 min de incubação em gelo, a amostra foi submetida à centrifugação em concentrador Amicon, com corte de 100 kDa, a 3100 rpm até atingir, aproximadamente, volume final de 1 mL para então ser submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 HL* (16/60). As frações foram coletadas e submetidas à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para verificação da presença da proteína recombinante de interesse. Ao final, adicionou-se volume necessário para uma concentração de 10% de glicerol às alíquotas de SelA recombinante.

### 3.2.2 O fator de alongação específico, SelB, estabelecimento de um novo protocolo

A expressão e purificação do fator de alongação específico para incorporação de Sec em *E. coli* (SelB) vem sendo descrita desde os anos 1990,<sup>66</sup> porém apresentando rendimento de aproximadamente 0,2 mg por litro de cultura.<sup>107</sup>

Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes, um novo protocolo de expressão e purificação de SelB foi padronizado, proporcionando uma maior efetividade no processo de purificação e garantindo um aumento significativo no rendimento proteico, cerca de 2 mg por litro de cultura.

O gene *selB* de *E. coli* clonado no vetor de expressão pT7-6 (pT7-6 SelBH6) foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marina Rodnina (*Department of Physical Biochemistry - Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Alemanha*). Essa construção possui ampicilina como marca de seleção e promotor T7, além da adição de uma cauda de hexa-histidina na porção C-terminal da proteína sem sítio de clivagem entre a sequência polipeptídica de SelB e a cauda utilizada para a cromatografia de afinidade. Essa construção foi utilizada em trabalhos prévios<sup>105-106</sup> e foi inicialmente transformada em cepas de *E. coli* DH5- $\alpha$  para a propagação e aumento da quantidade de plasmídeo para os passos subsequentes.

As transformações foram realizadas em cepas de expressão *E. coli* BL21 ( $\lambda$ -DE3) e *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ -DE3), como já mencionado esta última é uma cepa deficiente no gene *selC*, portanto não produzindo o tRNA<sup>Sec</sup> endógeno que poderia ser eventualmente copurificado com a amostra de interesse. A escolha da cepa *E. coli* WL81460 provém da necessidade de elucidar a especificidade entre o tRNA<sup>Sec</sup> aos demais componentes da via de incorporação de Sec.

Uma vez confirmada a presença do gene de interesse ligado ao vetor de expressão através da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene *selB* de *E. coli* seguido de sequenciamento, prosseguiu-se às etapas de expressão da proteína SelB. Inóculos de 10 mL de meio LB contendo canamicina (30  $\mu$ g/mL) e ampicilina (25  $\mu$ g/mL) para a cepa *E. coli* WL81460 e somente ampicilina para *E. coli* BL21 devidamente transformadas com pT7-6 SelBH6, foram incubados por 16 h à 37 °C sob contínua agitação de 80 rpm. Posteriormente, aumentou-se a escala de 1:100 em volume de cultura e procedeu-se com crescimento sob agitação em 150 rpm, 37 °C por aproximadamente 6 h, contendo os mesmos antibióticos previamente descritos, até se atingir a densidade óptica (D.O.<sub>600nm</sub>) de 1,0. Nesta etapa, iniciou-se a indução através da adição de 0,1 mM de IPTG e mantendo agitação e temperatura por 3 h. Por fim, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm, 4 °C, por 45 minutos.

As células foram ressuspensas em tampão A (200 mM ácido bórico pH 7,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>), seguido por centrifugação a 13.500 rpm, 4 °C por 45 min. Após esta etapa de lavagem, o precipitado foi novamente ressuspensa agora com tampão B (200 mM ácido bórico; 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 200  $\mu$ g/mL PMSF).

A lise celular foi realizada por meio da adição de lisozima [10  $\mu$ g/mL] juntamente com a utilização de pulsos de ultrassom (20 s de duração, espaçados por um intervalo de tempo de 45 s por 2,5 min). Então o lisado foi submetido à centrifugação a 13.500 rpm, 4 °C por 45 min, obtendo-se assim os extratos proteicos brutos.

Após um passo de filtração do extrato bruto em filtros de 0,22  $\mu$ m, a purificação de SelB foi realizada em coluna de afinidade onde havia previamente depositado 3 mL de resina carregadas com íons cobalto (Co<sup>2+</sup>) (Talon). A resina foi lavada com cerca de 10 volumes de coluna de tampão C (200 mM ácido bórico; 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 200  $\mu$ g/mL PMSF; 10 mM imidazol) e a amostra foi eluída com a utilização de 4 volumes de coluna de tampão D (200 mM ácido bórico; 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 200  $\mu$ g/mL PMSF; 100 mM imidazol).

A amostra foi submetida a um tratamento adicional pela adição de RNase A (Thermo-

Fisher). Para a completa degradação do RNA endógeno que eventualmente poderia ser copurificado, adicionou-se RNase A [1 µg/mL] na amostra eluída da cromatografia de afinidade. Após o processo de degradação do RNA endógeno, a amostra foi concentrada em concentradores Amicon (corte de 50 kDa) seguida de diálise em tampão E (100 mM fosfato de potássio pH 7,0; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 5 mM MgSO<sub>4</sub>). Por fim, a amostra foi concentrada até o volume de 500 µL para a injeção no sistema ÄKTA onde foi submetida à cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna *Superdex 75 10/30* (GE) previamente equilibrada com tampão E. As frações obtidas para cada passo da purificação foram submetidas em gel desnaturante de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) para o acompanhamento das etapas de purificação e análise do grau de pureza da amostra.

### **3.2.2.1 Confirmação da amostra de interesse por espectrometria de massas**

Os ensaios de espectrometria de massas foram realizados em colaboração com o Dr. Edson Crusca do Grupo de Biofísica Molecular “Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas (IFSC-USP)” através da análise de *fingerprint* da amostra em gel desnaturante e a utilização de um espectrômetro micrOTOF-QII (Bruker Daltonics) acoplado à coluna Acclaim PepMap® RSLC, 75 µm x 150 mm, C18, 2 µm, 100 Å (cod. 164534).

Para este experimento, a fração contendo a amostra de interesse foi recortada do gel de poliacrilamida 15% e descorada com 50% metanol e 2,5% ácido acético. Esta solução foi retirada do gel e então foi realizada a desidratação com adição de 100% acetonitrila. Após a remoção desta solução, a amostra foi evaporada e 10 mM de DTT foram adicionados. Em seguida foi realizada 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 (Sigma-Aldrich) seguido da injeção no equipamento para análises dos fragmentos obtidos e identificação da sequência de SelB de *E. coli*.

### **3.2.2.2 Confirmação da amostra de interesse por *western blot***

A técnica de *western blot* (WB) foi utilizada para a confirmação de que as amostras presentes em gel SDS-PAGE 15% correspondiam à amostra de interesse. Ao final da purificação, a proteína SelB fusionada à cauda de hexa-histidina foi submetida à visualização por *western blot* com anticorpos comerciais específicos para a cauda de histidina, His-TAG (Sigma-Aldrich).

Juntamente com a aluna Jéssica Fernandes Scortecci, o protocolo de WB para as amostras purificadas contendo His-TAG foi estabelecido. As amostras presentes no gel SDS-PAGE 15% foram inicialmente transferidas para uma membrana de nitrocelulose por meio do equipamento Trans-Blot Transfer System Turbo (Bio-Rad Laboratories) por 30 min, 20 V, 2.5 A. Em seguida, a membrana foi corada com *Ponceau* 1% por 2 min e descorada com água destilada. Uma vez descorada, a membrana foi submetida ao passo de bloqueio utilizando solução salina tamponada de fosfato com Tween (PBST) + 5% de leite seco à temperatura ambiente sob leve agitação durante 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra a *His-TAG* (Sigma), (1:3000 mouse monoclonal) em PBST com 1% de leite em pó por 2 h e, posteriormente, lavada 3x com PSBT, sendo 8 min cada lavagem. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (Sigma, peroxidase IgG anti-mouse conjugado numa titulação de 1:5000) em PBST durante 1:30 h. A membrana foi novamente lavada com PBST e o complexo proteína-anticorpo conjugado com peroxidase foi então tratado com uma solução de luminescência quimiológica contendo 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 min e visualizado com o software/equipamento Image Studio Digits (Li-COR, Biosciences).

### 3.3 Obtenção dos RNAs: tRNA<sup>Sec</sup> e elemento SECIS

Diferentemente das amostras proteicas, os RNAs de *E. coli* estudados nesse projeto (tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS e tRNA<sup>Ala</sup>) foram obtidos através de reações em cadeia da polimerase utilizando *primers* que se sobrepunham resultando nos genes (*selC*, *secis* e *alaS*). Essas amplificações serviram de molde para as reações de transcrição *in vitro* por meio de kit comercial. Os detalhes são expressos nos itens a seguir.

#### 3.3.1 Amplificação dos genes *selc*, *secis* e *alaS*

O gene do tRNA específico para inserção de Sec (*selC*) de 95 pares de bases (pb) e um fragmento do RNA mensageiro sabidamente presente na formação do elemento estrutural em forma de grampo denominado elemento SECIS (39 pb), ambos de *Escherichia coli*, foram amplificados através de reação em cadeia da polimerase, ou PCR, a partir dos oligonucleotídeos complementares comercialmente sintetizados (Sigma-Aldrich):

*selC-forward*

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCT  
GGACTTCAAATCCAGTTG3'

*selC-reverse*

5'TGGCGGAAGATCACAGGAGTCGAACCTGCCCCGGGACCGCTGGCGGCCCAACT  
GGATTTGAAGTCCAG 3'

*secis-forward*

5'GCTAATACGACTCACTATAGGGAGCAGCAGGAUGAGGGC3'

*secis-reverse*

5'CTTGGCGGTGCAGACCTGCAACCGCCCTCATCCTGCTGC3'

Foi adicionada em ambas as sequências a região promotora para ligação da enzima T7 RNA polimerase (Thermo Fisher) o que permite a transcrição utilizando o DNA dupla-fita provindo da PCR. Além destes, foram desenhados oligonucleotídeos, representados abaixo, para a síntese do molde do tRNA carreador de alanina (tRNA<sup>Ala</sup>) de *E. coli* com a trinca TGC como anticódon (gene com 76 pares de bases, isoforma mais abundante em *E. coli* de acordo com o banco de dados *GtRNadb* (Baskin Engineering)). Este tRNA foi utilizado como controle negativo para as interações relacionadas ao tRNA<sup>Sec</sup>.

*alaS-forward*

5'TAATACGACTCACTATAGGGGATGTAGCTCAGATGGTAGAGCGCCCGCTTAGCAT  
GCG3'

*alaS-reverse*

5'TTGTGGAGAAGTTGGGTATCGATCCCAATACCTCCCGCATGCTAAGCGGGCGCTC  
3'

As amplificações dos DNAs moldes *selC* e *secis* além do gene codificante para o tRNA<sup>Ala</sup>, foram realizadas de acordo com o protocolo apresentado abaixo [Tabela 1]. A PCR se iniciou 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 segundos 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.

Tabela 1 – Condições da PCR para a amplificação dos genes de interesse.

Reagentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampão da enzima <i>Taq</i> DNA polimerase (sem cloreto de magnésio) [10X]	10
dNTPs [10 mM]	3
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	2
Oligo nucleotídeo 5' do gene [100 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	1
Oligo nucleotídeo 3' do gene [100 pmol/ $\mu\text{L}$ ]	1
<i>Taq</i> DNA polimerase Platinum [5 U/ $\mu\text{L}$ ]	1
Água deionizada q.s.p.	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

O resultado da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% contendo SYBR<sup>®</sup> Safe a 80 V, 400 mA por aproximadamente 40 minutos. O resultado foi observado em transluminador a 470 nm e os fragmentos de interesse foram recuperados utilizando o kit comercial *Wizard<sup>®</sup> SV Gel* (Promega) com rendimento de aproximadamente 50 ng/ $\mu\text{L}$  para cada reação utilizada. As quantificações foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no modo DNA50 com água mili-Q autoclavada como referência.

### 3.3.2 Transcrição *in vitro* e confirmação do enovelamento por variação térmica monitorado por dicroísmo circular (VT-CD)

Após a amplificação dos genes de interesse, deu-se continuidade a transcrição dos RNAs através da utilização do kit comercial MEGAscript<sup>®</sup> T7 (Ambion). O volume de DNA molde foi determinado como sendo a quantidade, em  $\mu\text{L}$ , necessária para obter 250 ng de DNA na reação. Após a adição dos reagentes de acordo com as especificações do fabricante (Tabela 2), a reação foi incubada por um período de 16 a 24 horas a 37 °C.

Tabela 2 – Condições da reação de transcrição *in vitro*.

Reagentes	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Tampão [10 X]	2
ATP	2
CTP	2
GTP	2
UTP	2
DNA molde (250 ng)	$\chi$
Enzima Mix	2
Água livre de RNases q.s.p.	20

$\chi$  = Quantidade, em  $\mu\text{L}$ , necessária para se obter 250 ng de DNA na reação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a finalização da reação de transcrição *in vitro*, as amostras foram submetidas à purificação através da adição de 1  $\mu\text{L}$  de DNase Turbo (Ambion), para degradação do DNA molde utilizado, incubando-se por 15 minutos à 37 °C. Posteriormente, procedeu-se com a extração utilizando o protocolo de precipitação com fenol e clorofórmio onde 200  $\mu\text{L}$  de fenol foram adicionados e homogeneizados por 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 e este foi transferido para outro microtubo, no qual se repetiu o mesmo procedimento com a adição de mesmo volume de clorofórmio. Após a centrifugação nas condições previamente descritas, 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<sub>free</sub>100% e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 4,7 RNase<sub>free</sub>. O material foi então guardado por 16 h a -20 °C para otimização da 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<sub>free</sub> previamente gelado. Após nova centrifugação por 15 minutos, o sedimento foi deixado por 16 h para completa secagem à temperatura ambiente e, após esse período, o sedimento seco foi ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água livre de RNases. Após a purificação dos tRNAs, foi necessário garantir o correto enovelamento. O enovelamento dos RNAs se deu utilizando um banho térmico a 80 °C com decréscimo contínuo da temperatura até 35 °C, nesse momento foi adicionado 20 mM de cloreto de magnésio. Prosseguiu-se com o resfriamento até a temperatura ambiente. As quantificações foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no modo RNA40 utilizando água

RNase<sub>free</sub> autoclavada como referência. O correto enovelamento das amostras de RNAs foi confirmado através de medidas de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em função da temperatura (VT-CD).<sup>126-127</sup>

Essa técnica é amplamente utilizada para o monitoramento das estruturas secundárias de proteínas, ácidos nucleicos (DNA e RNA) bem como sacarídeos. Além disso, é possível inferir alterações nas estruturas secundárias em função da variação de temperatura, solvente ou presença de ligantes.<sup>126-127</sup> Espectros de CD têm sido empregados para a determinação do correto enovelamento de amostras de RNAs em função da temperatura, uma vez que essa macromolécula apresenta máximos de elipsidade característicos, como mostrado na figura 16.<sup>127-128</sup>

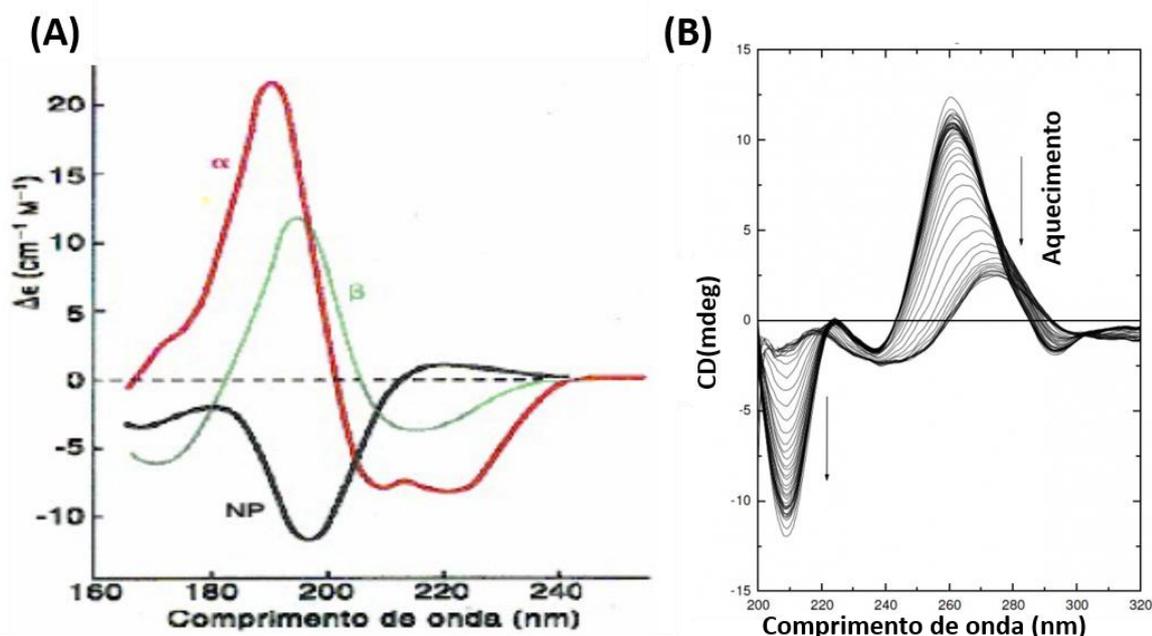


Figura 16 – Perfis dos espectros de dicroísmo circular. (A) Espectros de amostras proteicas. Proteínas majoritariamente em  $\alpha$ -hélice, folhas- $\beta$  ou estruturas irregulares são representadas em vermelho, verde e preto, respectivamente. (B) Espectros do desenovelamento de RNA estruturado em função da temperatura monitorado por VT-CD.<sup>126-128</sup>

Fonte: Adaptada de CANTOR;SCHIMMEL<sup>126</sup>; KELLY; JESS; PRICE<sup>127</sup>; KYPR et al.<sup>128</sup>

As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas de quartzo cujo caminho óptico era 1 mm acoplado ao sistema de variação térmica *Peltier*. Para as medidas de CD, amostras contendo 20  $\mu$ M de cada RNA analisado (tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS e tRNA<sup>Ala</sup>) preparado em água livre de RNases e 20 mM de cloreto de magnésio tiveram os espectros de CD registrados em função da temperatura em intervalos de 10 °C com 120 s de incubação entre cada aquisição. Foram realizadas

médias de 8 varreduras à 100 nm/min no intervalo de comprimentos de onda entre 205 nm e 320 nm. Foram feitas triplicatas experimentais sendo os resultados expressos em milielipsidade (mdeg) e todos os espectros adquiridos pelo programa Spectra Manager (JASCO) foram devidamente subtraídos das contribuições dos solventes utilizados. A deconvolução dos espectros foi realizada utilizando o programa CDTools.<sup>129</sup> Os dados obtidos foram tratados e analisados utilizando o software Origin 8.6 e a análise dos máximos observados em 268 nm em função da temperatura foi empregada, por meio do ajuste sigmoidal pela função de *Boltzmann*. Este ajuste permite a determinação da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) das amostras.

### 3.3.3 Marcação com fluoróforo específico

Com o objetivo de realizar experimentos fluorimétricos utilizando uma sonda fluorimétrica cujo comprimento de onda de excitação e emissão fossem específicos, procedeu-se com a marcação dos RNAs com um agente fluorescente sensível, no caso, a fluoresceína-maleimida (Sigma-Aldrich). Para essa marcação, utilizou-se o kit de marcação “5' EndTag Nucleic Acid Labelling System” (Vector Laboratories).

As marcações dos RNAs foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Inicialmente, o tiofosfato foi transferido a partir do ATP $\gamma$ S para a extremidade 5'-OH do RNA pela enzima T4 polinucleotídeo quinase. Em seguida, foi utilizado o fluoróforo específico para a formação da ligação ao grupo tiol do RNA. Posteriormente, foi necessário que os RNAs fossem novamente enovelados e, para isto, as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo previamente descrito para o correto enovelamento dos RNAs.

## 3.4 Determinação de contaminantes endógenos em SelB

SelB, assim como outros EFs, interage com nucleotídeos (GTP, GDP além de análogos) e com ácidos nucléicos, sobretudo RNAs.<sup>69-73,105-106</sup> Visando o controle das macromoléculas proteicas desse projeto, as amostras foram submetidas à medidas fluorimétricas e cromatográficas para a determinação de contaminantes endógenos copurificados.

### 3.4.1 Detecção de RNAs endógenos através de método fluorimétrico

SelB, assim como SelA, é passível de ser purificada com RNAs endógenos e, para a quantificação desses contaminantes foi utilizado o método fluorimétrico por meio de sondas específicas no fluorímetro Qubit (Invitrogen) através do ensaio de RNA Quant-iT.<sup>100,104</sup> O tratamento com RNase foi realizado ao final do processo de purificação por cromatografia de afinidade por metal para as cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460 e foram comparadas a fim de determinar o método mais eficiente de purificação.

O processo consiste na adição de RNase A [1 µg/mL] seguido por incubação a 4 °C por 1 h e 16 h. Para estes ensaios foi preparada a solução de trabalho por meio da diluição na proporção de 1:200 em volume do reagente *Working Solution* ao mesmo tampão em que estava a proteína em um volume final de 200 µL. Antes da adição da etapa de degradação por RNase, a proteína SelB resultante do passo de cromatografia por afinidade em tampão D foi dialisada para o tampão E e submetida à cromatografia de exclusão molecular. Portanto, o tampão utilizado nas análises de Qubit e na diluição da solução de trabalho foi o tampão E. Além disto, foram preparadas as soluções padrão diluindo o as solução *Standard 1* e *Standard 2* presentes no kit de reagentes do Qubit. A diluição das soluções padrão foi realizada na adição de 10 µL de cada reagente *Standard* em 190 µL de tampão E. A amostra a ser analisada foi preparada com a adição de 20 µL em 180 µL de solução de trabalho. Os tubos foram então vortexados por 30 s e incubados à temperatura ambiente antes das aquisições dos dados.

Para as medidas das concentrações de RNA presentes no produto final de purificação foi realizada a curva de calibração por meio das medidas dos padrões: soluções *Standard 1* e *Standard 2*. Basicamente, a medida destas soluções padrão indica o coeficiente de calibração, estimando uma função linear. A quantificação da amostra foi então realizada nas soluções padrões. Dessa forma, a concentração dos RNAs endógenos foi inferida para as amostras purificadas de SelB de ambas as cepas bacterianas de expressão.

### 3.4.2 Amostras GTP-free (HPLC)

SelB é uma proteína com atividade GTPásica, assim como todos os EFs. Portanto, espera-se que o produto final de purificação possa conter nucleotídeos de guanina copurificados. Deste modo, utilizou-se experimentos de extração de nucleotídeos com ácido perclórico seguidos de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) em coluna de troca iônica.<sup>9</sup> Assim como o observado com a presença de RNAs endógenos, houve a suspeita da

presença de nucleotídeos provindos das cepas de expressão.

As amostras foram preparadas seguindo protocolo já estabelecido na literatura<sup>9</sup> que consiste na adição de 250  $\mu\text{L}$  de 1,5 M ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) gelado em 500  $\mu\text{L}$  de amostra à 6  $\mu\text{M}$ . Após 10 min de incubação em gelo, as proteínas desnaturadas são removidas por centrifugação a 13.500 rpm, 10 min à 4° C. Em seguida, adiciona-se 100  $\mu\text{L}$  de KOH 3M e 80  $\mu\text{L}$  de ácido acético 5 M em 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante coletado. As amostras são então armazenadas a -20 °C para posterior análise.

As análises foram realizadas em sistema *High Performance/Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) em equipamento Waters 2695/2487 utilizando coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm* (Waters) monitorando a absorvância em 253 nm (nucleotídeos). As amostras foram centrifugadas a 13.500 rpm, 4 °C por 1 h antes de serem injetadas no sistema HPLC. A coluna foi previamente equilibrada com 90% tampão HPLC-A (100 mM fosfato de potássio pH 7,0) e 10% tampão HPLC-B (100 mM fosfato de potássio pH 7,0 e 1 M cloreto de sódio). As amostras foram submetidas à cromatografia de troca iônica com fluxo de 1 mL/min e variação do percentual dos tampões HPLC-A e HPLC-B de maneira linear até 50% HPLC-A e 50% HPLC-B em 10 minutos e posterior incremento de HPLC-B até 100% até 12 minutos total, retornando posteriormente as condições iniciais de equilíbrio.

Juntamente com as amostras analisadas, os padrões i) tampão, ii) GDP 12  $\mu\text{M}$ , iii) GTP 12  $\mu\text{M}$  e iv) mix: GDP+GTP 12  $\mu\text{M}$ , também foram preparados seguindo protocolo previamente descrito. Todos os cromatogramas foram tratados utilizando o software Origin 8.5.

### **3.4.3 Ensaio de atividade *in vitro* por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC)**

Além da quantificação da presença de nucleotídeos endógenos, foi também realizada a medida do consumo de GTP em função do tempo. A reação foi conduzida por 60 min a 25 °C após a adição de 100  $\mu\text{M}$  de GTP. Desta solução, frações de 100  $\mu\text{L}$  foram recolhidas nos seguintes tempos: 0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min. Para interromper a reação de consumo de GTP, as frações foram então congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas em banho térmico a 65 °C (temperatura acima da  $T_m$  de SelB) até à completa desnaturação e inibição da reação. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.500 rpm por 30 min a 4 °C e injetadas no HPLC.

A coluna foi previamente equilibrada com 90% de tampão A (fosfato de potássio 100 mM pH 7,0) e 10% de tampão B (100 mM fosfato de potássio pH 7,0 e 1 M cloreto de sódio). Para o monitoramento foram utilizados os seguintes controles: i) tampão E, ii) GDP 12  $\mu$ M, iii) GTP 12  $\mu$ M e iv) GDP+GTP 12  $\mu$ M.

Para cada condição, 100  $\mu$ L de amostras foram submetidos à cromatografia de troca iônica com fluxo de 1 mL/min com uma variação percentual do tampão A e do tampão B linearmente durante 10 min. Ao fim da análise, aumentou-se a concentração do tampão A até 100% por 12 min no total retornando às condições iniciais do gradiente para prosseguir com a próxima injeção.

A cinética de consumo de nucleotídeos de guanina na presença de tRNA<sup>Sec</sup> também foi realizada. Para isto, SelB na presença de 100  $\mu$ M de GTP foi previamente incubada com 20  $\mu$ M de tRNA<sup>Sec</sup> nos mesmos tempos analisados (0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min).

Por fim, experimento semelhante foi realizado na presença da maquinaria necessária para a incorporação de Sec. Juntamente com os 6  $\mu$ M de SelB em tampão E foram adicionados 12  $\mu$ M de tRNA<sup>Sec</sup>, 12  $\mu$ M de SECIS e 100 nM de ribossomo com o início da reação dado pela adição de 100  $\mu$ M de GTP e monitorados por 60 min à 25° C com a retirada dos mesmos tempos indicados para a cinética de SelB.GTP. Os resultados obtidos pelo monitoramento em 253 nm foram analisados no software Origin 8.5 utilizando a visualização de múltiplas curvas tridimensional.

### **3.5 Comparação entre as cepas de expressão utilizadas**

Como mencionado anteriormente, o gene *selB* de *E. coli* clonado em vetor de expressão pT7-6 foi transformado em duas diferentes cepas de expressão: *E. coli* BL21 ( $\lambda$ -DE3) e *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ -DE3), sendo essa uma cepa deficiente do gene *selC*, portanto não produzindo o tRNA<sup>Sec</sup> endógeno que poderia ser eventualmente copurificado com a amostra de interesse. Para a análise das amostras provindas das diferentes cepas de expressão, ensaios comparativos de dicroísmo circular e fluorescência intrínseca foram realizados.

#### **3.5.1 Dicroísmo circular (CD)**

Com o intuito de caracterizar e comparar a estabilidade térmica das amostras provindas das cepas de expressão *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460, experimentos de dicroísmo circular em função da variação térmica foram realizados (VT-CD). As medidas de

CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas circulares de 1 mm de caminho óptico. Foram utilizadas amostras provindas de ambas as cepas de expressão à 2,9  $\mu\text{M}$  de SelB produzida em *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460 e preparadas em tampão E.

Em todas as medidas, os espectros foram registrados em um intervalo de comprimento de onda de 198 a 250 nm, com uma média de 8 varreduras com resolução de 1 nm adquiridos em 50 nm/min. As contribuições dos tampões foram subtraídas dos respectivos espectros proteicos e os resultados foram expressos em milielipsidade (mdeg).

Para as medidas de variação térmica, o comprimento de onda de 220 nm (mínimo local que indica estrutura em  $\alpha$ -hélice presente em SelB) foi monitorado em intervalos de 5  $^{\circ}\text{C}$  com varreduras térmicas de 10  $^{\circ}\text{C}$  a 90  $^{\circ}\text{C}$  utilizando uma taxa de 1  $^{\circ}\text{C}$  por minuto e 120 segundos de incubação em cada temperatura antes da aquisição dos espectros. Os resultados foram analisados utilizando o software Origin 8.5 com o ajuste sigmoidal pela função de *Boltzmann*, permitindo a determinação dos valores das temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) das amostras.

### 3.5.2 Fluorescência intrínseca (IFS)

Proteínas possuem fluoróforos próprios, os aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina e fenilalanina) têm como característica a absorção em uma banda de comprimentos de onda específico e emissão em outra banda, também específica e distinta da banda de absorção.<sup>130</sup>

O aminoácido triptofano (Trp, W) tem máximo de excitação em 295 nm e emissão na banda localizada entre 303 e ~420 nm, é altamente sensível à alterações no ambiente local e, por essa razão, a banda de emissão é comumente utilizada no monitoramento de mudanças conformacionais, uma vez que essas alterações espectrais na emissão estão diretamente relacionadas com mudanças locais ocasionadas pela interação com determinado ligante ou mesmo interações do tipo proteína-proteína ou proteína-RNA.

SelB possui 12 resíduos de triptofanos (2,0%) distribuídos nos três domínios: 1 presente no domínio GTPase; 6 presentes no domínio de interação ao tRNA<sup>Sec</sup> e 5 presentes no domínio C-terminal, o que viabiliza as medidas de IFS. Ambas as amostras provindas de ambas as cepas de expressão foram submetidas aos ensaios de IFS em espectrofluorímetro ISS-PCI (ISS, Champaign) em geometria “L” utilizando um canal único de monitoramento. As amostras foram preparadas a 15  $\mu\text{M}$  em tampão E e monitoradas utilizando 295 nm para

excitação com um filtro de 295 nm na entrada do detector para evitar interferência de fótons espalhados. O espectro de emissão foi monitorado na faixa de 305 – 510 nm e foi utilizado para os experimentos cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Os resultados foram tratados utilizando o software Origin 8.5 e, a fim de determinar o valor de comprimento de onda referente ao máximo de emissão, foi analisada a primeira derivada da curva experimental.

### 3.6 Análises da formação dos complexos

O intuito desse projeto consiste nas análises das formações dos complexos macromoleculares dos quais SelB é integrante. Para isso, diferentes técnicas biofísicas foram aplicadas para a determinação e quantificação das constantes na formação desses complexos, seja com nucleotídeos ou com os RNAs e proteínas específicas da via de biossíntese de Sec.

#### 3.6.1 Interação com nucleotídeos

Inicialmente, ensaios de interação com GTP e GDP foram realizados através de medidas diretas por deslocamento da  $T_m$  por dicroísmo circular (VT-CD), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).

##### 3.6.1.1 Variação térmica monitorada por dicroísmo circular (VT-CD)

Ensaio de VT-CD foram realizados utilizando concentrações saturantes de nucleotídeos de guanina (GTP e GDP a 100  $\mu\text{M}$ ) acrescidos à SelB [2,9  $\mu\text{M}$ ] preparada em tampão E. É conhecido que amostras proteicas costumemente possuem um deslocamento positivo do valor de  $T_m$  quando em complexo estável com algum ligante específico.<sup>127</sup> Logo, assim como descrito anteriormente na seção 3.5.1, os espectros de CD foram adquiridos nas condições de VT-CD em intervalos de 5 °C com varreduras térmicas de 10 °C a 90 °C utilizando uma taxa de 1 °C por minuto e 120 segundos de incubação em cada temperatura antes da aquisição dos espectros. Os resultados foram analisados utilizando o software Origin 8.5 com o ajuste sigmoidal pela função de *Boltzmann*, permitindo a determinação dos valores das temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) das amostras.

### 3.6.1.2 Interação por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Experimentos de medidas diretas de variação de grandezas termodinâmicas podem ser realizados através da mensuração de temperatura (adiabática), da condução de calor ou compensação de potência (isotérmica).<sup>126,131-132</sup> Os experimentos de ITC podem ser conduzidos de duas maneiras distintas, através de injeção única (que será discutido na seção 3.6.2.4) ou injeções múltiplas, na qual se baseia o princípio da titulação sequencial de maneira periódica, como exemplificado na figura 17 a seguir.<sup>132</sup>

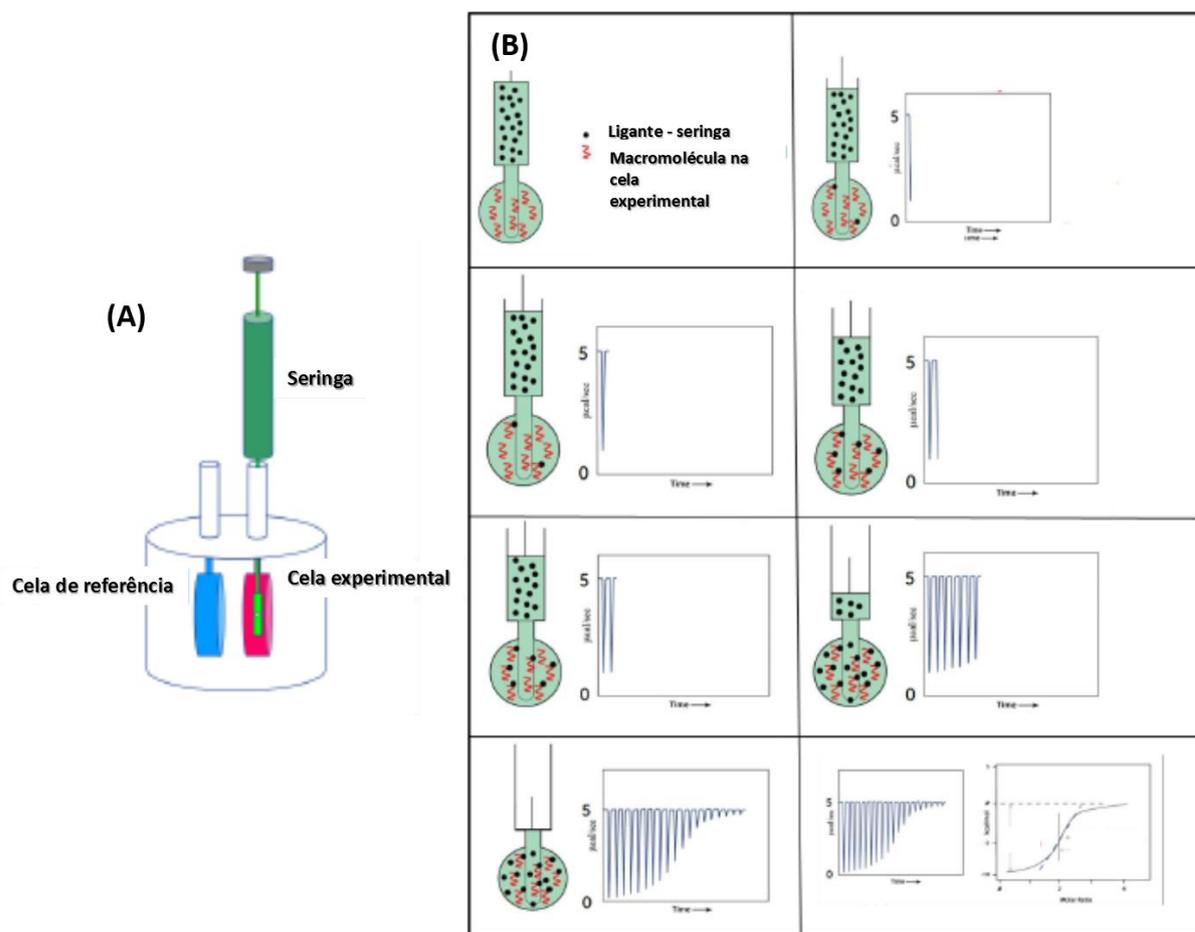


Figura 17 – Medidas de ITC. (A) Esquema do aparato experimental utilizado. (B) Etapas do processo de titulação isotérmica em função do tempo.

Fonte: Adaptada de ISOTHERMAL ...<sup>133</sup>

As medidas de ITC permitem quantificar alguns parâmetros bioquímicos do sistema analisado, como a constante de interação e a energia de interação do sistema e através da integração da potência observada em função do tempo de análise. Lembrando que:

<sup>3</sup> Elaborada pela aluna de mestrado Jéssica Fernandes Scortecci (IFSC/USP).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{[L]x[M]}{[ML]} \quad (2)$$

$$\Delta G = RT \ln K_D \quad (3)$$

Onde,  $\Delta G$  é a energia livre de *Gibbs* e para sistemas biológicos cujas reações são favoráveis e/ou espontâneas (exergônicas) é esperado  $\Delta G < 0$ .  $\Delta H$  é a variação de entalpia, podendo ser  $\Delta H > 0$  (endotérmica) ou  $\Delta H < 0$  (exotérmica). O termo  $\Delta S$  é a variação da entropia do sistema, podendo essa ser inferida indiretamente e espera-se que o valor seja  $\Delta S < 0$  e T a temperatura que, para esse tipo de experimento, é constante. As constantes  $K_D$  e  $K_A$  são a constante de dissociação e de afinidade, respectivamente e os parâmetros [L], [M] e [LM] são as concentrações do ligante, da macromolécula, do complexo binário (L+M) e R a constante universal dos gases ideais.

Os valores da constante de dissociação na interação entre SelB e os nucleotídeos de guanina, GTP e GDP, foram descritos por calorimetria de titulação isotérmica (ITC), obtendo-se valores de  $K_D$  iguais à 0,7  $\mu\text{M}$  e 12  $\mu\text{M}$  para GTP e GDP, respectivamente.<sup>105-106</sup> No entanto, esses valores são extremamente elevados para constantes biológicas. Por isso, experimentos de ITC foram conduzidos para a determinação do  $K_D$  da interação com GTP e GDP nas condições experimentais às quais os demais ensaios de interação foram conduzidos.

Para isso, 260  $\mu\text{M}$  de SelB foram preparados em tampão E, degaseificados por 20 min à 18 °C e posteriormente injetados na cela experimental do equipamento iTC200 (Malvern) do Laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas (LBPP – IQSC/USP) sob supervisão do Prof. Dr. Júlio César Borges. Aproximadamente 50  $\mu\text{L}$  de GTP, a 1 mM preparados em tampão E e previamente degaseificados, foram carregados na seringa e foram realizadas 12 injeções consecutivas de 1  $\mu\text{L}$  com intervalos de 240 s sob agitação de 1.000 rpm. O mesmo procedimento foi realizado para GDP e somente para o tampão como controle. A titulação dos nucleotídeos em tampão também foi realizada para que o calor de diluição fosse subtraído. Os resultados obtidos em triplicatas foram analisados no software Auto-iTC200 (Malvern) utilizando modelo de um único sítio de interação e valor de variação de entalpia conhecido previamente pelos estudos de injeção única (seção 3.6.2.4).

### 3.6.1.3 Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Ensaio de calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizados para análise da formação desses complexos binários e determinação dos parâmetros termodinâmicos durante a transição do estado enovelado para desenovelado. Essa metodologia consiste na medida de temperaturas e fluxos de calor associados às transições em função do tempo e temperatura inserida em um ambiente controlado. Em estudos de macromoléculas biológicas, essa técnica permite a determinação da  $T_m$ , ou seja, a temperatura na qual 50% da população em análise perde sua conformação nativa, podendo colaborar com os dados obtidos através das análises de dicroísmo circular (CD) monitorando a desnaturação por variação térmica (Figura 18).

$$\int_0^t \frac{dH}{dt} = C_p \quad (4)$$

Na Equação 4,  $dH$  é a variação da entalpia do sistema,  $C_p$  é o calor específico da amostra analisada à pressão constante e  $dT$  a variação de temperatura ao qual o sistema é submetido.

Uma vez determinado o valor de  $T_m$  para a proteína SelB, foi então determinado o valor da temperatura de *melting* alterado pela presença dos nucleotídeos. Os experimentos de DSC foram realizados em colaboração com o Dr. Luis Guilherme Mansor Basso (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP/RP) com a utilização do equipamento MicroCalorímetro MicroCal VP-DSC (Microcal, Northampton, MA, EUA) do Grupo de Biofísica Molecular “Prof. Sérgio Mascarenhas” do IFSC/USP. As amostras foram submetidas a uma taxa de aquecimento de 63,4 °C/h numa faixa de temperatura de 10 °C a 65 °C e a uma pressão constante de 1 atm. Registraram-se as linhas de base do tampão E experimental antes dos experimentos de desdobramento da proteína para registrar o histórico térmico do calorímetro. Os termogramas de SelB e dos complexos com nucleotídeos (SelB.GTP e SelB.GDP) foram registrados em apenas um scan após 15 min de equilíbrio da amostra à temperatura de partida (~20 °C) e as amostras de SelB foram preparadas a 7 µM em complexo com concentrações saturantes de GTP e GDP [100 µM] em 500 µL em tampão E.

Após a subtração de tampão experimental e correção de linha de base, os termogramas resultantes foram normalizados para a concentração molar de proteína e deconvoluídos usando o software Microcal Origin DSC. A análise independente dos perfis de capacidade de calor molar resultantes foi realizada utilizando um modelo estatístico mecânico de dois

estados com DSCFit (Microcal). Vale ressaltar que, uma vez que SelB e seus complexos sofrem desnaturação irreversível durante o aquecimento, os parâmetros derivados não podem ser considerados como verdadeiras constantes termodinâmicas.<sup>126,131-132</sup>

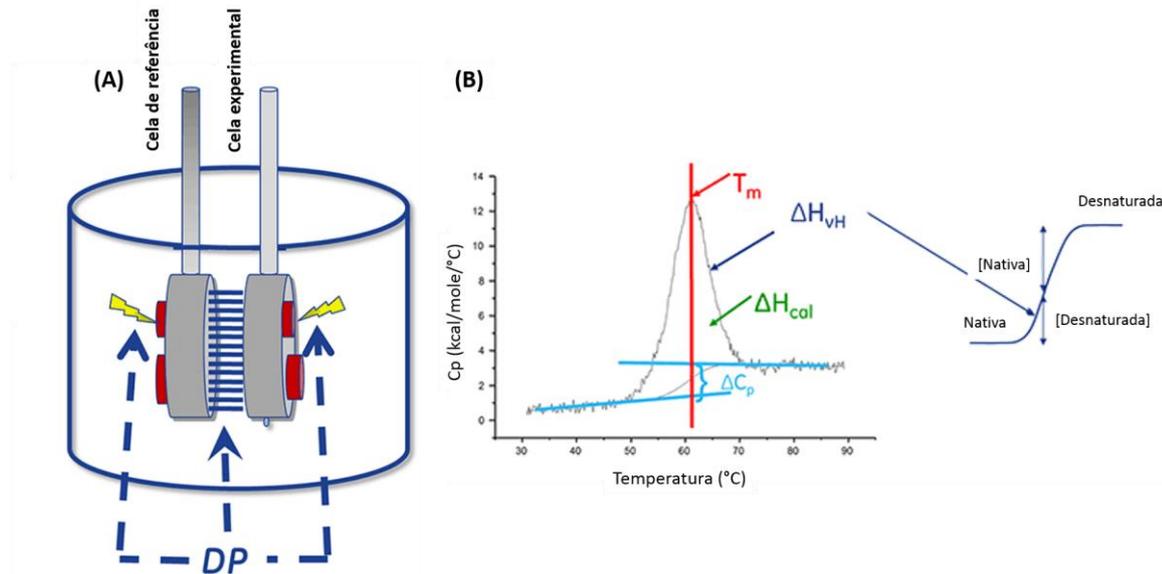


Figura 18 – Medidas de DSC. (A) Esquema do aparato experimental utilizado. (B) Exemplificação do processo de transição de estados (nativo-desnaturado ou enovelado-desenovelado) e os parâmetros determinados a partir do termograma obtido.  
Fonte: Adaptada de ISOTHERMAL ...<sup>133</sup>

### 3.6.2 Interação com RNAs e parceiros da via de biossíntese de Sec

Além dos nucleotídeos, SelB interage com os RNAs específicos da via de biossíntese de Sec (tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS) como já descrito anteriormente.<sup>33,60,70,72</sup> No entanto, não houve descrição das interações de SelB com os demais parceiros da via, como Sela ou mesmo constantes de dissociação com o ribossomo. Para isso, fez-se necessário o uso de diferentes técnicas biofísicas para a determinação das constantes de dissociação e importantes parâmetros desses complexos macromoleculares.

#### 3.6.2.1 Supressão da emissão dos triptofanos (IFS)

Como mencionado anteriormente, SelB possui 12 resíduos de triptofanos distribuídos majoritariamente nos domínios de interação aos RNAs (11/12 W). Com isso, foi possível realizar experimento de titulação do tRNA<sup>Sec</sup> em amostra de SelB.

Para esses experimentos, 50 nM de SelB em concentração saturante de GTP [100  $\mu$ M] foram incubados à 25 °C, excitados em 295 nm e monitorados no intervalo entre 303-510 nm assim como descrito anteriormente. Concentrações crescentes de tRNA<sup>Sec</sup> foram adicionadas até uma concentração final de 2.000 nM e cada ponto foi incubado por 10 min para posterior medida. Monitorando a banda de emissão foi possível determinar o valor máximo de intensidade e correlacionar o máximo de emissão com a concentração de tRNA<sup>Sec</sup> titulado, obtendo-se assim uma curva de interação.

Essas medidas foram realizadas em triplicata biológica e os valores médios e desvio médio padrão foram obtidos pela estatística dos dados coletados nos diferentes experimentos. Utilizando o software Origin 8.5 foi possível analisar os espectros e curva de ligação além de realizar o ajuste utilizando a curva de *Hill*, que é usualmente utilizada para descrever processos bioquímicos por permitir a determinação de valores de constantes e cooperatividade.<sup>134</sup> O ajuste de *Hill* permite a determinação dos valores de constante de interação ( $K_D$  – constante de dissociação) e índice de cooperatividade para os complexos estudados. Esses parâmetros refletem a cooperatividade ( $n > 1$  indica cooperatividade positiva, ou seja, o favorecimento da interação da próxima molécula à sonda monitorada,  $n < 1$  cooperatividade negativa, ou seja, o desfavorecimento das interações subsequentes e  $n = 1$  indica sistema não cooperativo e sítios independentes de interação) e constantes de dissociação aparente em valores biologicamente aceitáveis.

### 3.6.2.2 Espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)

A elucidação das interações entre biomoléculas é essencial para a compreensão plena dos mecanismos cinéticos, bioquímicos e entendimento do funcionamento das vias metabólicas. A metodologia de espectroscopia de anisotropia de fluorescência é amplamente utilizada para estudos de interações entre biomoléculas, o que rendeu algumas publicações inclusive em nosso grupo de pesquisa nos últimos anos.<sup>60,95-96</sup> A técnica se baseia na diferença de absorção e emissão de fótons no sistema de coordenadas de um fluoróforo utilizado.

Para uma solução homogênea, os fluoróforos ali presentes possuem uma orientação arbitrária e aleatória sujeitas ao movimento browniano em solução e, no caso de uma molécula pequena, a população estará estatisticamente distribuída, não havendo diferença significativa nos valores das direções de observação. No entanto, havendo uma heterogeneidade na distribuição da população, essa diferença se torna significativa, resultando em um valor de anisotropia diferente de zero.<sup>130,135</sup>

Ao serem expostas à luz polarizada, as moléculas fluorescentes que possuem a mesma orientação de absorção que a polarização da radiação incidente, são excitadas, diferenciando-se da população dentre as demais que estão em outras orientações.<sup>130,135</sup> Em suma, o experimento consiste na observação na diferença de polarização, em direções perpendiculares, dos fluoróforos presentes em solução. Essa diferença é denominada anisotropia de fluorescência e é exemplificada na figura 19 a seguir.

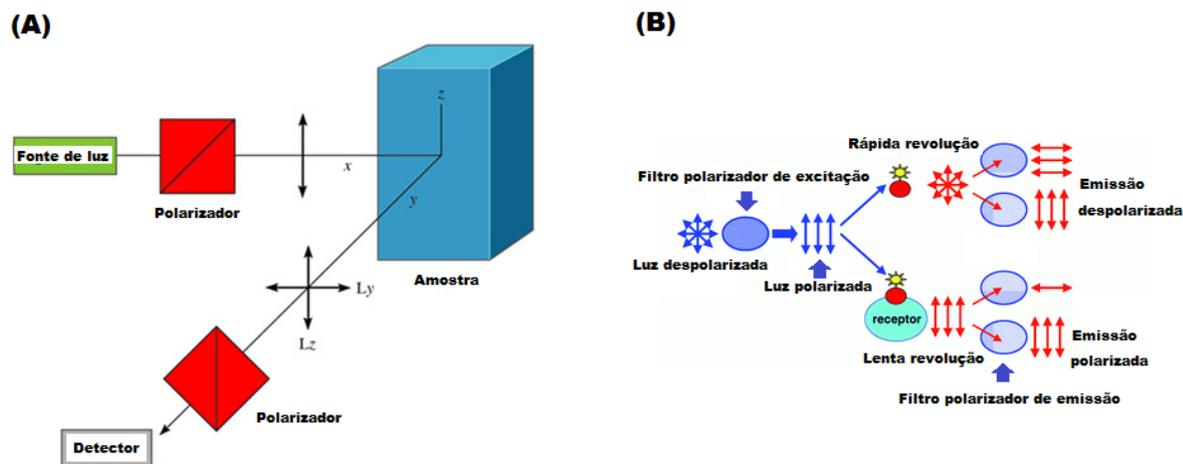


Figura 19 – Representação do experimento de espectroscopia de anisotropia de fluorescência. (A) Esquema geral do desenho experimental com o posicionamento dos polarizadores e configuração comumente utilizada em “L”. (B) Modelo esquemático da polarização da luz e consequências pela influência do tamanho das partículas em solução, semelhante ao nosso modelo experimental.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

As medidas de anisotropia elucidam o deslocamento angular médio do vetor de absorção e de emissão do fóton excitado no fluoróforo. No entanto, a emissão pode ser despolarizada por influência da difusão rotacional, evento esse dependente da viscosidade da solução, do tamanho e forma da partícula, e do tempo de vida desse estado excitado no qual se encontra a molécula fluorescente.

A Equação 5 descreve como a grandeza anisotropia ( $r$ ), valor adimensional, é determinada experimentalmente através de medidas das intensidades de fluorescência observada para cada uma das configurações possíveis de combinação dos polarizadores de excitação e de emissão ( $I_{VV}$ ,  $I_{VH}$ ,  $I_{HV}$  e  $I_{HH}$ ), e da relação com o  $G$  factor, também correlacionado às intensidades para cada combinação de polarizadores ao longo da medida.<sup>104,130,135</sup>

$$r = \frac{[I_{VV} - G \cdot I_{VH}]}{[I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}]} \text{ onde, } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (5)$$

Os RNAs (tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS e tRNA<sup>Ala</sup>) marcados com fluoresceína 5-maleimida na extremidade 5' (tRNA<sup>Sec\*</sup>, SECIS\* e tRNA<sup>Ala\*</sup>), obtidos através do protocolo descrito na seção 3.3.3, possuem máximo de absorção em 492 nm e emissão na faixa de 520-530 nm. Utilizando-se o espectrofluorímetro ISS-PCI (ISS, Champaign) em geometria “L” com canal único de monitoramento e filtro de 50% de corte na emissão para 515 nm, foi possível a realização de experimentos de FAS em função da concentração de SelB titulada.

Inicialmente, 49 nM de tRNA<sup>Sec</sup> acrescido de 1 nM de tRNA<sup>Sec\*</sup> foram incubados em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico à 25 °C por 10 min na presença de 100 μM de GTP. Posteriormente, concentrações crescentes de SelB foram tituladas e, medidas de intensidade e anisotropia foram coletadas obtendo um valor médio de 5 interações variando as posições dos polarizadores de entrada e saída no sistema óptico com 10 min de incubação para cada incremento na concentração de SelB presente na amostra em análise. Analogamente, o mesmo procedimento experimental foi adotado para o controle negativo utilizando (tRNA<sup>Ala</sup>), onde concentrações crescentes de SelB na presença de GTP saturante [100 μM] foram tituladas para a determinação dos valores de interação porém não apresentando a mesma especificidade, uma vez que o tRNA<sup>Ala</sup> é estruturalmente diferente do tRNA<sup>Sec</sup>.

Além disso, a análise da interação de SelB com o complexo binário SelA-tRNA<sup>Sec</sup> foi realizada de maneira análoga, onde uma amostra de 50 nM de SelA foi previamente incubada à 25° C com tRNA<sup>Sec</sup> [49 nM] e 1 nM de tRNA<sup>Sec\*</sup> por 25 minutos em tampão E acrescido de GTP [100 μM]. Concentrações crescentes de SelB foram adicionadas e procedeu-se como descrito anteriormente para a aquisição dos dados de anisotropia monitorando o tRNA<sup>Sec\*</sup> em função da concentração de SelB presente em solução.

Sabendo que SelB possui diferentes domínios de interação (GTPase-tRNA<sup>Sec</sup>-SECIS) foram realizados experimentos de FAS utilizando SECIS [49 nM] acrescido de SECIS marcado, analogamente ao descrito para tRNA<sup>Sec\*</sup>, a 1 nM SECIS\* em tampão E com GTP [100 μM] adicionado. Procedeu-se com a titulação de SelB de maneira análoga ao descrito anteriormente. Experimento semelhante foi realizado com o preparo de 49 nM de SECIS adicionado 1 nM SECIS\* e titulado o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> previamente preparado no mesmo tampão e em concentrações saturantes de GTP. Por fim, medidas com o

incremento do complexo SelB.GTP.SECIS previamente preparado foram realizadas seguindo o mesmo protocolo descrito previamente.

Finalmente, os complexos de interação junto ao ribossomo foram preparados seguindo protocolo semelhante citado, onde 49 nM de tRNA<sup>Sec</sup> juntamente com 1 nM tRNA<sup>Sec\*</sup> foram previamente incubados com SelB [50 nM] em condições saturantes de GTP [100 μM]. Assim, concentrações crescentes do complexo ribossomal de *E. coli* (NEB), preparados à 13,3 μM em tampão E, foram tituladas à 25 °C com 10 min de incubação antes da aquisição dos dados. O mesmo procedimento experimental foi aplicado para o complexo SelB.GTP.SECIS\* e, posteriormente, para o complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec\*</sup>.SECIS. Desta forma, analisou-se todas as combinações de interações possíveis envolvendo SelB, tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS, Sela e ribossomo.

Os resultados de média de valores de anisotropia em função da concentração de SelB foram obtidos pela média de triplicatas biológicas e analisados em escala linear utilizando o software Origin 8.5 e, através do ajuste de *Hill* foi possível a determinação dos valores de constante de interação ( $K_D$  – constante de dissociação) e índice de cooperatividade para os complexos estudados.

### 3.6.2.3 Ultracentrifugação analítica (AUC)

A técnica de Ultracentrifugação Analítica (Analytical Ultracentrifugation - AUC) é utilizada para analisar o comportamento de macromoléculas biológicas, em solução, e determinar parâmetros como constante de sedimentação de macromoléculas em função do tempo para um campo centrífugo uniforme (Experimentos de velocidade de sedimentação) ou valores de constantes de dissociação quando o campo centrífugo é variável em função do tempo e menor que a velocidade necessária para sedimentação completa das macromoléculas analisadas (Experimentos em equilíbrio de sedimentação).<sup>126</sup>

Para experimentos de velocidade de sedimentação, as partículas são submetidas à uma velocidade de rotação constante ( $\omega_0$ ), fazendo com que as partículas migrem para a parte inferior da cela experimental a uma velocidade de sedimentação constante ( $v$ ). A velocidade de sedimentação relacionada à velocidade de rotação ( $\omega_0$ ) é expressa pela equação (6) e definida como constante de sedimentação de *Svedberg*, sendo esta correlacionada com a massa da partícula ( $m$ ), volume parcial específico ( $\vartheta$ ), e densidade da partícula ( $\rho$ ), coeficiente de difusão ( $D$ ), as constantes: número de *Avogadro* ( $N_A$ ) e constante universal dos gases ideais ( $R$ ).  $S$  também está relacionada ao coeficiente friccional ( $f$ ), além da posição na qual a partícula se encontra na cela experimental ( $r$ ).

$$S = \frac{\nu}{\omega_0^2 r} = \frac{m(1 - \rho)}{fNA} = \frac{mD(1 - \rho)}{RT} \quad (6)$$

Usualmente, a normalização para o estado padrão da água a 20 °C é utilizada para a comparação dos coeficientes de sedimentação sem a influência de diferentes tampões. Nesse caso, tem-se o coeficiente de sedimentação padronizado ( $S_{20,w}$ ). A figura 20 ilustra a diferença experimental entre medidas de velocidade e equilíbrio de sedimentação.

Além disso, a distribuição das concentrações de espécies em solução em função da posição radial e do tempo é fundamental para a interpretação dos dados e essa é descrita pela equação de *Lamm* (equação 7).

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial [rD \frac{\partial c}{\partial t} - s\omega_0 r^2 c(r,t)]}{\partial r} \quad (7)$$

Onde o  $c(r,t)$  é a função que correlaciona a concentração de migração e difusão de uma partícula em função do raio ( $r$ ) e tempo ( $t$ ). Os demais parâmetros foram definidos anteriormente.

Os experimentos foram realizados nas instalações do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM-Campinas) com o uso do equipamento Beckman Coulter Proteome Lab XL-I (Beckman Coulter), rotor Proteome Lab XL-I (220-240 VAC, 50 Hz) com o auxílio da Dra. Ana Carolina Figueira e da Dra. Fernanda Batista.

A determinação do coeficiente de sedimentação de SelB bem como é na presença de tRNA<sup>Sec</sup> e tRNA<sup>Ala</sup> foram realizadas na presença de GTP [100 μM] utilizando SelB [9,8 μM] e complexos SelB-tRNAs a uma proporção de 3 SelB : 1 tRNA em tampão E, ou seja, tRNAs à [3,27 μM]. Os experimentos foram realizados a 40.000 rpm a 25 °C. O monitoramento da sedimentação foi conduzido com um total de 294 varreduras para cada condição por 26 h monitorando a absorção em 280 nm utilizando tampão E como referência. Os valores teóricos para as constantes relacionadas à densidade e viscosidade a partir do tampão experimental foram calculados pelo programa Sednterp<sup>136</sup> e, para a interpretação da absorção radial, todas as curvas resultantes foram ajustadas pelo programa SEDFIT<sup>137</sup> utilizando o modelo de distribuição contínua  $c(S)$ .

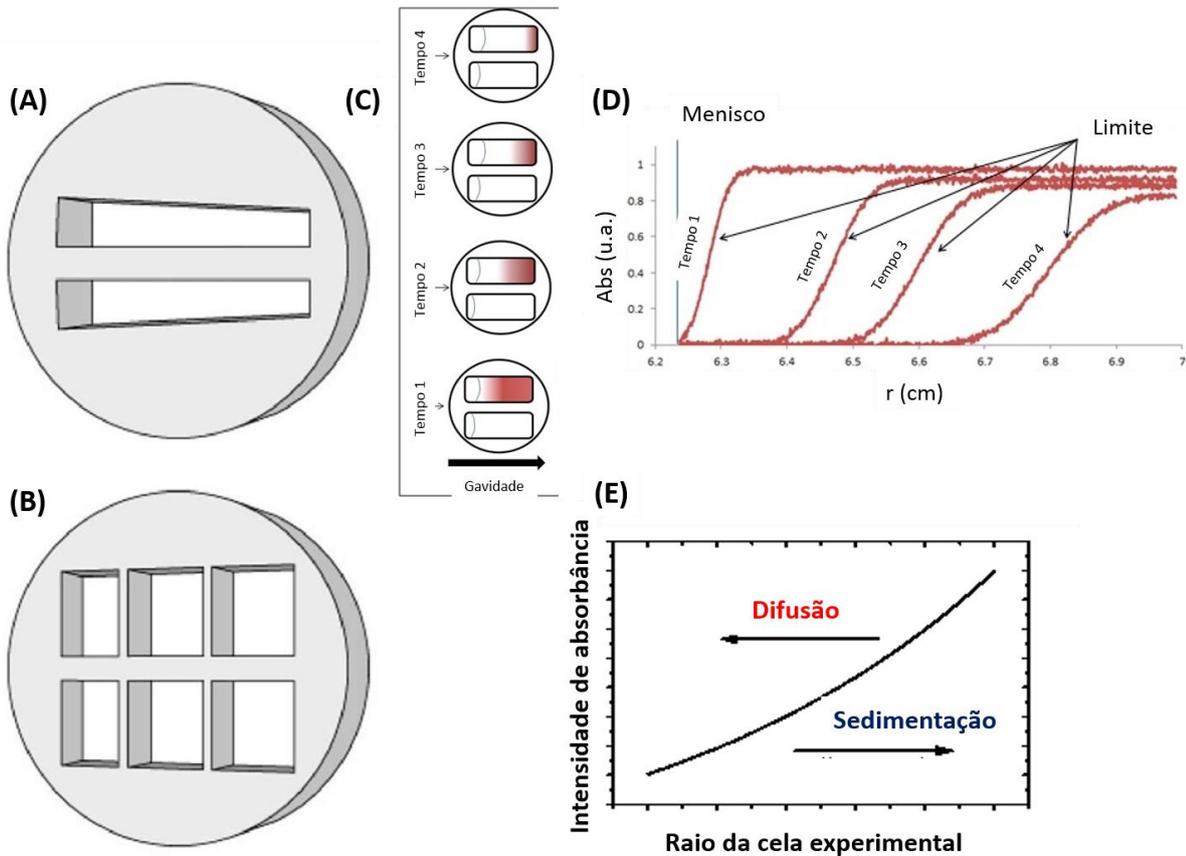


Figura 20 – Representação do experimento de ultracentrifugação analítica. (A) Cella para experimentos de velocidade de sedimentação. (B) Cella para experimentos de equilíbrio de sedimentação. (C) Esquema da dinâmica do experimento de velocidade de sedimentação para 4 tempos distintos e (D) perfil das medidas para cada tempo. (E) Princípio do experimento de equilíbrio de sedimentação onde, como o próprio nome diz, há um equilíbrio das espécies em solução de modo que as partículas não sedimentem totalmente e possam se manter devido à ação da difusão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os experimentos de equilíbrio foram realizados nas seguintes velocidades: 8.000 rpm; 12.000 rpm; 15.000 rpm e 18.000 rpm, sendo que em todas as etapas foram mantidas em rotação durante 12 horas. De mesma maneira, as medidas foram realizadas a 25 °C com monitoramento no comprimento de onda de 280 nm. Foram realizados os experimentos com os tRNAs: tRNA<sup>Sec</sup> e tRNA<sup>Ala</sup> preparados em tampão E e monitoramento em 280 nm. tRNA<sup>Sec</sup> e tRNA<sup>Ala</sup> foram mantidos constantes [0,34 μM], sendo adicionadas quantidades de SelB em proporções molares de 0,5:1; 1:1 e 2:1 de SelB:tRNA, respectivamente. Para o tratamento do conjunto de dados do experimento de equilíbrio foi utilizado o software SEDPHAT<sup>138</sup> utilizando modelo de interação do tipo  $A + B = AB$ . Os valores teóricos dos parâmetros de viscosidade e densidade foram calculados pelo programa Sednterp.<sup>136</sup>

#### **3.6.2.4 Determinação da entalpia de interação por injeção única na calorimetria de titulação isotérmica (ITC)**

Assim como descrito na seção 3.6.1.2, experimentos de ITC também foram realizados para determinar os valores de  $\Delta H_{ap}$  (variação de entalpia aparente) na formação dos complexos SelB.GTP; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Ensaios de injeção única consistem na adição de uma quantidade saturante da molécula de interesse e monitoramento da troca de calor em função do tempo. Após a subtração do calor de diluição é possível determinar a variação da entalpia aparente de interação do complexo formado.

Nesses ensaios, 10  $\mu\text{M}$  de SelB foram preparados em tampão E, degaseificados por 20 min à 18 °C e, posteriormente, injetados na cela experimental do equipamento VP-ITC (GE) do Laboratório de Biofísica “Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas” (IFSC/USP). Aproximadamente 500  $\mu\text{L}$  de GTP, a 1 mM preparados em tampão E e previamente degaseificados, foram carregados na seringa e foi realizada uma única injeção de 20  $\mu\text{L}$  durante 40 s mantida por 120 s sob agitação de 300 rpm. O mesmo procedimento foi realizado para tRNA<sup>Sec</sup> e, posteriormente, SECIS à 200  $\mu\text{M}$  e 160  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Experimentos de diluição dessas macromoléculas em tampão E também foram realizados para a subtração do calor de diluição. Os resultados obtidos em triplicatas foram analisados no software Origin 7.0 (VP-ITC/GE) obtendo-se os valores de  $\Delta H_{ap}$  após a subtração dos calores de diluição e integração do pico resultante. De acordo com os princípios termodinâmicos descritos nas equações (1) e (3), uma vez determinado o valor de  $\Delta H_{ap}$  e  $K_D$  (obtida por diferentes métodos nesse projeto), foi possível inferir os valores de variação de entropia ( $\Delta S$ ) para os complexos analisados.

#### **3.6.2.5 Análise de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa em condições nativas**

Visando obter mais informações sobre a interação entre SelB com tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS e determinar a razão estequiométrica de interação entre essas macromoléculas, ensaios de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa em condições nativas foram realizados. Esta técnica permite determinar se uma dada proteína tem a capacidade de interagir com outra proteína ou com moléculas de DNA ou RNA. Desta forma, os experimentos de *gel-shift* utilizam géis de agarose ou poliacrilamida com a finalidade de realizar a separação de uma mistura contendo proteínas ligadas a DNA ou RNA, mostrando a formação destes complexos macromoleculares pelas diferenças de tamanho apresentadas.

Os ensaios de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa foram realizados monitorando moléculas de RNAs marcadas com fluoresceína a [1  $\mu\text{M}$ ] e aumentando a concentração de SelB, em concentração saturante de GTP [100  $\mu\text{M}$ ], em razões estequiométricas (1:0,5; 1:1 e 1:2). Foram preparados complexos SelB.GTP em tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS e tRNA<sup>Sec</sup>/SECIS e a separação foi realizada em gel de agarose 2% RNase<sub>free</sub>, corado com 10% de SyBr Safe<sup>®</sup> (Thermofisher). As amostras foram submetidas à tensão de 80 V, com corrente de 400 mA por 120 min a 4 °C e os resultados foram observados utilizando o fotodocumentador Gel DocTM XR + Gel (BioRad) utilizando comprimento de onda de 470 nm.

### **3.7 Análise da estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial (DSC) dos complexos envolvendo SelB**

A formação dos complexos proteína-RNA foi confirmada através de experimentos de DSC sob mesmas condições descritas anteriormente na seção 3.6.1.3. Concentrações fixas de 14  $\mu\text{M}$  tRNA<sup>Sec</sup>, 12  $\mu\text{M}$  SECIS, 14  $\mu\text{M}$  tRNA<sup>Ala</sup> e 7  $\mu\text{M}$  SelB foram utilizadas nas análises dos complexos binário (SelB.tRNA<sup>Sec</sup>), ternários (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.SECIS) e quartenário (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS). Os parâmetros termodinâmicos foram obtidos pelas análises utilizando o software MicrocalOrigin e esses resultados corroboram com as análises de formação de complexos macromoleculares estáveis.

### **3.8 Mapeamento da superfície de interação de SelB por troca hidrogênio/deutério**

A dinâmica de uma proteína não é algo trivial de ser analisada, ainda mais com a interação com outras macromoléculas. Uma possibilidade para o monitoramento desses movimentos em solução e a determinação de regiões de interação entre o complexo ligante-receptor, é a troca isotrópica dos hidrogênios presentes nas amidas da cadeia principal (desde que expostas ao solvente), por deutério (Troca HDX) acoplada com a espectrometria de massas (HDX-MS). Cada deutério incorporado resulta no aumento da massa, deslocando os picos encontrados no comparativo com os picos não submetidos à troca HDX. Com isso, os deslocamentos dos picos em valores referentes a números inteiros de massa identificam a quantidade de deutérios incorporados. Pelo assinalamento da sequência realizado de maneira prévia e digestão teórica, é possível determinar os percentuais de incorporação.<sup>139</sup>

Essa metodologia permite a determinação das interfaces de contato entre complexos

macromoleculares mesmo na ausência de um modelo estrutural tridimensional. A figura 21 exemplifica as etapas experimentais e as condições ótimas para o preparo da amostra contrastada.

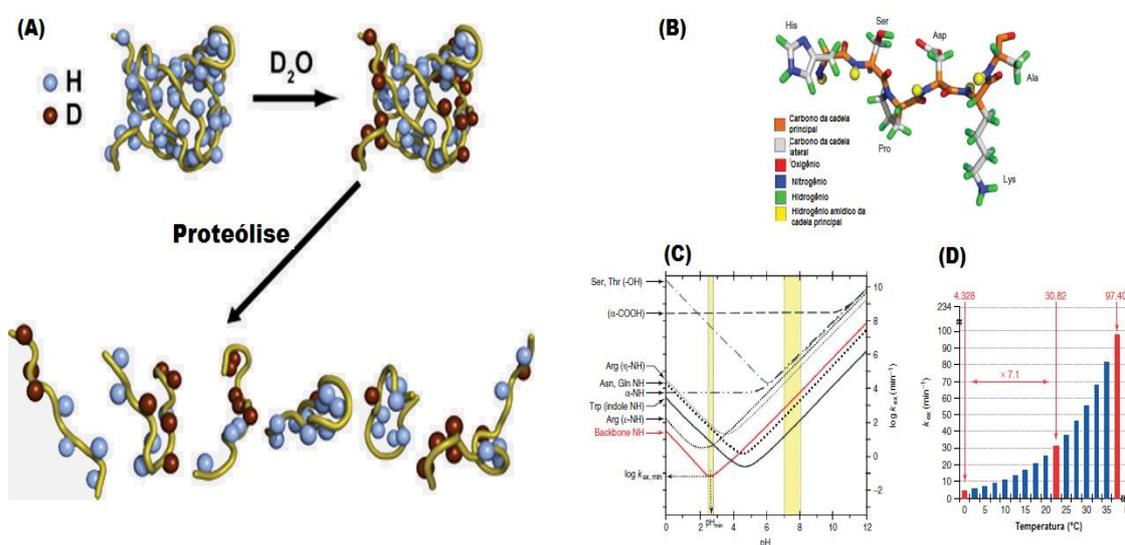


Figura 21 – Esquema representativo dos ensaios de HDX. (A) Modelo ilustrando a incorporação de deutério nas amidas das regiões expostas ao solvente e a visualização após a proteólise. (B) Peptídeo ilustrando os átomos que o compõe, em destaque em amarelo, os hidrogênios amídicos da cadeia principal passíveis de sofrerem a troca por deutério. (C) e (D) Gráfico evidenciando o melhor processo de incorporação quando a amostra está sujeita a pH 2,5 e baixas temperaturas, respectivamente.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

As análises de HDX-MS foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Mário Sérgio Palma e o Dra. Bibiana Monson de Souza, ambos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro e foi utilizado protocolo semelhante ao estabelecido em estudos anteriores.<sup>60,104</sup>

Foram empregados diferentes tempos de incorporação de deutério de acordo com o complexo analisado (SelB.GTP: 5 e 30 minutos – SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup>: 30 minutos – SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS: 30 minutos de troca HDX). As amostras: SelB.GTP; SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS foram preparadas em tampão 100 mM fosfato de potássio pH 7,0 com adição de 100 μM GTP e 10 μM de cada RNA (tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS) em 10 μM de SelB. Após incubação por 20 minutos à 25 °C, as amostras foram diluídas em 75% de D<sub>2</sub>O nos tempos acima indicados e, para cada ponto de análise, foram retiradas alíquotas de 70 μL de amostra e imediatamente adicionada a 60 μL de tampão 20 mM de fosfato de sódio pH 2,5 com ácido fórmico acrescido para minimizar o tempo de destroca.

Posteriormente, utilizou-se [0,038 mg/mL] de pepsina (Sigma-Aldrich) por 10 min em

gelo para realização da proteólise antes da injeção no equipamento de análise dos peptídeos resultantes. A realização desses procedimentos à baixa temperatura e pH minimizam os efeitos de destroca, embora não afetem a atividade da pepsina. Também foram realizadas análises com as amostras sem o procedimento de troca HDX, utilizando-as como referências dos peptídeos obtidos. Assim, torna-se possível a determinação da taxa de incorporação de deutério para cada peptídeo gerado, considerando tanto o número absoluto de deutérios como em percentual relativos às possibilidades de incorporação. Além disso, a autoclivagem da pepsina foi monitorada através do preparo seguindo o mesmo protocolo e posterior subtração do espectro antes de iniciar as análises comparativas.

Por fim, as amostras foram injetadas em espectrômetro de massas por meio de uma fonte de *electrospray* (ESI) à 240  $\mu\text{L/h}$  em um espectrômetro micrOTOF-QII (Bruker Daltonics). Os resultados foram analisados utilizando o software DataAnalysis 4.3 (Bruker) e o assinalamento dos picos referentes à relação massa/carga dos peptídeos foi realizado comparando-se com as massas teóricas preditas pelo servidor *PeptideCutter – ExPASy*. Posteriormente, calculou-se a taxa de incorporação de deutério de cada peptídeo identificado. Os resultados foram observados através de um *heat map* na estrutura primária e no modelo tridimensional obtido por homologia através do software Pymol 1.3 (Schrödinger, LLC).

### **3.9 Mudanças conformacionais de SelB medidas por espectroscopia de infravermelho**

A metodologia de espectroscopia de infravermelho acoplada à transformada de *Fourier* (FTIR) fornece informações sobre o conteúdo de estruturas secundárias das amostras proteicas, analogamente ao observado durante um experimento de dicroísmo circular. O FTIR consiste na absorção de radiação na região do infravermelho e, para peptídeos, são presentes as bandas de absorção denominadas Amida I e Amida II, provenientes das ligações amida entre os aminoácidos.<sup>126,140</sup>

A absorção associada à banda da Amida I é decorrente do alongamento vibracional da ligação C=O e a banda da Amida II é relacionada com a flexão vibracional da ligação N-H e ambas as ligações são intrinsecamente correlacionadas com estruturas secundárias presentes na amostra. Importante ressaltar que os valores das bandas das Amidas I e II estão localizados na região entre  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ , distante de outras bandas de absorção de amostras biológicas, como RNAs e DNAs por exemplo. Devido a isso, as análises de mudanças conformacionais dos complexos envolvendo proteínas-RNAs são usualmente realizadas através de medidas de

FTIR e não por CD, uma vez que os RNAs interferem diretamente nos espectros de CD, fato esse que não ocorre em espectros de infravermelho (IR) uma vez que as bandas de absorção são distantes.

Após a medida do espectro de IR, a região da banda da Amida I passa por uma deconvolução e é ajustada por gaussianas características para cada estrutura secundária e assim é possível quantificar o percentual desses elementos estruturais para cada amostra [Figura 22].

Os experimentos foram realizados no Departamento de Física da UNESP – São José do Rio Preto, em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Cornélio. Utilizando o espectrômetro *Spectrum Two-IR* (PerkinElmer) equipado com um detector DTGS KBr foram coletados 10 acumulações durante 300 s com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  numa varredura de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  à  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As amostras SelB.GTP; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS foram preparadas em tampão E utilizando  $10\text{ }\mu\text{M}$  SelB;  $12\text{ }\mu\text{M}$  para os RNAs e  $100\text{ }\mu\text{M}$  GTP e os espectros foram adquiridos em solução através da aplicação direta de  $10\text{ }\mu\text{L}$  sobre a janela de detecção. Para o processamento dos dados foi utilizado o programa Origin 8.0 e consistiram em isolar as bandas das Amidas I e II (região entre  $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ ) utilizando operador derivada por duas vezes, determinando os máximos de picos em regiões com estruturas secundárias conhecidas e previamente conhecidas. O pico resultante da segunda derivada é então deconvoluído utilizando ajuste por curvas gaussianas nesse intervalo descrito.

Para os complexos envolvendo os RNAs, o espectro de diferença foi aplicado para a quantificação dos valores de mudanças de estruturas secundárias, de modo que:

- 1) SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> subtraído de SelB.GTP, revela a variação de estruturas secundárias de SelB após a interação com o tRNA<sup>Sec</sup>;
- 2) SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS subtraído de SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>, a variação de estruturas secundárias de SelB após a interação com SECIS;
- 3) SelB.GTP.SECIS subtraído de SelB.GTP, a variação de estruturas secundárias de SelB após a interação com SECIS.

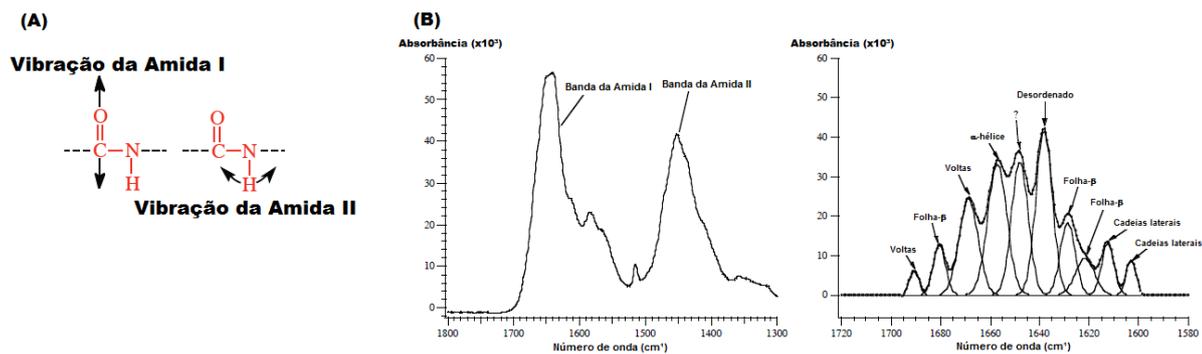


Figura 22 – Esquema representativo do experimento de FTIR. (A) Modos vibracionais das Amidas I e II, regiões de estiramento das ligações C=O e N-H presentes nas ligações peptídicas. (B) Bandas de absorção das Amidas I e II em função do número de onda da radiação incidente. O processamento a partir das bandas observadas revela características fundamentais com relação aos percentuais de estruturação secundária presentes nas amostras.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

### 3.10 Análises estruturais dos complexos

No princípio desse projeto, os dados de SelB de qualquer organismo eram extremamente escassos, tendo somente informações de modelagem comparativa,<sup>69</sup> estudos estruturais de construções truncadas<sup>71</sup> e estrutura cristalográfica de SelB de arqueias.<sup>108</sup> Deste modo, informações estruturais como modelagem comparativa de SelB de *E. coli* e resultados estruturais, mesmo que à baixa resolução, faziam-se essenciais para a compreensão dessa macromolécula além dos complexos macromoleculares da via de biossíntese de Sec. Assim, estudos estruturais foram empregados através de ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), tentativas de cristalização e estudos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

#### 3.10.1 Modelos a baixa resolução de SelB e seus complexos

O estudo de molécula em solução utilizando radiação ionizante, raios-X, é baseado em medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Essa técnica consiste na utilização de um feixe monocromático de raios-X sendo projetado na amostra em solução e detecção do espalhamento elástico gerado pelas partículas em solução em orientação randômica devido ao movimento browniano.<sup>141</sup> Por ser uma medida de médias em solução, essa metodologia não permite informações de alta resolução em distâncias atômicas, no entanto, apresenta alta precisão em informações relevantes como tamanho e forma das partículas.<sup>126</sup>

Os experimentos de SAXS foram coletados na linha de luz SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS/CNPEM - Campinas, Brasil) em colaboração com o Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto (Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu) e o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes. Foi utilizada a linha ajustada com a energia em  $(8,0 \pm 0,1)$  keV, tamanho do feixe de  $(1,5 \times 1)$  mm<sup>2</sup> e  $\lambda = 1,488$  Å a uma distância de 1,033 mm entre o porta amostra (PALMI, mica – 300 µL à 25 °C) ao detector Pilatus-2D 300K (Dectris).

Os complexos SelB.GTP, SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS foram preparados em tampão E e em concentrações finais de 32 µM e 15 µM de proteína. Concentração equimolar dos RNAs em condições saturantes de GTP [100 µM] foi adicionada às amostras. Além disso, foram coletados dados do tRNA<sup>Sec</sup> utilizando [12 µM] em mesmas condições experimentais.

O padrão de espalhamento das amostras foi obtido através da média de 3 scans de 30 s de exposição cada e após subtração do padrão de espalhamento do tampão realizado em mesmas condições experimentais. Esse procedimento e normalização das curvas pela intensidade do feixe de raios-X foram realizados no programa FIT2D.<sup>142</sup>

As curvas foram então processadas utilizando o pacote para o processamento de dados de SAXS, ATSAS 2.7.2,<sup>143</sup> possibilitando o tratamento das curvas de espalhamento experimental (PRIMUS) e obtenção das curvas de espalhamento teóricas (CRYSOL). A aproximação de *Guinier* e função de distribuição do par de distâncias,  $p(r)$ , foram calculadas pelo programa GNOM<sup>143</sup> e a massa foi inferida pelo servidor online SAXSMoW<sup>144</sup> para o cálculo do gráfico de *Kratky*, importante para a interpretação da flexibilidade da molécula em solução (Figura 25-C).<sup>145</sup> Dada a elevada flexibilidade SelB e seus complexos, uma etapa adicional ao tratamento foi utilizada para a eliminação da flexibilidade intrínseca da molécula em solução. A subtração da constante de *Porod* e nova iteração no processamento foram realizadas para a obtenção de novas  $p(r)$ s e, assim, a obtenção de novos modelos estruturais.

A partir das  $p(r)$ s obtidas para cada complexo analisado, foram gerados 10 reconstruções independentes para obtenção de modelos de baixa resolução *ab initio* através do programa DAMMIF.<sup>143</sup> Posteriormente os modelos estruturais teóricos obtidos (seção 3.1) foram ajustados nos envelopes moleculares através do programa SUPCOMB.<sup>143</sup> Os envelopes de SAXS de SelB e complexos foram analisados no software PyMOL 1.3 (Schrödinger, LLC).

### 3.10.2 Tentativas de cristalização

Estudos estruturais são comumente realizados através da técnica de cristalografia de proteínas por meio da interpretação do padrão de difração de raios-X a partir de um monocristal proteico.<sup>146</sup> Entretanto, o processo de cristalização de macromoléculas não é trivial e depende de três passos canônicos: nucleação, crescimento e estabilização do crescimento (Figura 23-A). O processo deve ocorrer de maneira ordenada, devendo-se evitar que durante o processo de diminuição da solubilidade da amostra, esta não precipite ao invés de cristalizar. As interações solvente-soluto e as interações intramoleculares estão diretamente relacionadas com a estabilidade do processo de cristalização de macromoléculas biológicas por meio de parâmetros como: temperatura, pH, concentração salina, hidrofobicidade do meio aquoso e presença de solvente orgânicos.<sup>146</sup>

Muitas são as técnicas utilizadas na cristalização de macromoléculas, sendo o mais frequente, as técnicas de difusão de vapor, em que a solução proteica fica suspensa em uma lamínula (*hanging drop*) ou repousada sobre um poço (*sitting drop*), representadas na Figura 23. A diferença entre a concentração de soluto entre a gota e o reservatório de solução cristalizante direciona esse sistema, devido à diferença de potencial químico, até atingir um equilíbrio de concentrações entre a gota e a solução do reservatório, através da difusão da fase de vapor da solução menos concentrada, a gota, para a mais concentrada, o reservatório. Esse equilíbrio varia de algumas horas até vários dias ou meses dependendo da constituição da solução do reservatório e das características físico-químicas da molécula em análise.<sup>146</sup>

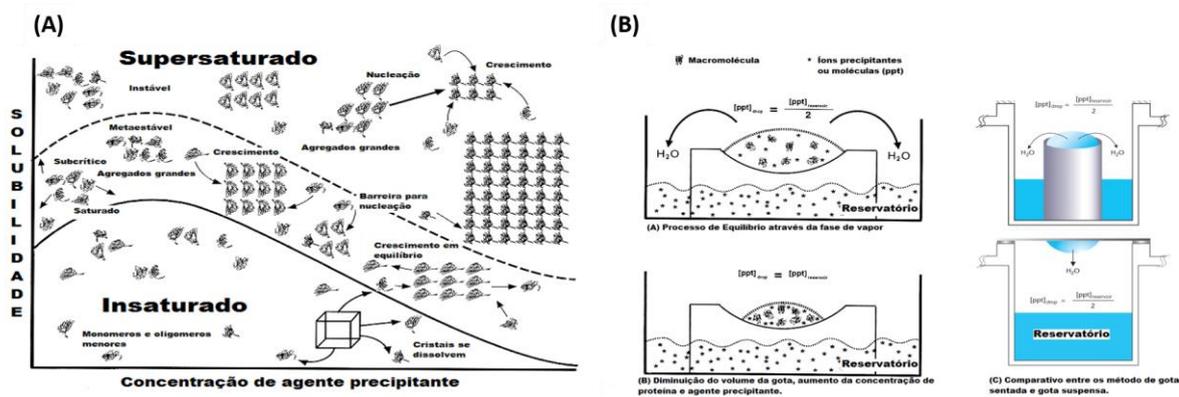


Figura 23 - Metodologia de cristalização de macromoléculas biológicas. (A) Ilustração do processo que correlaciona a concentração de agente precipitante e a solubilidade da macromolécula em solução, ilustrando as três diferentes etapas do processo de cristalização. (B) Mecanismo ilustrativo usando método *sitting drop*, ou gota sentada, mostrando a variação do tamanho da gota e, conseqüentemente, aumentando a concentração das moléculas ali presentes. Além disso, ilustrações distinguindo os métodos de gota sentada e gota suspensa, os quais possuem os mesmos processos físico-químicos.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

Os ensaios de cristalização partiram de uma triagem inicial utilizando o sistema automatizado *HoneyBee 963* (DigiLab) com os kits de cristalização comerciais: Crystal Screen HT e Index HT da empresa HAMPTON RESEARCH, e JCSG-plus HT-96 e MIDAS da empresa Molecular Dimensions, utilizando micro gotas de 0,2  $\mu\text{L}$  de amostra e mesmo volume de solução do poço em placas de 96 ensaios simultâneos no método de *sitting drop*. Para os testes iniciais de cristalização, amostras de SelB em complexo com GTP e os RNAs foram preparadas à 29  $\mu\text{M}$  e em concentração equimolar de tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS, em tampão E com excesso de GTP (100  $\mu\text{M}$ ). As imagens dos cristais foram coletadas utilizando um estereo-microscópio Discovery.V20 acoplado a uma câmera AxioCam MRc-5 (Zeiss) e software integrado.

### 3.10.3 Estudos por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Modelos estruturais são comumente atribuídos somente às estruturas obtidas por cristalografia de proteínas ou por ressonância magnética nuclear. No entanto, essas técnicas apresentam limitações importantes em relação à elevada concentração da amostra, necessidade de cristalizabilidade e tamanho da macromolécula. Atualmente, a microscopia eletrônica de transmissão vem sendo amplamente empregada para análises de macromoléculas biológicas em caráter estrutural, possibilitando a obtenção de modelos estruturais nativos, utilizando concentração inferior às demais técnicas estruturais e com alta resolução após o advento das câmeras de detecção direta de elétrons (DD). Obviamente, essa metodologia ainda apresenta limitações tais como tamanho da amostra e necessidade de minimização de alguns componentes dos tampões, por exemplo. Apesar disso, esta técnica apresentou grande avanço nos últimos 4 anos.<sup>147-149</sup>

Em uma descrição breve da técnica, um feixe de elétrons é produzido por uma fonte de alta tensão, usualmente, emissão termo-iônica pelo aquecimento de um filamento de hexaboreto de lantânio ( $\text{LaB}_6$ ) ou tungstênio. Porém, microscópios eletrônicos de alta resolução fazem uso de fontes de emissão do tipo FEG (*field emission gun*), produzindo um feixe mais coerente, com menor diâmetro e até três vezes mais intenso (brilho,  $e/\text{\AA}^2$ ), podendo-se relacionar um comprimento de onda ( $\lambda$ ) associado à tensão utilizada (equação 11).

Da mesma forma que um conjunto de lentes em um microscópio óptico possibilita a focalização do feixe na amostra, bobinas produzem campos magnéticos para colimar o feixe de elétrons sobre a área de análise. Apesar de ser um sistema magneto-óptico, não é inerte a efeitos como aberrações esféricas ou aberração da onda, inerentes ao sistema de lentes

magnéticas e ao feixe formado no microscópio.

A passagem do feixe através da amostra produz uma imagem de projeção em um anteparo, que pode ser uma tela fosforescente e aquisição em filme fotográfico: uma câmera CCD e aquisição digital ou, como já mencionado, câmeras de detecção direta.<sup>147-148</sup>

$$\lambda = \frac{h}{[m_e \cdot v]} \text{ logo, } \lambda = \left[ \frac{12.3}{\sqrt{\Phi}} \right] \text{ \AA} \quad (8)$$

Onde,  $\lambda$  é o comprimento de onda de *de Broglie* para o elétron,  $m_e$  sua massa de repouso  $v$  sua velocidade e  $\Phi$  a tensão a qual é submetida.

A análise de amostras biológicas provê imagens formadas através do contraste de fase. O elétron, apesar de ser tratado como uma partícula no aspecto da física clássica, pode ser considerado como uma onda eletrônica pelo princípio da dualidade onda-partícula.<sup>149</sup> Essa onda sofre deslocamento de fase em função da interação com a partícula biológica em análise, ocasionando interações destrutivas e construtivas no plano da imagem formada. A Figura 24 ilustra os componentes básicos de um microscópio eletrônico e mostra um exemplo de imagem de transmissão bidimensional que não reflete diretamente o objeto tridimensional que a gerou.

Amostras biológicas para análise de partícula isolada (*single particle analysis*) podem ser preparadas utilizando dois métodos: recobrimento com sal metálico resultando em um contraste negativo da amostra em relação à cobertura (*negative stain*) ou rápido congelamento em gelo vítreo (*cryo-sample preparation*).<sup>150</sup>

A metodologia de contraste negativo consiste no preparo da grade com deposição de um sal metálico sobre a amostra, criando contraste na observação da macromolécula. Para essa metodologia de preparo, usualmente não é necessária a correção da função de transferência de contraste (CTF), uma vez que o contraste do sal metálico é suficiente para determinação das baixas frequências (espaço recíproco, ou, espaço de *Fourier*). Logo, permite que as partículas sejam reconhecidas facilmente com o contrabalanço de perdas excessivas das altas frequências, o que não permite a obtenção de modelos de alta resolução a partir de dados coletados utilizando esse tipo de preparo de amostra.

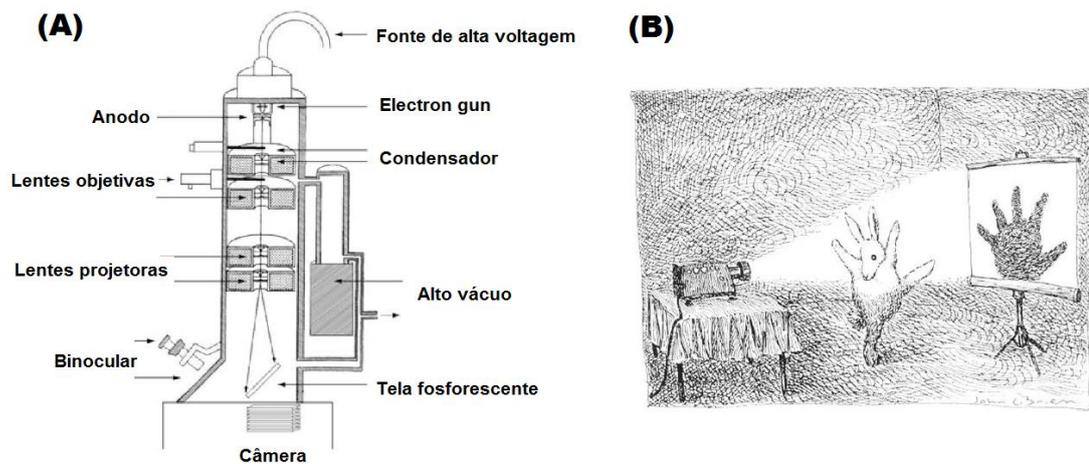


Figura 24 - Esquemas representativos sobre microscopia eletrônica. (A) Representação de um microscópio eletrônico com seu sistema magneto-óptico. (B) Exemplo de modelo de imagem de transmissão. A imagem observada no anteparo não revela, em sua totalidade, o objeto que a gerou.  
 Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

Em contrapartida, o preparo criogênico é realizado através da deposição da amostra em “buracos” contidos na grade de carbono e, após a retirada do excesso, a grade é congelada em etano liquefeito na presença de nitrogênio líquido. O uso do etano se dá pelo fato de seu calor específico ser maior que o do nitrogênio líquido ( $38,332 \times 0,25 \text{ J/K}$ ) evitando assim a formação de gelo cristalino e favorecendo a formação de gelo vítreo, condição fundamental para que haja contraste entre as partículas congeladas e o meio que as circunda, em geral, tampão. A figura 25 ilustra a comparação entre os preparos de amostras para análises por meio de TEM.

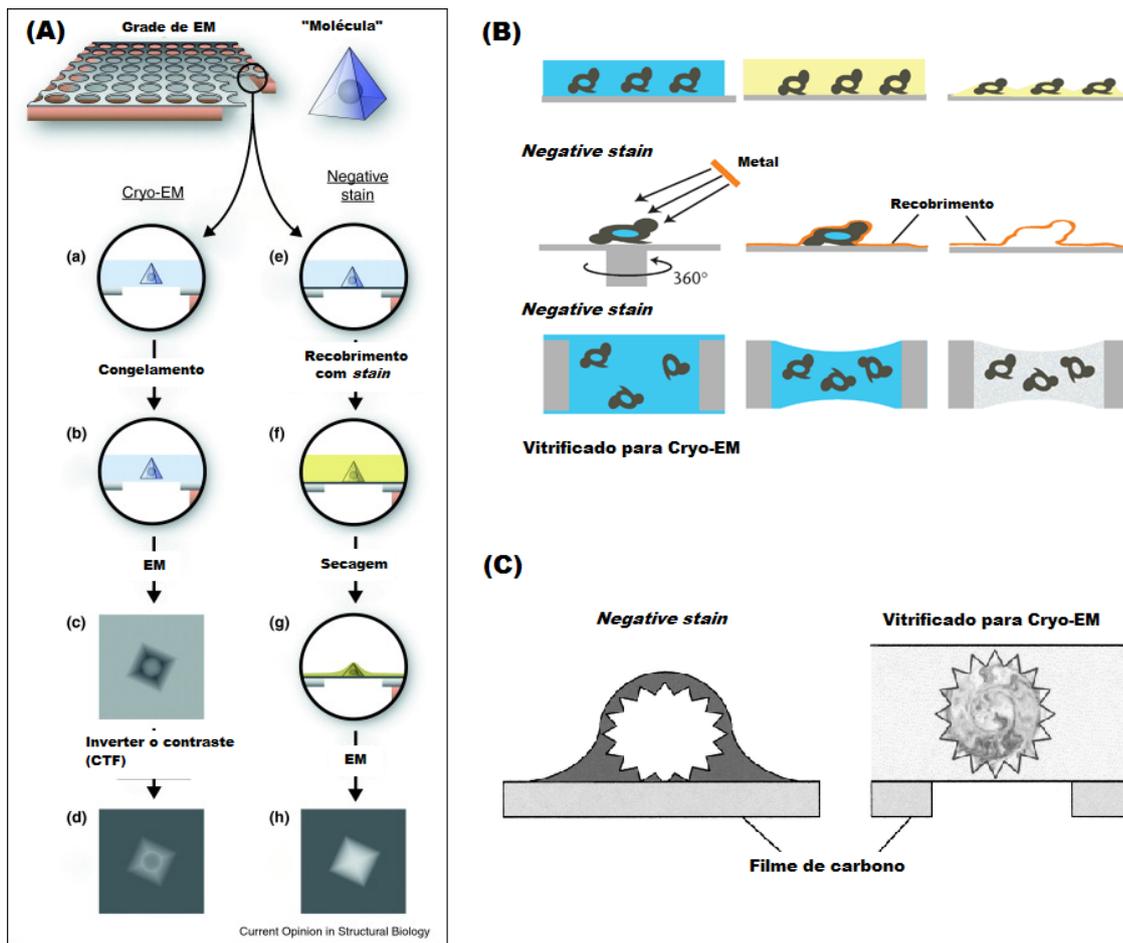


Figura 25 – Comparativo entre preparos de amostras para TEM. (A) Esquema apresentando a sequência de eventos no preparo de amostras para microscopia eletrônica de transmissão utilizando *Negative Stain* e congelamento em gelo vítreo. (B) Comparação dos preparos de amostras evidenciando diferenças entre as duas metodologias utilizadas. (C) Comparativo entre uma partícula em meio ao sal metálico e em gelo vítreo.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.<sup>104</sup>

### 3.10.3.1 Complexos de interação com ribossomo preparados por contraste negativo (NS-EM)

Em continuidade ao projeto de mestrado iniciado em 2011 e em colaboração com os Drs. Rodrigo Villares Portugal e Jefferson Bettini, ambos do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPq), o preparo das amostras de SclA e SclA-tRNA<sup>sec</sup> foram realizadas e geraram um conjunto de dados de 7388 partículas na orientação de vista superior (*top view*) e 194 partículas em vista lateral (*side view*). Os resultados foram classificados em 700 classes usando somente as 3 primeiras *eigenimages* do conjunto de "*top views*". As análises das *classsums* e *eigenimages* obtidas foram fundamentais para a determinação da

razão estequiométrica do complexo SelA-tRNA<sup>Sec</sup>, bem como a confirmação da morfologia da molécula semelhante aos dados da literatura.<sup>95-96</sup>

Para as análises do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD, a amostra foi preparada de maneira análoga ao apresentado acima, porém, não foi possível a realização de uma coleta de dados nem a visualização desse complexo para esse tipo de preparo de amostra, sendo aplicado então o preparo em gelo vítreo como discutido na seção subsequente.

No entanto, o preparo de NS-EM foi utilizando também para as grades dos complexos nos quais SelB é participante. Os complexos de interação junto ao ribossomo foram preparados seguindo protocolo semelhante ao descrito na literatura para preparo de complexos macromoleculares junto ao ribossomo e EFs.<sup>6,72</sup> Para isto, 1  $\mu$ M de tRNA<sup>Sec</sup> foi previamente incubado com SelB na mesma concentração e em condições saturantes de GTP [100  $\mu$ M]. Então 0,75  $\mu$ M de ribossomo de *E. coli* (NEB), previamente preparados à 13,3  $\mu$ M em tampão E, foram acrescidos e incubados à 25 °C por 10 min. O mesmo procedimento foi realizado para a formação dos complexos ribossomo.SelB.GTP; ribossomo.SelB.GTP.SECIS e ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Os RNAs foram utilizados em concentração equimolar à SelB e previamente preparados em tampão E antes de adicionar o complexo ribossomal.

Uma vez preparados os complexos, uma alíquota de 3  $\mu$ L foi depositada por 30 s em uma grade *C-flat 400-mesh* utilizando carga neutra. Após essa etapa, o excesso de amostra foi retirado utilizando papel filtro e a grade foi lavada com tampão Hepes 10 mM pH 7,0 para a retirada das partículas não interagentes com o carbono e excesso de sais presentes no tampão da amostra. Por fim, 3  $\mu$ L de acetato de uranila 2% foi utilizado para o recobrimento da amostra por 1 min e posteriormente secado com a utilização de papel filtro por 5 min ao ar em temperatura ambiente.

As imagens foram coletadas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G<sup>2</sup>F20 HRTEM *single-tilt* (Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE/DeMa - UFSCar) operando em 200 kV em uma camera TIA 1 Mp (FEI) de alta resolução utilizando 1 s de exposição e -5  $\mu$ m de *defocus*. Foram coletadas 12 imagens de cada complexo, incluindo somente o ribossomo preparado nas mesmas condições que foram utilizadas como controle.

O processamento foi realizado utilizando o pacote IMAGIC 4D<sup>151</sup>, onde um total de 380 partículas para o conjunto de dados de ribossomo foram selecionadas, filtradas, normalizadas e centradas utilizando as metodologias de processamento. Após a seleção das melhores partículas (120) foi realizada a atribuição angular e determinação de um modelo estrutural do ribossomo à baixa resolução. A visualização do complexo foi realizada no software *Chimera* 1.9.10<sup>124</sup> e os demais complexos estão sendo processados para a realização

de um mapa de diferença junto ao ribossomo e comparação com os dados recentemente publicados de análise de partícula isolada por Cryo-EM.<sup>72</sup>

### 3.10.3.2 Complexos transientes preparados em gelo vítreo (Cryo-EM)

A caracterização bioquímica das interações envolvendo SelA com o tRNA<sup>Sec</sup> foram elucidadas em colaboração com o Dr. Rodrigo Villares Portugal e a equipe do Grupo de Crio Microscopia Eletrônica (CME) vinculado ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do LNNano-CNPEN.<sup>95-96</sup> Além disso, resultados preliminares indicavam a formação do complexo ternário e transiente SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD.<sup>60</sup> Por conta disso, decidiu-se que esse complexo seria caracterizado estruturalmente através da técnica de crio-microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM). Essa etapa do projeto teve a orientação do Prof. Dr. Marin van Heel juntamente com o Dr. Pavel Afanasyev (*Netherland Centre of Electron Nanoscopy na Universiteit Leiden - NeCEN-LU, Holanda*).

As amostras foram preparadas seguindo protocolo previamente descrito,<sup>95-96,100,104</sup> onde SelA<sub>decâmero</sub> foi purificada e diluída para 20 µM em tampão 20 mM KPB pH 7,5 para o preparo das grades de microscopia. O tRNA<sup>Sec</sup> foi então incubado à 20 µM tRNA<sup>Sec</sup> em 10 µM de SelA<sub>monômero</sub> por 15 min à 25 °C em 20 mM KPB pH 7,5. Por fim, o complexo ternário (SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD) foi montado pela incubação de 10 µM de SelA.tRNA<sup>Sec</sup> com 12 µM de SelD durante 15 minutos à 25 °C em tampão 20 mM KPB pH 7,5 adicionado de 100 mM NaCl, 10 % glicerol e 2 mM β-mercaptoetanol. A estequiometria de formação do complexo conhecida é 1SelA<sub>decâmero</sub>:10tRNA<sup>Sec</sup>:5SelD<sub>dímero</sub>.

As grades foram preparadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEN, Campinas) pelo Dr. Alexandre Cassago e com a supervisão do Dr. Rodrigo Villares Portugal. Foram utilizadas grades C-Flat (R2/2 400 mesh), negativamente carregadas e o equipamento *Glow-Discharger* (Pelco) operando a 15 mA durante 25 s. Cerca de 3 µL de cada amostra foram utilizados para o preparo das grades com o uso do equipamento Vitrobot Mark IV (FEI) a 100% de umidade à 22 °C. O excesso de amostra das grades foi retirado por contato de 3 s com papel filtro 597 e contato entre as pás variando de -10 e -5. Imediatamente antes do preparo da amostra, o complexo ternário foi diluído em tampão 20 mM KPB pH 7,5 até uma concentração final de 9,3 µM de tal maneira que a concentração final de glicerol ficasse em torno de 0,6%. As amostras foram então estocadas em nitrogênio líquido e enviadas para o NeCEN-LU em *dewar* seco para a aquisição de dados.

A aquisição de dados do complexo ternário foi realizada no microscópio *Titan Krios*

(FEI) operando a 300 kV, sem correção de aberração esférica (*Cs corrector*), equipado com um detector direto 4Kx4K (16Mp) *Falcon-2*. Foram coletados 7 *frames* por região de exposição sendo 6 regiões por *hole* como ilustrado na Figura 26, e 5 regiões expostas as quais foram coletadas com um *defocus* de aproximadamente -1,5  $\mu\text{m}$  (roxo) e uma região com *defocus* de aproximadamente -3,5  $\mu\text{m}$  (verde). As imagens de baixo *defocus* ( $\sim 1,5 \mu\text{m}$ ) são aquelas de maior resolução, ou seja, as que levam os conjuntos de dados ao maior detalhamento atômico, enquanto que as imagens de alto *defocus* ( $\sim 3,5 \mu\text{m}$ ) são aquelas que não possuem informação de alta resolução, porém, possuem melhor contraste, o que facilita a visualização das partículas e o processamento de dados inicial. A Tabela 3 contém os parâmetros utilizados na aquisição de dados.

Tabela 3 - Parâmetros da coleta de dados do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD.

Amostra	Voltagem (kV)	Aberração esférica (nm)	Pixel Size (Å)	Dose (e/Å <sup>2</sup> /s)	Astigmatismo (Å)	Defocus (μm)	Abertura da objetiva	Distância focal (mm)
SelACD	300	2,7	1,04	50-60	0-3000	-1,5; -4	100	3,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os *frames* foram coletados com a participação do especialista Dr. Roman Koning (*Leiden University Medical Center – LUMC*) utilizando os programas *Atlas* (FEI), para mapear as regiões da grade a serem coletadas, e *EPU for Life Sciences* (FEI), utilizado para aquisição automática dos dados. Os conjuntos de dados coletados ( $\sim 300$  GB) em formato .mrc (FEI\_EPU) foram agrupados em um único arquivo e convertidos para arquivos IMAGIC (.img) para dar sequência ao processamento de dados.

Inicialmente foi necessária a realização do processo denominado “*a posteriori camera correction*”.<sup>152</sup> Os *frames* foram selecionados através dos critérios de densidade média (541, 618) e valores de desvio padrão (65,3; 68,7), procedendo-se com a correção da câmera. Esta etapa é utilizada para correção de imperfeições do detector que são recorrentes em todos os *frames* coletados.<sup>152</sup>

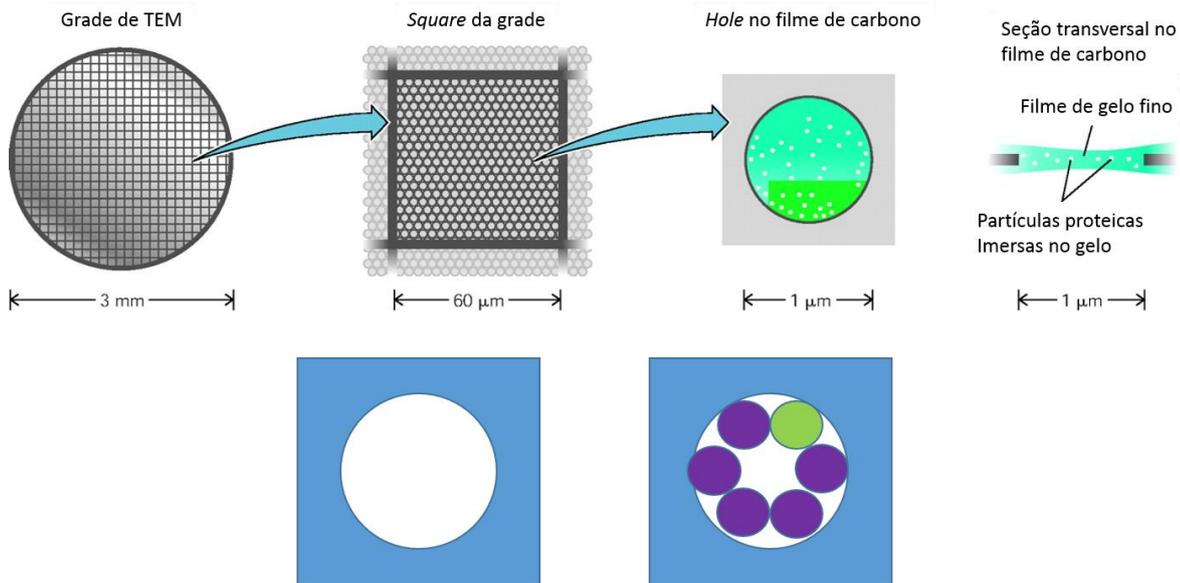


Figura 26 – Esquema de uma grade de microscopia: A grade de aproximadamente 3 mm possui cerca de 400 quadrados de aproximadamente 60 μm onde cada um possui inúmeros buracos de 1 μm onde é formado um filme fino de solução contendo a amostra de interesse. Abaixo, o esquema de como foram realizadas as coletas de dados, onde em um único buraco são coletadas 6 diferentes imagens de 7 frames cada uma. As imagens coletadas nas regiões em roxo foram em baixos valores de *defocus* (~ -1,5 μm), ou seja, coleta de alta resolução. Enquanto que a região representada em verde foi coletada em alto *defocus* (~ -3,5 μm), o que não leva a altas resoluções favorecendo o processamento dos dados.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez corrigidas as imperfeições da câmera, foi necessário alinhar os *frames* pertencentes a cada *movie*. Durante a aquisição de dados, são induzidos movimentos na amostra devido a sua interação com o feixe de elétrons. Dessa forma, os *frames* adquiridos possuem deslocamentos na ordem de ângstrons que interferem diretamente na resolução do conjunto de dados. Portanto, faz-se necessário um alinhamento dos *frames* para cada *movie*, incrementando a resolução do conjunto de dados.

Os 734 *movies* equivalem a 5138 *frames* agrupados a cada 7 *frames/movie* (aquisição dos dados). Para o alinhamento, inicialmente a dimensão dos *frames* foi reduzida por um fator 4, resultando em *frames* de 1024x1024 pixels, através de médias em áreas de 4x4 pixels. Esta operação atua como um filtro, melhorando o contraste nos *frames*, ao mesmo tempo que diminui o custo computacional de processamento, pela redução do número de pixels, facilitando o tratamento das imagens.

Os *frames* foram submetidos a um filtro de frequência do tipo passa-banda limitando as baixas frequências em aproximadamente 40 Å e não limitando as frequências superiores além de inverter a densidade das imagens, tornando assim as partículas “brancas”. Posteriormente, o alinhamento de cada 7 *frames* foi realizado através de deslocamento

translacional utilizando referências criadas pela soma total das imagens. Foram utilizadas 12 referências para o alinhamento pela função de correlação cruzada (CCF) selecionada permitindo um deslocamento máximo, em pixels, de 15.

Uma vez obtidas as coordenadas de alinhamento, essas foram equivalentemente aplicadas para o conjunto de dados não reduzidos (*frames* de 4096x4096 *pixels*) utilizando modo de operação bi linear. Os *frames* alinhados pelo passo descrito anteriormente, foram então filtrados utilizando um filtro passa-banda, limitando as baixas frequências em 30 Å, e tiveram suas transformadas de *Fourier* (FT) calculadas para a determinação da função de transferência de contraste (CTF). O processamento foi inteiramente realizado com o pacote de programa IMAGIC 4-D<sup>151</sup> conforme estratégia detalhada na figura 27-A.

A aquisição de dados no microscópio eletrônico de transmissão é feita em foco negativo, ou seja, *underfocus*. Diversos fatores de operação do microscópio, inclusive o valor do *defocus* utilizado, interferem diretamente no contraste da imagem, alterando a função de transferência de contraste (CTF), que reflete a mudança de fase do feixe de elétrons difratado com relação ao feixe direto. Essa função é mapeada no espaço recíproco (espaço de *Fourier* ou espaço de frequências) sendo oscilante e decrescente (Figura 27-B) e podendo ser obtida pela transformada de *Fourier* (FT) da imagem a ser analisada. Usualmente, no início do processamento de dados obtidos por microscopia eletrônica, as imagens adquiridas precisam ser corrigidas com relação à CTF.

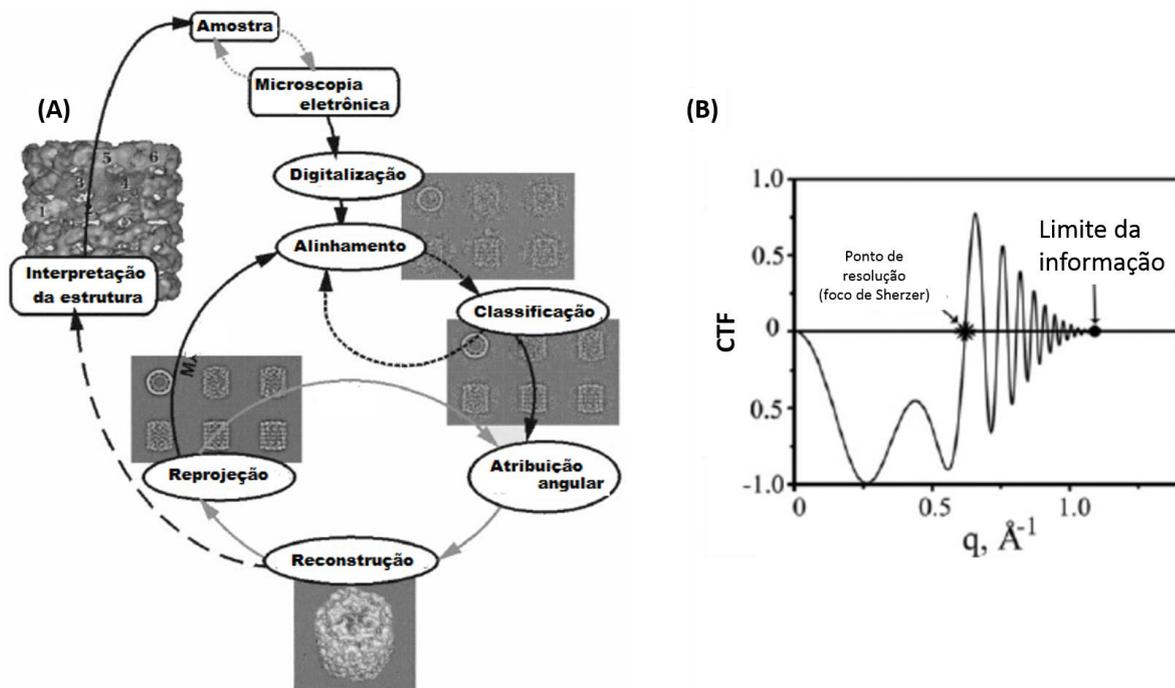


Figura 27 – Processamento de dados de TEM (A) Esquema da sequência de eventos da coleta e processamento de experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Os passos são iterativos e apresentam uma sequência previamente definida. (B) Esquema da função transferência de contraste. No espaço de frequências (espaço de *Fourier* ou espaço recíproco) a CTF é uma função que oscila e decresce até o limite de resolução dos dados coletados. Por possuir zeros e valores negativos, se faz necessário a correção da função e flipagem das fases nos dados a serem processados.

Fonte: Adaptada de HEEL.<sup>150</sup>

Os *frames* filtrados foram submetidos a FT e agrupados em *movies* (7 *frames/movie*). Para facilitar a visualização e análise, o centro da imagem (2048x2048 *pixels*) foi cortado e filtrado utilizando um filtro passa baixas frequências de 25  $\text{\AA}$  e, posteriormente, reduzidos por um fator 4 nas suas dimensões, permitindo assim a melhor visualização dos “*Thon Rings*” (oscilações da amplitude da FT).

Uma vez obtidos os dados no espaço recíproco, é feita a correção das imagens devido à presença da CTF. Isso é feito comparando-se a FT da imagem com a CTF teórica, obtida através dos parâmetros do microscópio eletrônico e da aquisição, variando-se os valores de *defocus*. Este procedimento foi realizado para cada imagem, utilizando os parâmetros conhecidos da coleta de dados (Tabela 3) e uma faixa de *defoci* entre 8.000 e 50.000  $\text{\AA}$ , aplicando-se uma máscara no espaço recíproco entre 0,2 - 0,9 e com um astigmatismo esperado em torno de 3.000  $\text{\AA}$ .

Com os valores obtidos dos parâmetros da CTF de cada imagem, foi possível realizar a correção das mesmas, obtendo-se assim os *movies* corrigidos para as próximas etapas do

processamento. Vale ressaltar que muitas vezes não é possível determinar os parâmetros da CTF, o que resulta no descarte da imagem. Sendo assim, restou um conjunto de dados de 401 *movies* para prosseguir com as análises.

Tendo sido corrigida a CTF das imagens, deu-se início ao *particle picking*, ou seja, reconhecimento das partículas de interesse em meio aos *movies* coletados. Inicialmente, o conjunto de dados foi dividido em duas partes, utilizando-se o valor de *defocus* como critério. As imagens cujo valor de *defocus* estavam próximas a  $-3,5 \mu\text{m}$ , denominadas *high-defocus*, foram separadas (55 imagens) e utilizadas para o início do *particle picking*.

Algumas partículas em diferentes orientações foram manualmente selecionadas e extraídas dos *movies* e serviram de referência para a busca e identificação das demais partículas no conjunto de dados de alto *defocus*. Foi gerado um conjunto de referências onde cada partícula selecionada deu origem a 36 outras, giradas com espaçamento de  $10^\circ$ . Este conjunto de referências foi comparado com outras possíveis partículas do conjunto de dados, utilizando-se o máximo da função de correlação cruzada (*cross-correlation function*, CCF) para a identificação de partículas.

As partículas encontradas foram então selecionadas pelos valores de correlação com as referências utilizadas e devio padrão dos valores de intensidades, resultando em um conjunto de 19.269 partículas que, por sua vez, foram reduzidas por um fator 2 nas suas dimensões, para facilitar o processamento de dados e posteriormente filtradas com um filtro passa-banda de 1 a  $15 \text{ \AA}$ . Em seguida, foi aplicada uma máscara circular de raio 0,8 nas partículas, e estas foram submetidas à classificação utilizando a metodologia de MSA (*Multivariate Statistical Analysis*).<sup>150</sup>

Uma das metodologias para o processamento de dados de análise de partículas isoladas é a conhecida como MSA, ou análise estatística multivariada, onde o conjunto de dados é representado através de suas componentes principais (análise de componentes principais - PCA). Dessa forma, obtêm-se uma base na qual as partículas podem ser representadas através da combinação linear dos seus autovetores (*eigenimages*). As partículas, agora representadas como pontos em um espaço hiperdimensional, são categorizadas em classes, de modo a possibilitar a soma de partículas similares, obtendo-se uma imagem média dessas classes (*classsums* ou *class averages*).<sup>150</sup>

A utilização das *class averages* se faz necessária pelo baixo contraste sinal das partículas em relação ao ruído presente nas imagens, possibilitando uma melhor visualização e análise dos dados.

As 10.100 partículas previamente selecionadas foram analisadas por MSA e

classificadas em 250 classes utilizando as 100 *eigenimages* obtidas. Dessas *class averages* obtidas, aquelas que apresentavam partículas claramente visíveis em diferentes orientações foram escolhidas e um total de 25 *classsums* foram utilizadas para gerar um primeiro modelo.

Utilizando as *classsums* selecionadas, um modelo inicial foi gerado através de um processo de atribuição angular que é iniciado com ângulos aleatórios e em seguida são alterados buscando-se maximizar a semelhança entre as *classsums* e as reprojeções do modelo obtido. Para isso, foi imposta a simetria D5, ou seja, um eixo de ordem 5 perpendicular a cinco eixos de ordem 2, característica da simetria de um pentâmero de dímeros (como a SclA) cuja estequiometria com o tRNA<sup>Sec</sup> e SclD é mantida como o mencionado anteriormente.

A atribuição angular visa criar vínculos entre as *classsums* e atribuindo-se coordenadas angulares ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Essa atribuição angular é utilizada para uma reconstrução de um modelo que por sua vez pode ser convertido em um arquivo .mrc e visualizado no software *Chimera* 1.9.10.<sup>124</sup>

O resultado obtido é filtrado para se obter um modelo de baixa resolução. Reprojeções equidistantes de 7 graus desse modelo são, então, utilizadas como novas referências para a atribuição angular. Assim, um novo modelo foi gerado baseado nessa atribuição angular inicial o que possibilitou uma melhor estimativa dos ângulos e, conseqüentemente, melhora no modelo estrutural.

Novamente, esse modelo foi filtrado em baixas frequências e suas reprojeções foram utilizadas novamente como referência, mas agora para uma nova etapa de *particle picking*. O processamento de dados consiste em um processo iterativo onde em cada ciclo há uma melhora no alinhamento e atribuição angular das partículas, acarretando em um ganho de resolução.

O novo *particle picking* resultou em 18.940 partículas após seleção, que tiveram os mesmos passos de processamento mencionado nas seções anteriores. Ao final da nova classificação, as partículas pertencentes às melhores *classsums* foram selecionadas e uma nova classificação foi realizada a fim de melhorar as *eigenimages* e, conseqüentemente, as *classsums*. As novas *classsums* tiveram nova atribuição angular utilizando os valores previamente determinado no ciclo anterior, o que permitiu uma nova reconstrução como o descrito na seção anterior.

### 3.11 Análises de interação *in vivo*

Dada a dificuldade da realização de ensaios *in vivo* em sistema bacterianos, foram propostos experimentos de complementação funcional para a determinação da função do domínio N-terminal de SelA. Além disso, experimentos de duplo-híbrido dirigido foram realizados para a determinação das interações macromoleculares das proteínas pertencentes à via de biossíntese de Sec em *E. coli*.

#### 3.11.1 Construção de truncamentos de *selA* – amplificação e clonagem

A fim de elucidar a importância do domínio N-terminal de SelA de *E. coli*, uma construção truncada foi gerada a partir da amplificação do gene *selA* presente no vetor de expressão pET29a(+) utilizando os oligonucleotídeos mostrados abaixo. O oligonucleotídeo sintetizado retira a hélice  $\alpha_1$  de SelA, predito pelo alinhamento realizado junto à sequência de SelA de *A. aeolicus* cuja estrutura cristalográfica foi resolvida.<sup>93</sup>

SelA<sub>T</sub> - *forward* 5' – CATATGGCTATTGATCGCTTATTG – 3'

SelA - *reverse* 5' – GCGGCCGCTCATTTCACAACATCTCC – 3'

A amplificação se deu como o descrito previamente<sup>94-95,100-104</sup> e a clonagem foi realizada novamente em vetor pET29a(+) para que as análises comparativas fossem realizadas. Posteriormente, as construções *selA*-pET29a(+) (controle positivo), pET29a(+) fechado (controle negativo) e o truncamento  $\Delta 1-28$  *selA*-pET29a(+) foram transformadas nas cepas específicas de clonagem (*E. coli* DH5- $\alpha$ ), de expressão (*E. coli* WL81460) e de complementação funcional (*E. coli* JS1).

#### 3.11.2 Ensaios de complementação funcional e estado conformacional dos truncamentos de SelA

Para verificar a importância funcional do domínio N-terminal de SelA, ensaios de complementação funcional foram realizados de acordo com protocolo previamente estabelecido em nosso grupo de pesquisa.<sup>60</sup> Brevemente, a cepa *E. coli* JS1 ( $\lambda$ DE3), que é uma cepa bacteriana deficiente no gene *selA*, foi transformada com a construção *selA*-pET29a(+) (controle positivo), pET29a(+) fechado (controle negativo) e o truncamento  $\Delta 1-28$

*selA*-pET29a(+). Essa cepa foi plaqueada em meio LB contendo ampicilina [25 µg/mL] suplementado com 1 mM de selenito de sódio na presença de 1 mM de DTT, o que produziu seleneto. As placas de *Petri* foram mantidas em condições anaeróbicas por 48 horas à 30 °C e, posteriormente, submetidas ao ensaio de atividade da selenoproteína formato desidrogenase (FDH H), através da adição de 1 mM de benzil-viologênio em Soft-LB ágar, o qual foi plaqueado sobre as colônias à 28 °C. As placas foram retornadas à condição de anaerobiose por mais 10 min e, posteriormente, fotografadas.

Paralelamente, a construção  $\Delta$ 1-28 *selA*-pET29a(+) foi transformada em cepa *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ DE3) para ensaios de expressão e purificação seguindo protocolo idêntico ao exemplificado na seção 3.2.1. A verificação do estado oligomérico foi realizada por cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex* 200 (10/300) e eletroforese nativa utilizando gel comercial 8-25 no sistema PhastSystem (GE).

### **3.11.3 Ensaio de interação das proteínas da via de incorporação de Sec em *E. coli* por meio de análises de Duplo-Híbrido dirigido em *S. cerevisiae***

A técnica de Duplo-Híbrido (DH) em levedura (*yeast 2-hybrid system*) é comumente utilizada para a identificação de interação entre proteínas *in vivo*.<sup>153-154</sup> Por se tratar de um método extremamente sensível é utilizado para a identificação de domínio ou mesmo resíduos específicos responsáveis pela interação.<sup>154</sup>

Essa metodologia se baseia na estrutura de um fator de transcrição particular que possui dois domínios fisicamente separados: o domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain*, DBD) e o domínio de ativação da transcrição (*Activation domain*, AD). O primeiro é específico pelo reconhecimento de uma sequência promotora que se situa no início de um gene repórter. Enquanto isso, o AD é responsável por recrutar os componentes críticos do complexo de iniciação de transcrição (Figura 28).

Nos ensaios de DH dirigido, uma das proteínas de interesse, denominada isca, é fusionada ao DBD e a outra proteína a ser analisada é fusionada ao AD, denominada presa. Em caso de interação entre isca e presa, um fator de transcrição funcional completo é reconstituído e o gene repórter, codificante para  $\beta$ -galactosidase, será ativado para expressar a enzima em questão.<sup>154</sup> Em caso de interação, a enzima  $\beta$ -galactosidase expressa degrada o substrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) adicionado ao meio de cultivo celular, o que resulta em 5-bromo-4-cloro-3-indoxil que ao ser exposto ao ar sofre uma oxidação e se dimeriza, formando o corante azul 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo. A

força com que ocorre a interação é analisada pela intensidade de azul formada ao se submeter ao ensaio de DH.

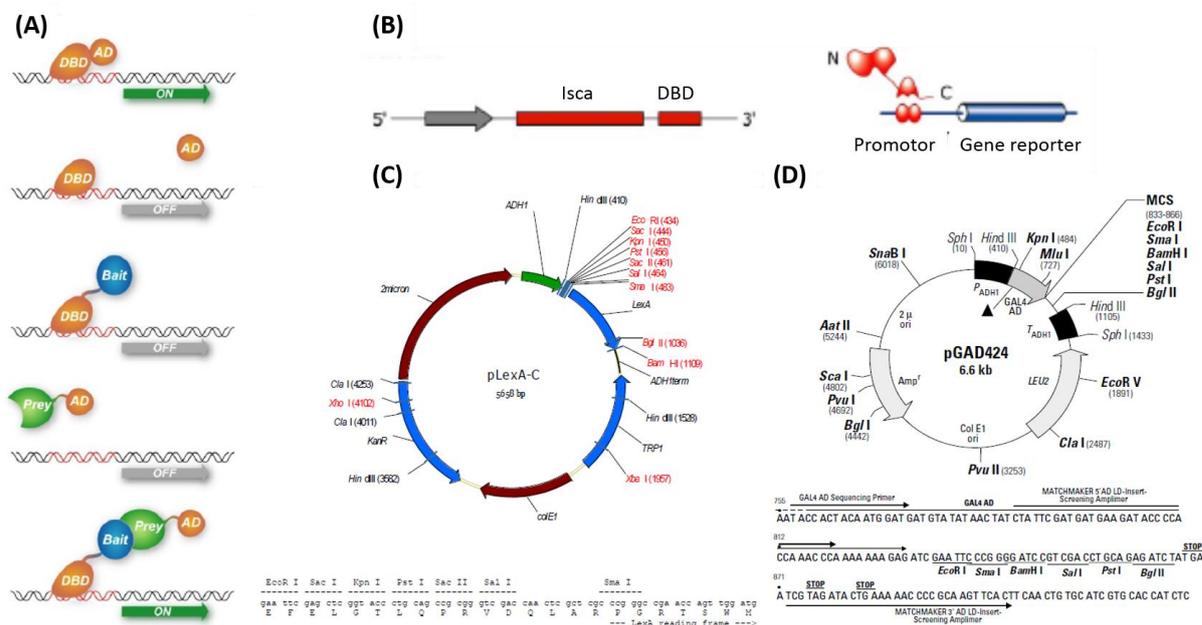


Figura 28 – Esquema geral da técnica de duplo-híbrido dirigido. (A) Modelo da interação da quimera DBD+isca e ativação após a interação AD+presa do gene reporter. (B) Esquema da organização gênica e de interação da isca localizada no C-terminal com o promotor. (C) Mapa do vetor pLexA-C. (D) Mapa do vetor pGAD-424.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ensaios de DH dirigido 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, *S. cerevisiae*, organismo no qual os ensaios foram realizados, possui um tRNA<sup>Sec</sup> 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.<sup>155-</sup>

156

Inicialmente, foram desenhados oligonucleotídeos, representados abaixo, para a amplificação dos genes codificantes para SerRS, SelA, CsdB, SelD e SelB, ou seja, todas as proteínas participantes da via de biossíntese de Sec em *E. coli*. Estas amplificações foram posteriormente clonadas nos vetor pLEXA-C (vetor isca), que produz uma quimera fusionada ao domínio C-terminal do gene isca (“isca+lexA”) onde lexA é o DBD, e o vetor pGAD-424 (vetor presa), que produz uma *chimera* fusionada à porção N-terminal do gene presa (“AD+presa”).

i. *serRS*:**Isca (pLEXA-C) – ERs (EcoRI e Sall):**SerRS\_Isca\_For\_EcoRI: 5' **GGAATTC** ATGCTCGATCCCAATCTGCTGCG 3'SerRS\_Isca\_Rev\_Sall: 5' **ACGCGTCGAC**GCCAATATATTCCAGTCCGTTC 3'**Presca (pGAD-424) – ERs (EcoRI e Sall):**SerRS\_Presca\_Rev\_Sall: 5' **ACGCGTCGAC** **TAGTTA**GCCAATATATTCCAGTCCGTTC 3'ii. *selA*:**Isca (pLEXA-C) – ERs (EcoRI e Sall):**SelA\_Isca\_For\_EcoRI: 5' **GGAATTC**ATGACAACCGAAACGCGTTCCC 3'SelA\_Isca\_Rev\_Sall: 5' **ACGCGTCGAC**TTTCAACAACATCTCCAAAACCG 3'**Presca (pGAD-424) – ERs (EcoRI e Sall):**SelA\_Presca\_Rev\_Sall: 5' **ACGCGTCGAC****TAATCA**TTTCAACAACATCTCCAAAACCG3'iii. *csdB*:**Isca (pLEXA-C) – ERs (EcoRI e PstI):**CsdB\_Isca\_For\_EcoRI: 5' **GGAATTC**ATGATTTTTCCGTCGACAAAGTGCGGG 3'CsdB\_Isca\_Rev\_PstI: 5' **AAA****ACTGCAG**TCCCAGCAAACGGTGAATACG 3'**Presca (pGAD-424) – ERs (EcoRI e PstI):**CsdB\_Presca\_Rev\_PstI: 5' **AAA****ACTGCAG****TGATTA**TCCCAGCAAACGGTGAATACG 3'iv. *selD*:**Isca (pLEXA-C) – ERs (EcoRI e PstI):**SelD\_Isca\_For\_EcoRI: 5' **GGAATTC**ATGAGCGGAGAACTCGATTCG 3'SelD\_Isca\_Rev\_PstI: 5' **AAA****ACTGCAG**ACGAATCTCAACCATGGCACG 3'**Presca (pGAD-424) – ERs (EcoRI e PstI):**SelD\_Presca\_Rev\_PstI: 5' **AAA****ACTGCAG****TAATTA**ACGAATCTCAACCATGGCACG 3'v. *selB*:**Isca (pLEXA-C) – ERs (EcoRI e Sall):**SelB\_Isca\_For\_EcoRI: 5' **GGAATTC**ATGATTATTGCGACTGCCGGACACG 3'SelB\_Isca\_Rev\_Sall: 5' **ACGCGTCGAC**TTTTTCCGGAAATAATAATGCG 3'**Presca (pGAD-424) – ERs (EcoRI e Sall):**SelB\_Presca\_Rev\_Sall: 5' **ACGCGTCGAC****TAATTA**TTTTTCCGGAAATAATAATGCG 3'

As regiões em azul consistem na proteção desenhada para cada oligonucleotídeo, em vermelho tem-se os sítios de clivagem das enzimas de restrição específicas (ERs) e em verde a adição de códon de parada.

Como essa via bioquímica específica é amplamente estudada no grupo liderado pelo Prof. Dr. Otavio Thiemann, a amplificação dos genes de interesse para clonagem nos vetores específicos se deram através de PCR utilizando procedimento semelhante ao descrito na Seção 3.3.1 e os experimentos de biologia molecular foram realizados em colaboração com a aluna Jéssica Fernandes Scortecci.

A PCR se iniciou com o aquecimento a 94 °C por 90 s para a completa desestabilização de eventuais elementos de estrutura secundária, os ciclos posteriores consistem em um passo de incubação a 94 °C por 30 s seguido de anelamento a 55 °C por 45 s e, por fim, um passo de alongação a 72 °C por 45 s. Repetido esse ciclo por 35 vezes, a amostra foi então incubada a 4 °C para preservação e posterior utilização. Foram utilizados os DNAs plasmidiais codificantes para cada uma das proteínas de interesse como DNA molde para a PCR: *serRS*-pJET1.2, *selA*-pET29a(+), *csdB*-pUC118, *selD*-pET28a(+), e *selB*-pT7-6, gentilmente doados por Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP), Dra. Livia Regina Manzine (IFSC/USP), Prof. Dr. Hisaaki Mihara (Tokyo University, Japão) Jéssica Fernandes Scortecci (IFSC/USP) e Profa. Dra. Marina Rodnina (Max Planck Institute, Alemanha), respectivamente.

Após a amplificação, o resultado da reação foi submetido à purificação através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo SYBR<sup>®</sup> Safe a 90 V, 400 mA, 50 min. O resultado foi observado em transluminador a 470 nm e os fragmentos de interesse foram recuperados utilizando o kit comercial *Wizard<sup>®</sup> SV Gel* (Promega). As quantificações foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no modo DNA50 com água mili-Q autoclavada como referência.

Todas as construções foram então clonadas em vetor de propagação comercial pJET1.2/*blunt* (Thermo Fisher Scientific). Para essa reação foram utilizados 3,0 µL do recuperado do gel de agarose 1%, 1,0 µL do vetor de propagação, 1,0 µL da enzima T4 DNA-ligase e 5,0 µL do seu tampão (Rapid Ligation Buffer 2x) deixando incubar overnight a 16 °C.

Após esta etapa, foi realizado o processo de transformação em células de propagação competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Um volume de 100 µL da suspensão bacteriana foi adicionado à reação de ligação e a mistura foi incubada no gelo por 30 min. Em seguida, foi realizada incubação em temperatura ambiente por 2 min. Aproximadamente 0,85 mL de meio LB líquido foi adicionado à mistura, seguido de incubação durante 1 hora a 37 °C sob agitação.

Após esse período, a cultura foi centrifugada por 60 s, o sedimento foi ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de LB líquido e a mistura foi plaqueada em meio seletivo (Agar LB suplementado com ampicilina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubado a 37 °C por 16 h.

As colônias resultantes foram colocadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina [200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] por 16 h sob agitação e, posteriormente, tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos através do kit comercial *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit* (Cellco). Após quantificação, aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial foram digeridos pelas ERs fast-digest (Fermentas) por 2 h à 37 °C. As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose 1% e o fragmento contendo o tamanho do inserto desejado e digerido foi recuperado do gel de agarose utilizando mesmo protocolo descrito acima.

Por fim, os insertos foram ligados aos vetores pLEXA-C e pGAD-424 previamente digeridos com as mesmas ERs, utilizando protocolo idêntico ao mencionado anteriormente. Os vetores ligados aos insertos foram então transformados novamente em *E. coli* DH5 $\alpha$  e, após crescimento das colônias bacterianas e seleção das mesmas em meio contendo os antibióticos específicos. As ligações foram confirmadas através de digestão utilizando as ERs específicas e sequenciamento do DNA plasmidial utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada vetor. O resultado da extração do DNA plasmidial foi quantificado e utilizado para a transformação nas células de levedura, etapas essas realizadas em colaboração com a Dra. Ana Paula Ulian de Araújo e suas alunas, Heloísa Ciol e Raíssa Gutierrez.

A linhagem de *S. cerevisiae* utilizada foi a L40 (MAT $\alpha$  leu2 his3 trp1ade2 GAL4 gal80 LYS2::(lexAop)4-HIS3 URA3::(lexAop)s-lacZ). As células foram crescidas em meio YPD sólido por estriamento durante 3 dias à 30 °C. Posteriormente, uma colônia grande e isolada de L40 foi dissolvida em 50  $\mu\text{L}$  de H $_2$ O milli-Q e inoculada em 50 mL de meio YPD líquido por 24 h à 30 °C com 150 rpm de agitação. Após 24 h de crescimento, 1 mL do inóculo foi centrifugado por 3 min à 500 rpm e temperatura ambiente. As células foram então ressuscitadas em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de transformação (1340  $\mu\text{L}$  PEG 4000 50%; 200  $\mu\text{L}$  LiAc (2M); 200  $\mu\text{L}$  TE 10X; 200  $\mu\text{L}$  DTT (1M); 200 ng de DNA plasmidial com os genes de interesse). Após este procedimento, as células foram incubadas por 40 min a 45 °C, centrifugadas por 5 min a 3.000 rpm, em temperatura ambiente. Novamente, as células foram plaqueadas em meio SD-W sólido e incubadas por um período de 3-4 dias à 28 °C.

Após esse período, uma colônia foi selecionada e diluída em 50  $\mu\text{L}$  de H $_2$ O Milli-Q, plaqueada por estriamento e novamente incubada por 3-4 dias à 28 °C. O teste de atividade da  $\beta$ -galactosidade se deu utilizando papel filtro umedecido em 5 mL de tampão de transformação, 13,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol e 83,5  $\mu\text{L}$  de X-Gal. O mesmo é levemente

pressionado contra as colônias da placa e cuidadosamente retirado e congelado em nitrogênio líquido por 5 min. O papel filtro foi retirado e incubado à 37 °C por 1 h, tempo necessário para resultado do ensaio.

Ensaio de autoativação do sistema foram feitos como controles, onde somente um dos vetores contendo o inserto de interesse foi transformado. A quantificação se deu utilizando os plasmídeos controles pLexA-p53 e pACT-largeT (DualSystems Biotech) através dos mesmos protocolos descritos. Foi realizada a dupla confirmação através da utilização de 25 ensaios em triplicata biológica, onde todas as combinações de interação da via de biossíntese de Sec foram consideradas.



*Capítulo IV*  
*RESULTADOS E DISCUSSÕES*

*“Ter sucesso é falhar repetidamente, mas sem perder o entusiasmo”*

**Winston Churchill**

30 de Novembro de 1874 – 24 de Janeiro de 1965

Político britânico



As enzimas da via de biossíntese e incorporação de Sec vêm sendo estudadas desde o final da década de 80, onde informações fundamentais foram obtidas por vários pesquisadores, incluindo esforços do grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Otavio H. Thiemann.

Desse modo, os resultados que são apresentados nesse capítulo visam colaborar com os resultados obtidos anteriormente além de revelar uma nova proposição de modelos de interação e compreensão da via de incorporação de selênio para o organismo em questão. Também visa prospectar possíveis hipóteses sobre a funcionalidade de regiões específicas das macromoléculas utilizando diferentes técnicas biofísicas e estruturais.

#### **4.1 Análises *in silico*, a estrutura de SelB e seus domínios de interação**

No início desse projeto, em 2013, poucas informações estruturais haviam sido determinadas para SelBs de diferentes organismos. Deste modo, modelos estruturais teóricos foram construídos para melhor compreensão dessa macromolécula.

##### **4.1.1 Modelos estruturais de SelB de *E. coli***

Na ausência de estruturas cristalográficas da construção inteira (*full-length*) de SelB, foi adotada uma abordagem de modelagem por domínios isolados fragmentando a sequência de SelB de *E. coli*. Inicialmente, o domínio N-terminal, domínio GTPásico canônico, foi modelado a partir da estrutura do fator de alongação EF-Tu de *Escherichia coli* (PDB ID 1DG1) enquanto que o domínio C-terminal possuía construção truncada, o que permitiu a utilização de modelagem comparativa baseada na estrutura de SelB de *E. coli* (PDB ID 2UWM). A figura 29-A mostra o modelo estrutural de SelB de *E. coli* representado em fitas, colorido por WHDs, onde azul é o domínio N-terminal GTPásico, canônico para EFs, os barrís- $\beta$  pertencentes ao WHD2 em verde e os WHDs 3 e 4 em amarelo e vermelho, domínio de conexão entre as regiões N e C-terminais, respectivamente, onde a WHD4 é responsável pela interação ao elemento SECIS (Figura 29-B).

Uma vez que o modelo foi fusionado manualmente, a validação das posições dos ângulos ( $\phi$  e  $\psi$ ) foi realizada pelo diagrama de *Ramachandran* (Figura 29-C), onde 561 (94,76%) estão em regiões favoráveis do diagrama e 9 (1,52%) estão fora das regiões permitidas. Esses 9 resíduos (V212, N213, P215, M216, V260, P262, T266, R267 e E351) estão todos presente no WHD2, representado em verde, e fazem parte das conexões entre os

dois barrís- $\beta$ . Essa região da molécula teve dificuldade em ser modelada por não haver informações estruturais concretas sobre esse domínio até esse momento.

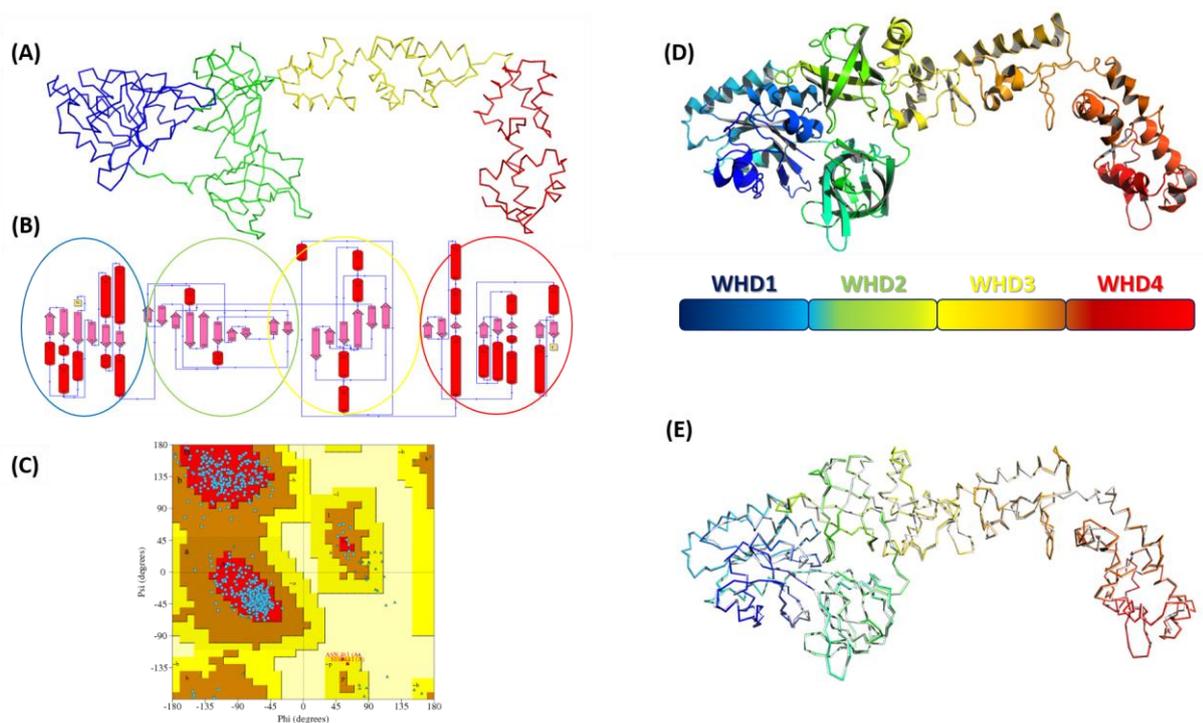


Figura 29 – Modelagem molecular de SelB (A) Modelo estrutural de SelB de *E. coli* obtido a partir de fragmentação da sequência e busca por modelos homólogos. (B) Esquema topológico da estrutura de SelB dividida em 4 domínios (WHDs 1-4). (C) Diagrama de *Ramachandran* do modelo construído por fragmentação evidenciando 94,76% dos resíduos em regiões favoráveis e apenas 1,52% em regiões não permitidas. (D) Estrutura de SelB de *E. coli* obtida através de modelagem por homologia utilizando a estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* (PDB.ID 4ZU9) e representada pelas estruturas secundárias e colorida por domínios. (E) Sobreposição das estruturas do modelo de SelB de *E. coli* obtidos pela modelagem por homologia (colorida por domínios) da sequência *full-length* e a Estrutura cristalográfica de *AaSelB* (branco) obtendo rmsd 0,487 Å.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em 2015, a estrutura cristalográfica de SelB de *Aquifex aeolicus* (*AaSelB*), uma bactéria termofílica cuja sequência de SelB apresenta 28% de identidade e 98% de cobertura em comparação com SelB de *E. coli*, foi resolvida por cristalografia de raios-X. Apesar da baixa identidade, essa era a única estrutura obtida experimentalmente que apresentava a construção com a sequência completa de SelB. Assim, foi utilizada como molde para obtenção de um modelo estrutural por homologia (Figura 29-D). A divisão dos domínios é a mesma apresentada anteriormente, com a exceção do posicionamento relativo das WHDs 2 e 3, o que posteriormente vai ser evidenciado como essencial para a interação com o tRNA específico. A superposição dos modelos tridimensionais (Figura 29-E) apresenta valor rmsd

favorável (0,478 Å), o que corrobora com a qualidade do modelo obtido. Os modelos dos complexos macromoleculares dos quais SelB faz parte, bem como a comparação entre as estruturas de SelBs e EFSec de diferentes organismos, foram realizados através de superposições e alinhamentos estruturais utilizando o modelo obtido pela modelagem comparativa.

#### 4.1.2 Modelos dos complexos macromoleculares

Recentemente, estruturas de EFs específicos para a incorporação de Sec foram resolvidas por diferentes técnicas estruturais, o que permitiu a comparação entre SelBs e EFSec. Deste modo, o modelo de SelB de *E. coli* foi comparado: i) ao fator de alongação canônico de *E. coli* (EF-Tu, PDB.ID 3FIC), ii) à SelB de arqueia (PDB. ID 4ACB) e iii) ao EFSec humano (PDB. ID 5IZK), representados em preto, azul, amarelo e lilás na figura 30, respectivamente. Os modelos estruturais foram alinhados pelo domínio N-terminal, comum a todos.

Interessantemente, o alinhamento com EF-Tu possibilita inferir não somente o domínio de interação ao L11 ribossomal, mas também demonstra o posicionamento do domínio C-terminal relativo ao possível sítio-A, como será apresentado a seguir. As comparações com SelB de arqueia e o EFSec humano mostram uma divergência de orientação nas WHDs 2 e 3, e como esses dois EFs não reconhecem o elemento SECIS diretamente, não existe a WHD4. Para ambas as moléculas, as WHDs 3 são essenciais para a interação ao tRNA<sup>Sec</sup>. No entanto, possuem orientação voltada para a região de interação ao ribossomo, fato esse ainda não explicado, uma vez que a existência de SBP2 foi comprovada em eucariotos, mas ainda não elucidada para arqueias, deve interferir nessa orientação e permitir o acesso ao sítio-A do ribossomo sem que essa WHD afete a interação.

Comparativamente, as proteínas SelB de arqueia e EFSec possuem mesma orientação tridimensional relativa de WHD3, divergindo de SelB bacteriano onde WHD 3 e 4 apontam para o lado oposto. O posicionamento da WHD4 de SelB bacteriano é discutido a seguir com as análises dos complexos macromoleculares com o ribossomo e elemento SECIS. Além disso, a sobreposição com o fator de terminação (release factor, PDB.ID 2WRI) apresentou-se igual ao EFSec e, portanto, não apresentado na figura a seguir.

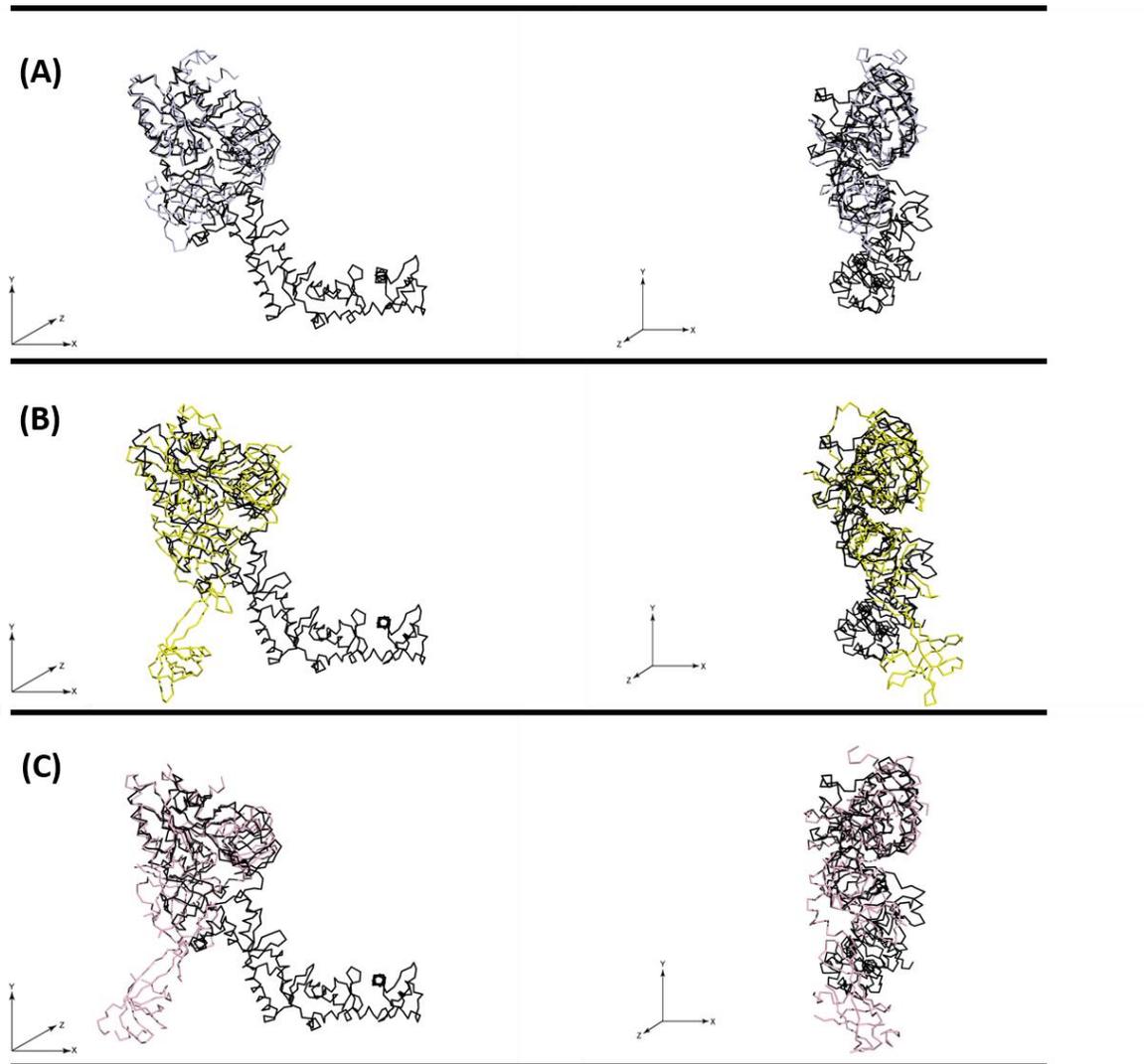


Figura 30 – Comparação estrutural entre SelBs de bactéria e arqueia e EFSec humano (A) Modelo estrutural de SelB de *E. coli* sobreposto com EF-Tu bacteriano (azul). (B) Sobreposição com SelB de arqueia (amarelo) evidenciando o posicionamento divergente das WHDs 3 e 4. (C) Sobreposição estrutural com EFSec humano (lilás) semelhante à SelB de arqueias.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo estrutural de SelB foi alinhado tridimensionalmente, através do seu domínio N-terminal, com a estrutura cristalográfica do EF-Tu também de *E. coli* (PDB.IDs 3FIC e 1MJ1). Ambas as estruturas foram resolvidas em complexo com as subunidades ribossomais e com um tRNA<sup>fMet</sup> presente no sítio-A. O tRNA<sup>Sec</sup> (PDB.ID 3A3A) alinhado com o tRNA contido no sítio-A mostrou as interfaces de contato entre o tRNA específico para incorporação de Sec e SelB (Figura 31-A).

Através do modelo do complexo binário SelB.tRNA<sup>Sec</sup> fica claro a especificidade de interação de SelB com os braços acceptor e T $\psi$ C através da WHD1. Além disso, pela primeira vez é observada a possível interação do braço variável longo com a WHD3. Essa informação

foi utilizada no desenvolvimento do projeto de mestrado do aluno Adriano de Freitas Fernandes, que demonstrou pela primeira vez em solução e experimentalmente a especificidade de SelB para interação com esses três elementos estruturais do tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>72,110</sup> Estudos publicados recentes mostraram a importância desse domínio do tRNA para sua especificidade,<sup>72,110</sup> corroborando com esses modelos propostos no início desse projeto de doutorado.

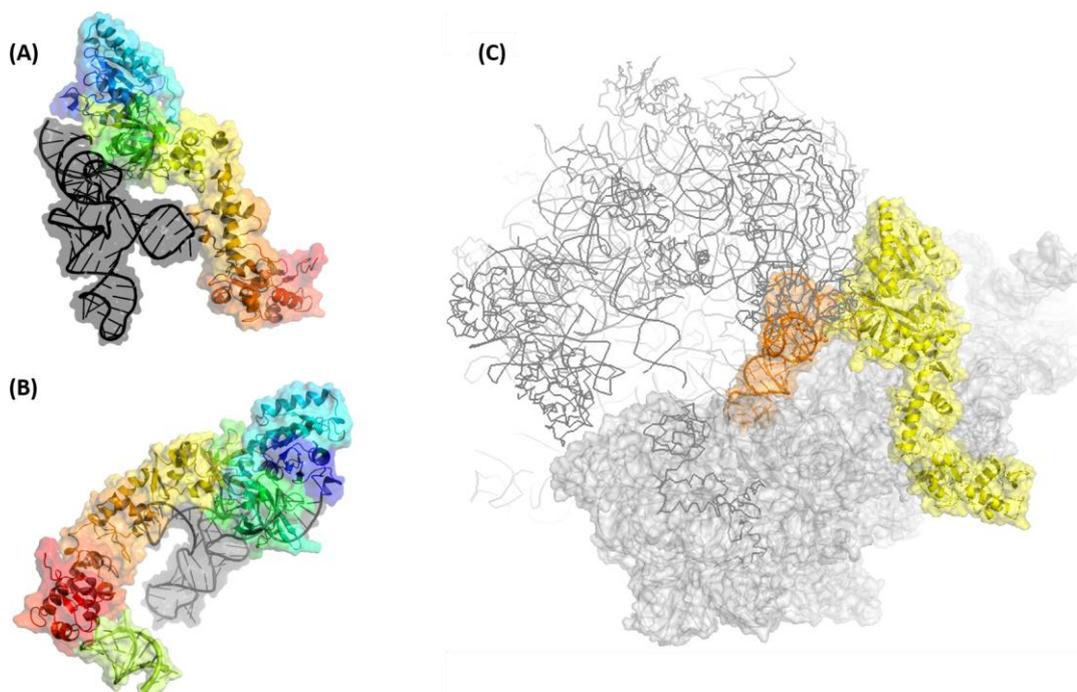


Figura 31 – Modelos estruturais dos complexos macromoleculares de SelB. (A) Modelo de interação de SelB.tRNA<sup>Sec</sup> (em preto) mostrando a importância do braço variável interagente com a WHD3. (B) Modelo do complexo ternário SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (em verde), a distância determinada do último nucleotídeo de SECIS à posição *wobble* do tRNA foi de 76 Å, ou seja, 11 nucleotídeos, como descrito na literatura.<sup>72</sup> (C) Modelo estrutural do complexo ternário na entrega do tRNA<sup>Sec</sup> ao ribossomo. SelB é representada em amarelo, o tRNA<sup>Sec</sup> em laranja e o ribossomo em cinza (30S em superfície e 50S em fita).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A formação do complexo ternário, SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS, mostrada na figura 31-B, foi realizada pelo alinhamento da porção C-terminal em complexo com um fragmento do *loop*-apical. Esta porção foi resolvida por um truncamento realizado no resíduo F487 (PDB.ID 2PJP). Nota-se que o último nucleotídeo do *loop*-apical do elemento SECIS (G12) e a posição *wobble* do tRNA<sup>Sec</sup> (A35) estão distanciados por 76 Å e, como cada ligação fosfodiéster se distancia de 6 Å cada, esses dois RNAs estão separados por 11 nucleotídeos. Esse espaçamento presente no elemento SECIS bacteriano entre o *loop*-apical e o UGA-códon (Figura 14), foi descrito previamente na literatura.<sup>115-116</sup>

A construção do modelo de interação com o ribossomo procariótico foi realizada

utilizando a estrutura obtida por crio-microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM) do ribossomo em complexo com o EF-Tu juntamente com o tRNA<sup>fMet</sup> (PDB.ID 1MJ1). Dessa forma, foi possível inferir o posicionamento do complexo ternário junto ao ribossomo, como previamente proposto por Itoh e colaboradores<sup>70</sup> e recentemente elucidadas por Cryo-EM em diferentes estados conformacionais na entrega de Sec ao sítio-A do ribossomo (Figura 31-C).<sup>72</sup> Esses resultados corroboram com os modelos propostos e serão utilizados nas discussões sobre a formação dos complexos em solução apresentados nas seções subsequentes.

## 4.2 Expressão e purificação das amostras proteicas de interesse

As amostras proteicas foram obtidas através de expressão homóloga em sistema procariótico, *E. coli*. As amostras passaram por etapas de purificação e confirmação da ausência de contaminantes endógenos que são apresentadas nos tópicos a seguir.

### 4.2.1 Homodecâmero SelA

Seguindo o protocolo estabelecido em nosso grupo de pesquisa pela Dra Livia Regina Manzine, foi utilizada para a expressão da proteína recombinante SelA a cepa bacteriana *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ DE3) contendo o gene *selA* de *Escherichia coli* clonada em vetor de expressão pET29a(+). Vale ressaltar que o uso dessa cepa bacteriana foi estabelecido previamente pelo fato de se tratar de uma cepa deficiente no gene *selC* e, portanto, não produzindo o tRNA<sup>Sec</sup> passível de ser copurificado com a amostra de interesse.

Após as etapas de lise celular e as etapas de precipitação com sais inorgânicos seguido de cromatografia de dessalinização em coluna *HiTrap Desalting* (Figura 32-A), a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 HL (16/60)* após a adição de 20% em concentração final de Nycodenz<sup>®</sup> (Figura 32-B). O resultado de cada etapa de purificação, bem como o grau de pureza de SelA, foi monitorado através de SDS-PAGE 15% (Figura 32-C).

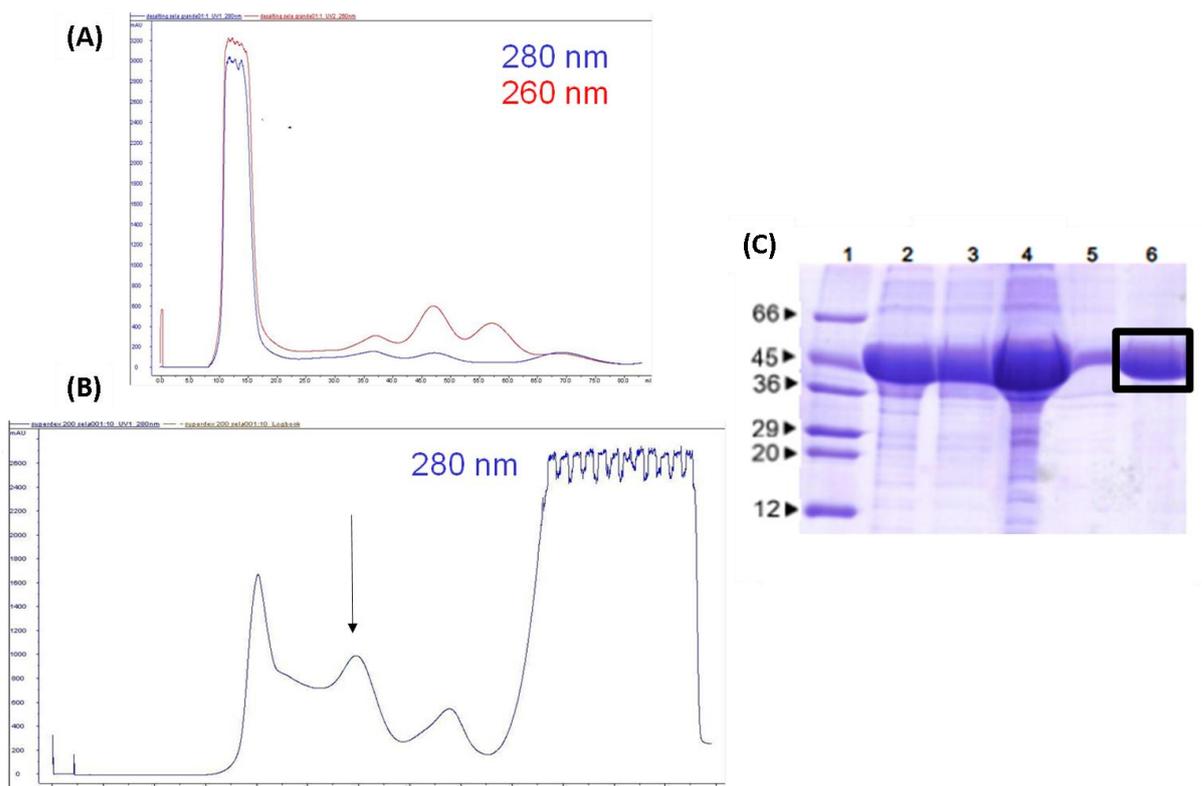


Figura 32 - Etapas de purificação de SelA. (A) Dessalinização em coluna *HiTrap Desalting* com monitoramento em 280 e 260 nm. (B) Exclusão molecular em coluna *Superdex 200 HL (16/60)* com monitoramento em comprimento de onda de 280 nm. A seta indica o pico referente a SelA. (C) SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna *HiTrap Desalting*; 4) amostra com Nycodenz<sup>®</sup> concentrada a 2 mL; 5) amostra eluída da coluna de exclusão molecular; 6) amostra eluída concentrada (concentrador de corte de 100 kDa).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A amostra de SelA foi então concentrada até aproximadamente 30 mg/mL, ou seja, um rendimento total de aproximadamente 15 mg de proteína recombinante para cada litro de cultura utilizada.

#### 4.2.2 O fator de alongação específico SelB. Determinação de um novo protocolo de purificação. Presença de RNAs endógenos copurificados e amostra GTP/GDP<sub>free</sub>

O EF para incorporação de Sec vem sendo estudado desde meados da década de 90, no entanto, sempre apresentou baixo rendimento quando purificado.<sup>107</sup> Devido a isso, experimentos que demandavam elevadas concentrações se tornavam inviáveis, uma vez que o rendimento máximo era aproximadamente 0,2 mg para cada litro de cultura utilizado.<sup>105-107</sup> Além disso, estudos de interações de proteínas com RNAs exigem cuidado para que as

amostras não sejam copurificadas com resquícios de contaminantes endógenos.

Portanto, o protocolo de purificação previamente estabelecido foi aprimorado com a adição de duas etapas e redução de outras etapas com o auxílio do aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes.<sup>110</sup> Utilizou-se o protocolo padronizado pelo grupo da Profa. Dra. Marina Rodnina que, gentilmente, doou-nos o plasmídeo *selB*-pT7-6. Essa construção de *selB* produz uma proteína SelBH6, ou seja, fusionada à uma cauda de hexa-histidinas na porção C-terminal sem a inclusão de um sítio de clivagem. Dessa forma, seguiu-se a transformação dessa construção nas cepas de expressão *E. coli* BL21 ( $\lambda$ -DE3) e *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ -DE3) e como já mencionado, esta é uma cepa deficiente gene *selC*, portanto não produzindo o tRNA<sup>Sec</sup> endógeno que poderia ser eventualmente copurificado com a amostra de interesse.

Após a expressão e as etapas de lise celular, o extrato proteico bruto foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna de cobalto (Talon) e a fração eluída foi posteriormente dialisada para o tampão E (100 mM fosfato de potássio pH 7,0; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 5 mM MgSO<sub>4</sub>). Este tampão foi utilizado em quase todos os experimentos envolvendo essa amostra. Após a diálise, realizada em concentrador Amicon (corte de 50 kDa), a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 GL (10/300)* (Figura 33-A).

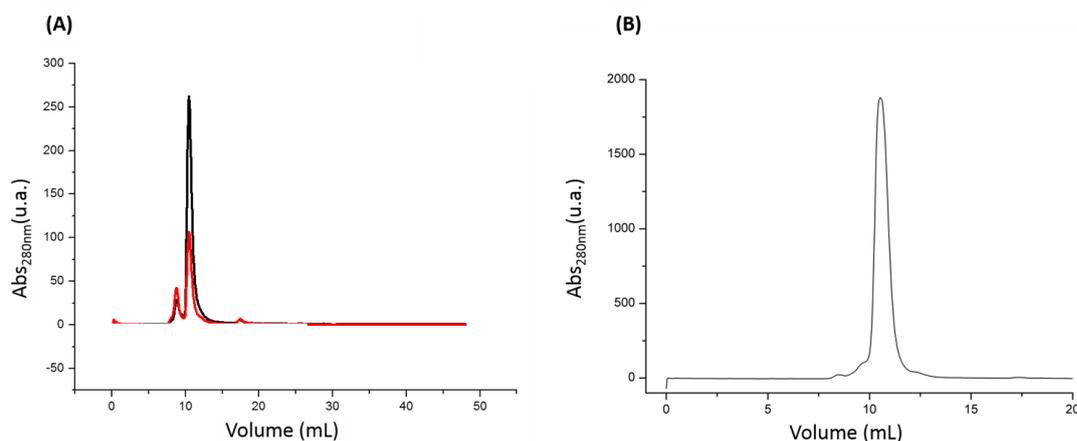


Figura 33 – Cromatografias de exclusão molecular de SelB utilizando coluna *Superdex 75 GL (10/300)*. (A) Cromatograma da amostra purificada por cromatografia de afinidade e submetida à SEC, após a diálise, com eluição em ~9,5 mL. (B) Cromatograma da amostra após a adição da etapa de tratamento com RNase apresentando eluição em ~10,8 mL. *Inset*: curva de calibração da coluna utilizando padrões de massa molecular conhecidos. Determinação da massa molecular de SelB em ~87 kDa, ou seja, conformação monomérica em solução.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se a presença de pico de menor intensidade de absorvância em 280 nm e 254 nm com massa molecular superior à SelB eluída (~9,5 mL, Figura 33-B), suspeitando-se de amostras copurificadas com contaminantes endógenos.

Alíquotas de ambas as cepas de expressão foram submetidas à quantificação utilizando padrões específicos para RNA no fluorímetro Qubit (Invitrogen) por meio do ensaio de RNA Quant-iT. Os resultados mostrados na Tabela 4 evidenciam a presença de RNAs endógenos copurificados para amostras providas de ambas as cepas de expressão utilizadas. No entanto, amostras de SelB purificadas de *E. coli* WL81460 apresentaram uma concentração de RNAs endógenos 16% menor, provavelmente por conta da ausência do gene *selC*.

Tabela 4 - Comparação das cepas de expressão e quantificação do RNA presente na amostra.

<b>Cepa utilizada para expressão de SelB e tratamento com RNase A</b>	<b>[RNA] (ng/μL)</b>	<b><math>\frac{[RNA]_{final}}{[RNA]_{inicial}}</math></b>
<i>E. coli</i> BL21	1416	100%
<i>E. coli</i> BL21 (1 h de tratamento com RNase A)	994	70%
<i>E. coli</i> BL21 (16 h de tratamento com RNase A)	0	0
<i>E. coli</i> WL81460	1198	100%
<i>E. coli</i> WL81460 (1 h de tratamento com RNase A)	409	34%
<i>E. coli</i> WL81460 (16 h de tratamento com RNase A)	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

Ensaio de tratamento com RNase A (Thermo-Fisher) foram realizados e mostraram elevada eficiência na degradação dos contaminante, pois, após o tratamento as amostras foram constatadas como RNA<sub>free</sub> (Tabela 4). Devido a essa eficiência, acrescentou-se essa nova etapa ao protocolo de purificação de SelB. Após a eluição da cromatografia de afinidade foi adicionado [1 μg/mL] de RNase A e, após 16 h de incubação em gelo, a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 GL (10/300)* (Figura 36-B).

O novo cromatograma apresentava um pico único (eluição em 10,8 mL) e com absorvância 10 vezes maior que o protocolo anterior. Após a quantificação final foi constatado que o rendimento foi de 2,6 mg/L de cultura, 13 vezes superior ao estabelecido anteriormente. Além disso, utilizando-se a curva de calibração da coluna com base em proteínas globulares

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes.

como padrões conhecidos e previamente injetados utilizando o mesmo tampão, foi possível determinar a massa molecular de SelB como ~87 kDa, um monômero com discrepância no valor de massa molecular de 20% em relação ao valor esperado (69 kDa). Isto é explicado pelo fato de SelB não ser uma proteína globular e, portanto, apresentar um coeficiente friccional diferente, o que acarreta na migração com um raio de *Stokes* (ou raio hidrodinâmico) superior ao real, o que interfere no valor de massa determinado pela curva de calibração.

Uma vez que a cepa *E. coli* WL81460 apresenta um crescimento diferenciado ( $D.O_{600nm} = 1,0$  em 6 h), foi adotado a utilização da cepa *E. coli* BL21 para os experimentos de interação descritos nas próximas seções, já que o tempo necessário para atingir a mesma densidade óptica é de apenas 3,5 h.

Apesar de ser uma construção já utilizada e caracterizada por outros centros de pesquisa, foi necessária a confirmação da obtenção da amostra de interesse pelo fato do protocolo de purificação ter sido alterado. A confirmação da amostra de interesse foi realizada através de SDS-PAGE 15% (Figura 34-A) seguida por identificação por *western blot* utilizando anti-corpo monoclonal específico para a identificação da cauda de histidina (His-TAG) (Figura 34-B). Todos os passos de purificação tiveram alíquotas retiradas para o monitoramento através das técnicas eletroforéticas e esses experimentos foram realizados em colaboração com a aluna de mestrado Jéssica Fernandes Scortecci.

Por fim, a banda referente à amostra de 69 kDa foi retirada do gel e então, preparada para análise de espectrometria de massas. A amostra foi tripsinizada e aplicada à análise por espectrometria de massas em colaboração com o Dr. Edson Crusca Jr. (Figura 34-C). Foram identificados 36 peptídeos de diferentes tamanhos o que resultou em uma cobertura de 52% da sequência e identificação da amostra de interesse baseado no banco de dados do NCBI utilizando a ferramenta Mascot Server.

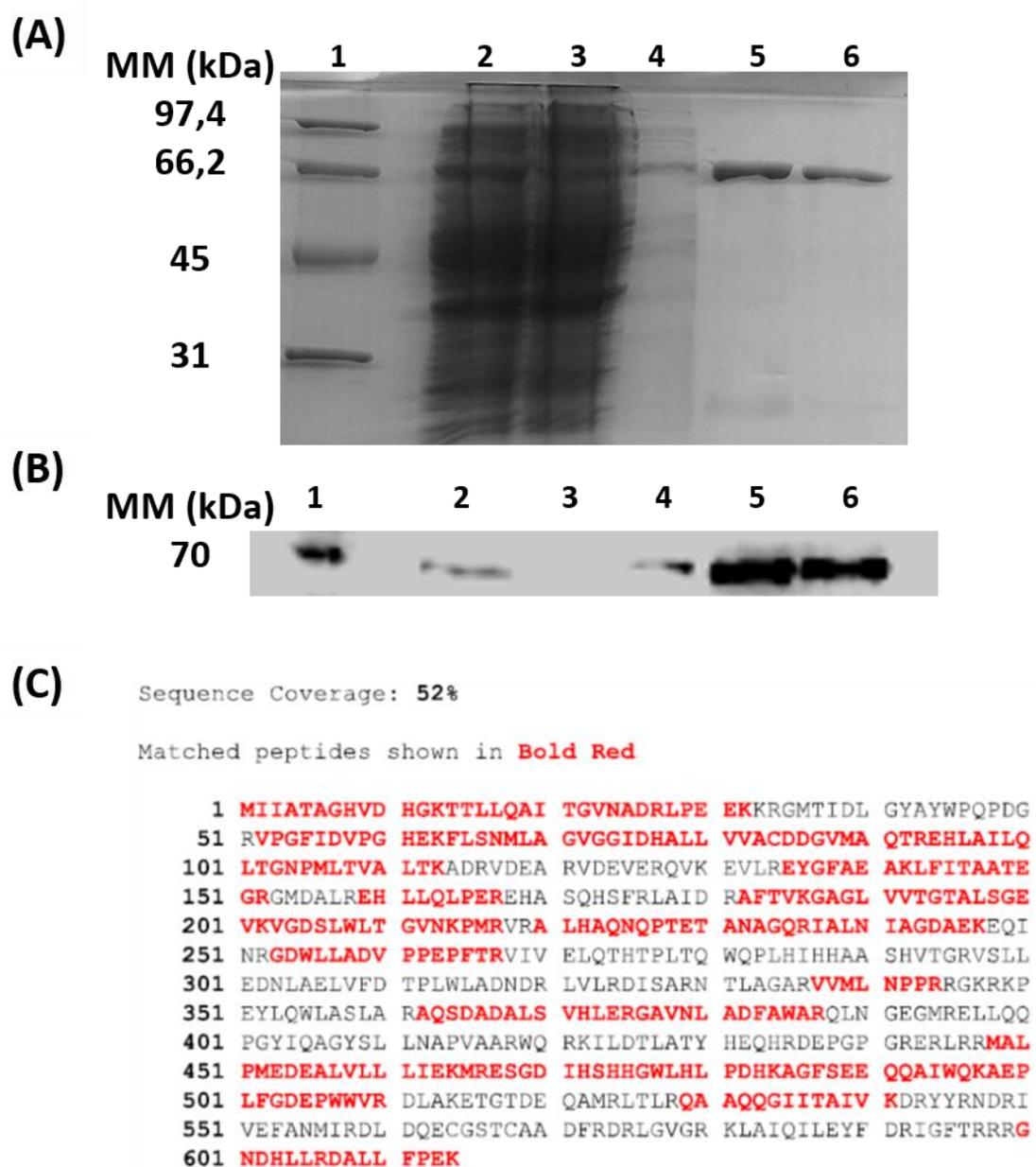


Figura 34 – Confirmação da obtenção de SelB de *E. coli*. (A) SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) extrato proteico bruto; 3) fração não ligada a coluna; 4) lavagem da coluna de afinidade com 10 mM de imidazol; 5) amostra eluída da coluna de de afinidade com 100 mM de imidazol; 6) amostra após a cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 (10/300)*. (B) *Western blot* para a identificação da *His-TAG* das mesmas amostras citadas acima e na mesma ordem. (C) Identificação e cobertura da sequência de SelB de *E. coli* por espectrometria de massas da amostra tripsinizada do gel de poliácridamida 15%.

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>5</sup>

As amostras purificadas de ambas as cepas de expressão utilizadas foram também analisadas para a determinação de potenciais nucleotídeos endógenos que poderiam ser copurificados. Comumente, amostras ligadoras a nucleotídeos, como GTP ou GDP, podem ser

<sup>5</sup> Em colaboração com os alunos de mestrado Adriano de Freitas Fernandes e Jéssica Fernandes Scortecchi (IFSC/USP)

purificadas com tais nucleotídeos endógenos caso o enovelamento e concentração no ambiente celular seja tal que permita isso.<sup>9</sup>

Para essa análise, fez-se uso do protocolo previamente descrito através de extração por desnaturação pela adição de ácido perclórico. Esse procedimento garante a integridade dos nucleotídeos o que possibilita a análise por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando coluna de troca iônica *Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm* (Waters) monitorando a absorvância em 253 nm (Figura 35).

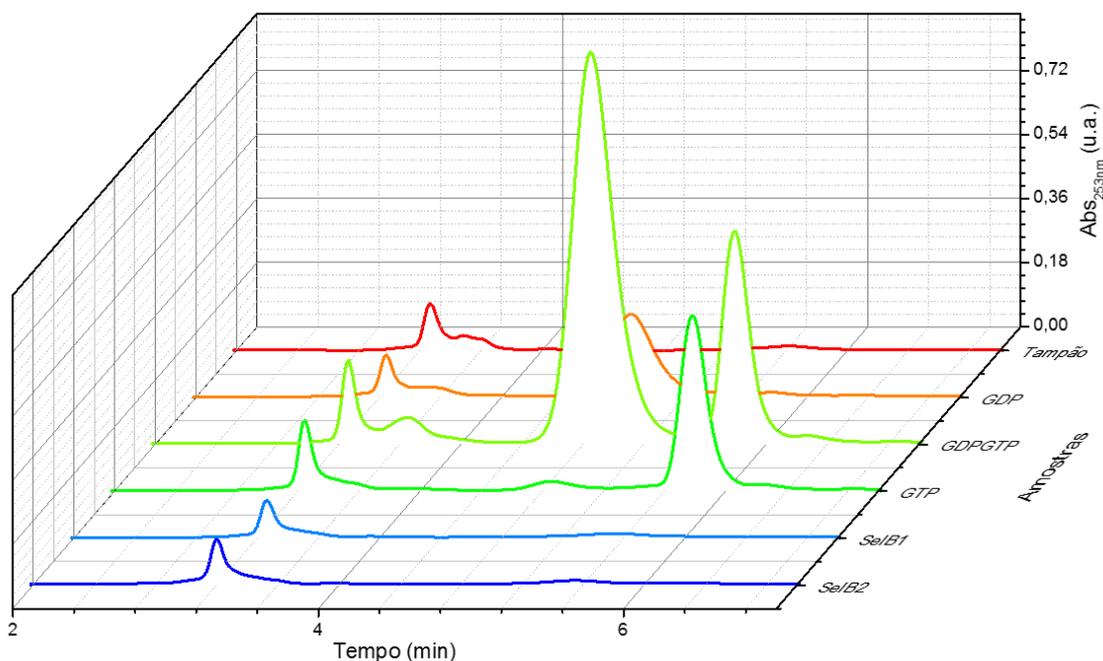


Figura 35 – Análise de possíveis contaminações com nucleotídeos endógenos. Cromatograma da coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters) monitorando a absorvância em 253 nm utilizando os padrões i) tampão E, ii) GDP, iii) GTP e iv) GDP+GTP além das amostras SelB1 e SelB2, purificadas das cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460, respectivamente. O tempo de retenção de GDP (5,2 min) e GTP (5,9 min).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando-se com os padrões (tampão, GTP, GDP e uma mistura de ambos os nucleotídeos em razão equimolar) foi possível notar que ambas as amostras SelB1 e SelB2 (amostras purificadas das cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460, respectivamente) não são copurificadas com GTP/GDP endógenos, o que possibilita os ensaios de interações que serão apresentados nas seções subsequentes desse estudo.

A partir desses preparos e confirmações de amostras RNA<sub>free</sub> e nucleotídeo<sub>free</sub> foi dada continuidade aos experimentos de interação com as demais macromoléculas da via de biossíntese de Sec.

#### 4.3 Obtenção dos RNAs: tRNA<sup>Sec</sup>, elemento SECIS e tRNA<sup>Ala</sup>: Amplificação dos genes *selC*, *secis*, *alaS* e confirmação do enovelamento dos transcritos por dicróismo circular

Os genes *selC*, *secis* e *alaS* foram amplificados e os RNAs: tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS e tRNA<sup>Ala</sup> foram transcritos utilizando o kit comercial Megashortscript T7 (Ambion). Brevemente, os genes amplificados por PCR (Figura 36) foram utilizados como molde para a realização da reação de transcrição *in vitro*. Para a comprovação da amplificação e do êxito na transcrição *in vitro*, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 2% (Figura 36).

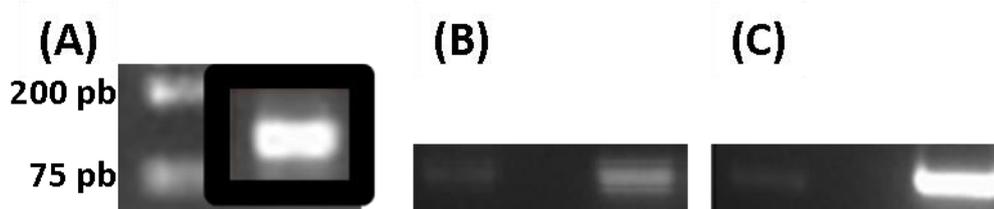


Figura 36 - Amplificação dos genes de interesse. Resultado da amplificação do gene *selC* (A), *secis* (B) e *alaS* (C). 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) gene *selC* de *E. coli* (121 pb), *secis* (75 pb) e *alaS* (81 pb).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar o enovelamento dos RNAs, ensaios de dicróismo circular foram realizados, uma vez que a estrutura secundária dessa macromolécula apresenta o perfil da curva característica para tRNAs em função da temperatura, obtendo um padrão de enovelamento. Os ensaios de medidas de dicróismo circular em função da variação de temperatura (VT-CD) foram realizados para as amostras em mesma concentração durante as medidas e água RNase<sub>free</sub> foi utilizada como referência (Figura 37).

A diferença observada no valor total de elipsidade (mdeg) está relacionada à quantidade de pareamento formados entre as bases no enovelamento dos RNAs, sendo o tRNA<sup>Sec</sup> o maior dentre as amostras analisadas. Fica evidente a melhoria da qualidade do sinal observado bem como a intensidade do mesmo. O elemento SECIS e o tRNA<sup>Ala</sup> por sua vez, apresentam sinal ruidoso, mesmo em igual concentração molar comparativa ao tRNA<sup>Sec</sup>, por conta dos menores domínios presentes em cada enovelamento, como exemplificado ao lado de seu respectivo espectro.

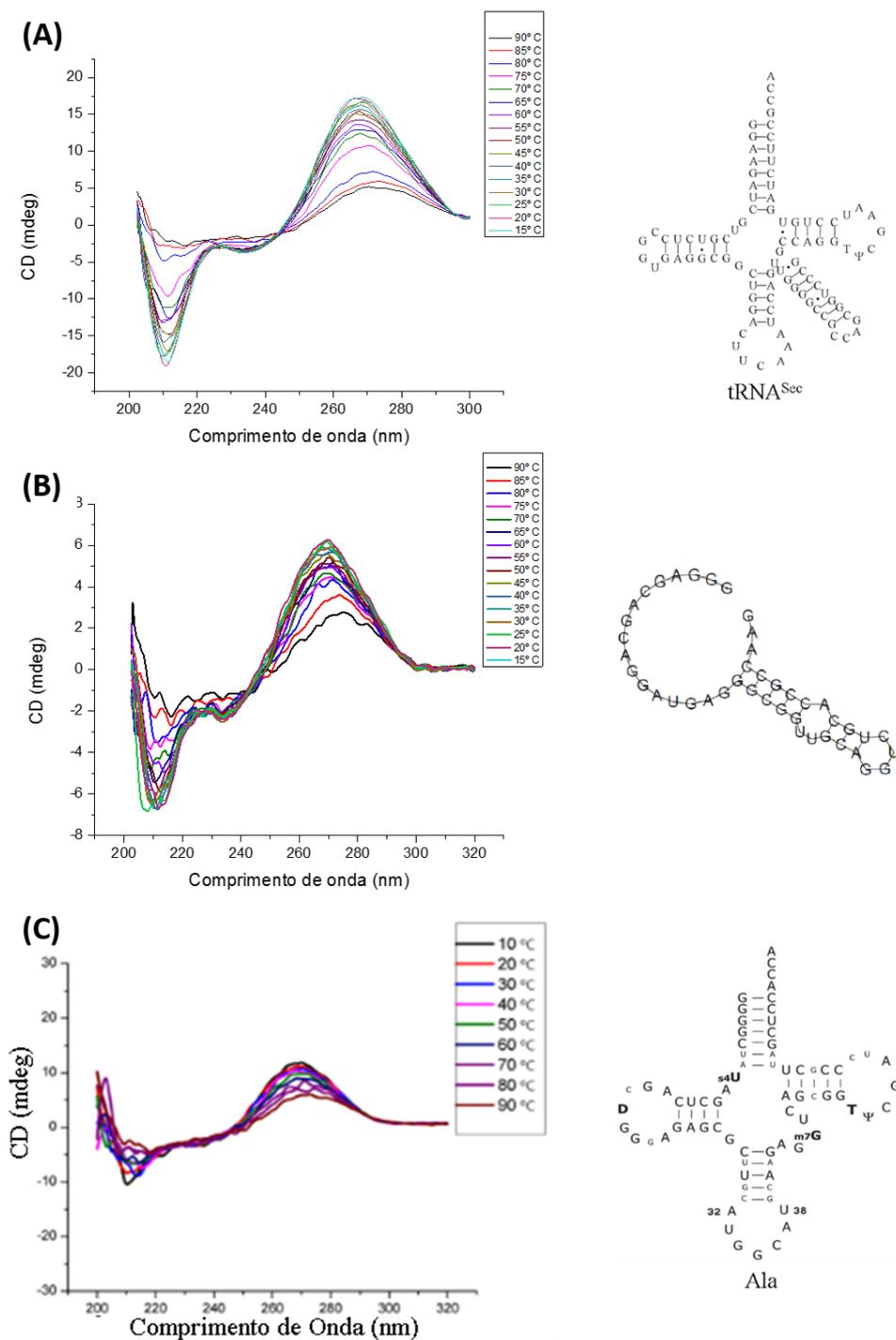


Figura 37 – Espectros de VT-CD monitorando o enovelamento dos RNAs: tRNA<sup>Sec</sup> (A), SECIS (B) e tRNA<sup>Ala</sup> (C) e representação bidimensional da estrutura em trevo para os tRNAs e de SECIS. Fonte: Elaborada pelo autor.

Monitorando a variação no ponto de máximo observado nos espectros, em torno de 268 nm, foi possível determinar o valor da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) para cada RNA a partir do ajuste utilizando a função de *Boltzmann*, uma vez que se trata de um processo termodinâmico reversível. Deste modo, tRNA<sup>Sec</sup> apresentou maior valor de  $T_m$  ( $62,4 \pm 2,2$ ) °C

em comparação aos demais RNAs: SECIS ( $58,1 \pm 1,6$ ) °C e tRNA<sup>Ala</sup> ( $59,0 \pm 1,8$ ) °C.

Uma vez garantidos os enovelamentos dos RNAs e determinado seus valores de  $T_m$ s foi possível dar continuidade aos experimentos envolvendo essas moléculas sem que elas interfiram de maneira negativa pelo enovelamento incorreto ou mesmo pelos valores de transição para estados desenovelados nos experimentos de variação térmica.

#### 4.3.1 Ensaios de atividade GTPásica *in vitro*

Como já mostrado, SelB assim como qualquer outro EF interage com nucleotídeos de guanina como meio de sinalização através de mudanças conformacionais para permitir as interações com os RNAs específicos e com o domínio L11 ribossomal.<sup>72</sup> Desta maneira, ensaios de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) foram realizados para investigar a estabilidade de GTP ao longo da formação dos complexos com os RNAs e ribossomo durante tempo determinado. Isso comprovaria a estabilidade desses complexos para tempos longos, o que ratifica os dados de interação pelas técnicas previamente descritas, uma vez que a não conversão GTP-GDP manteria os complexos estáveis.

Baseando-se nos cromatogramas evidenciados no Figura 38 e os controles com tempos de retenção conhecidos (GDP – 4,4 min e GTP – 5,4 min), os resultados mostraram que não há considerável consumo de GTP e, conseqüentemente, formação de GDP ao longo dos 60 min analisados para cada complexo estudado ao longo desse projeto cujas interações e cinética *in vitro* foram realizadas à 25 °C.

Pode-se afirmar que as amostras: SelB; SelB.GTP; ribossomo.GTP; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>; SelB.GTP.SECIS e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS sequer apresentaram sinal de GDP. Contudo, o complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS apresentou quantidades mínimas detectáveis de GDP para tempos longos (> 45 minutos), superando o tempo necessário para análises realizadas pelas demais metodologias e, portanto, mantendo os complexos macromoleculares estáveis ao longo dos demais experimentos.

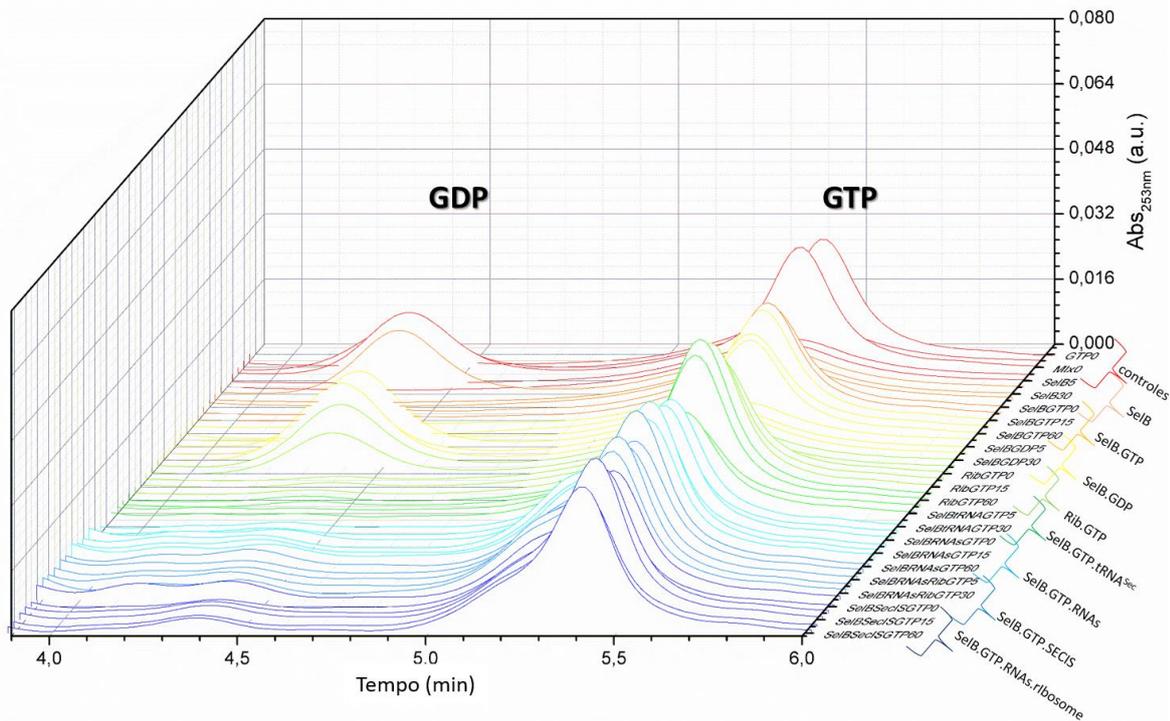


Figura 38 – Ensaio de atividade *in vitro* por HPLC. Cromatograma da coluna de troca iônica Protein Pack DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters) monitorando a absorvância em 253 nm utilizando os padrões i) tampão E, ii) GDP, iii) GTP e iv) GDP+GTP além das amostras dos complexos macromoleculares estudados. O tempo de retenção de GDP (4,4 min) e GTP (5,4 min).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ademais, estudos futuros para quantificação do consumo de GTP e produção de GDP desse complexo se farão necessários, e fazem parte das perspectivas futuras para continuidade da compreensão da incorporação de Sec junto ao ribossomo.

#### 4.4 Comparação entre as cepas de expressão utilizadas para obtenção de SelB

Inicialmente, os protocolos de expressão e purificação de SelB foram estabelecidos, com a inclusão de uma nova etapa, como por exemplo, tratamento com RNase A. No entanto, necessitava-se determinar se existia diferença entre as cepas de expressão além de somente a diferença no tempo de crescimento celular. Para isso, experimentos simples de CD e fluorescência intrínseca foram realizados para comparação entre as amostras proteicas expressas nas duas cepas utilizadas.

#### 4.4.1 Perfil de enovelamento e temperatura de *melting* das amostras

Para verificar o enovelamento das amostras purificadas antes da adição da etapa de tratamento com RNase A para as diferentes cepas de expressão e com a finalidade de compará-las, as amostras foram submetidas ao experimento de CD à 10 °C e a VT-CD.

O cálculo do percentual de estruturas secundárias para SelB proveniente de cada uma das cepas analisadas foi realizado resultando em estruturas predominantemente em  $\alpha$ -hélices (aproximadamente 35% e 30% para SelB *E. coli* BL21 e SelB *E. coli* WL81460, respectivamente). Ambas as amostras apresentaram aproximadamente 15% de fitas- $\beta$  além de estruturas irregulares. Interessantemente, para a mesma concentração a média dos espectros obtidos se diferencia para amostras provindas de cepas distintas (Figura 39-A). Isso pode estar relacionado com a presença de uma maior concentração de RNAs endógenos nessa amostra e possível mudança conformacional em complexos formados.

Posteriormente, SelBs proveniente das duas cepas foram submetidas a experimentos de VT-CD e, por meio do monitoramento do ponto de mínimo (222 nm), foi possível verificar um leve deslocamento dos valores de  $T_m$ s referentes a cada cepa de expressão. Através do ajuste de *Boltzmann* foi calculado um valor de  $T_m$  de  $(48,2 \pm 0,4)$  °C para a SelB *E. coli* BL21 e  $(48,0 \pm 0,5)$  °C para SelB *E. coli* WL81460 (Tabela 5). No entanto, esses resultados mesmo realizados em triplicatas estão dentro do erro experimental e, portanto, não é possível afirmar qualquer diferença relevante por essa análise.

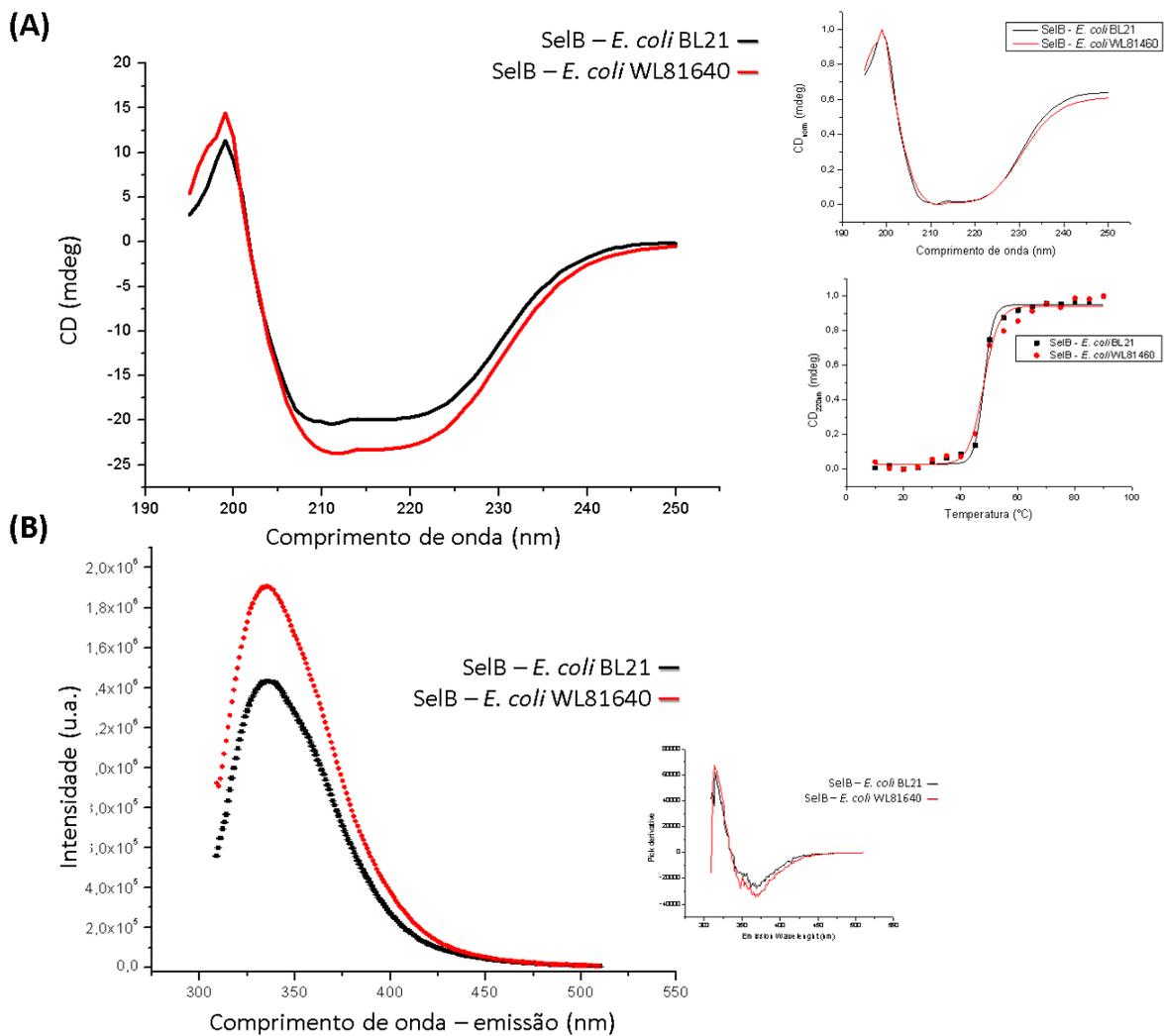


Figura 39 – Medidas espectroscópicas para comparação das amostras de SelB purificadas de ambas as cepas de expressão. (A) Espectros de CD das amostras SelB - *E. coli* BL21 — SelB - *E. coli* WL81460 e VT-CD resultando em  $T_m$ s de  $(48,2 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$  e  $(48,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , respectivamente. Espectros normalizados indicando a semelhança entre as amostras. (B) Espectros de emissão dos triptofanos de SelB (excitação 295 nm) também comparando as cepas e determinação do ponto de máximo analisando a derivada da curva obtida, o que mostrou a conservação em 333 nm, índice de internalização dos resíduos aromáticos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.4.2 Posicionamento dos triptofanos em SelB

Analogamente, ensaios de espectroscopia de fluorescência intrínseca (IFS) foram realizados para a comparação das amostras providas das diferentes cepas de expressão antes de ser adotada a etapa de tratamento com RNase A.

Como SelB possui 12 resíduos de triptofanos, cerca de 2,0% da sequência primária total, distribuídos em três domínios: i) 1 presente no domínio GTPásico; ii) 6 presentes no

domínio de interação ao tRNA<sup>Sec</sup>; iii) 5 presentes no domínio C-terminal. Alterações nos espectros de emissão sugeririam possíveis contaminantes distintos para cada cepa. A figura 41-B mostra a diferença relativa de cada espectro adquirido utilizando o mesmo desenho experimental e mesmas concentrações das amostras. A diferença no valor de intensidade total entre as amostras provenientes das cepas *E. coli* BL21 e SelB *E. coli* WL81460 (20% maior), deve-se ao fato de RNAs endógenos ocluírem os resíduos de triptofanos presentes nos domínios de ligação aos RNAs. Porém, sem alteração no ambiente químico ao redor dos mesmos, uma vez que o máximo em 333 nm permanece inalterado para ambas as amostras.

Tabela 5 – Análise do percentual de estruturas secundárias e da intensidade de emissão dos triptofanos de SelB.

	<b>SelB <i>E. coli</i> BL21</b>	<b>SelB <i>E. coli</i> WL81460</b>
$\alpha$ -hélices (%)	35	30
fitas- $\beta$ (%)	15	15
T <sub>m</sub> (°C)	48,2 ± 0,4	48,0 ± 0,5
$\lambda_{\text{máx}}$ emissão (nm)	333	333
I <sub>máx</sub> (u.a.)	1,4 x 10 <sup>6</sup>	1,9 x 10 <sup>6</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se que ambas as cepas apresentam diferenças essenciais nas características estruturais e enovelamento de amostras, provavelmente pela maior presença de RNAs endógenos na cepa *E. coli* BL21 (Tabela 5). No entanto, o tratamento com RNase A adotado torna ambas as amostras de SelB expressas por essas diferentes cepas idênticas (espectros não mostrados), o que permitiu a seleção da cepa *E. coli* BL21 para a continuidade do projeto pelo simples fato do tempo de crescimento celular ser inferior quando comparado com a outra cepa de expressão utilizada. Portanto, a partir desse momento, todos os experimentos foram realizados com amostras de SelB expressas em cepa contendo o gene *selC* e utilizando a etapa de tratamento com a endorribonuclease antes da cromatografia de exclusão molecular, último passo de purificação da amostra.

Essas análises não só serviram para corroborar com os dados de copurificação de RNAs endógenos diferenciada para cada cepa de expressão utilizada, mas também guiou-nos a estabelecer uma metodologia para os ensaios de interação entre SelB e os RNAs através de medidas da supressão da emissão dos triptofanos presentes nas WHDs 2, 3 e 4, a supressão da emissão dos resíduos aromáticos que será apresentado na seção 4.5.2.1.

## 4.5 Análises da formação dos complexos

Um dos principais objetivos desse projeto foi a identificação e caracterização dos complexos nos quais SelB é integrante. Para isso, os experimentos foram divididos em 2 grupos (interação com nucleotídeos e RNAs e interação com demais parceiros da via de biossíntese de Sec). Posteriormente, esses complexos foram subdivididos por metodologia adotada para cada experimento realizado.

### 4.5.1 Interação com nucleotídeos

As medidas de formação dos complexos envolvendo SelB se iniciaram com as medidas de interação com os nucleotídeos de guanina (GTP e GDP). Como descrito na literatura, os valores de constantes obtidos são elevados para sistemas biológicos (0,7  $\mu\text{M}$  e 12  $\mu\text{M}$  para GTP e GDP, respectivamente).<sup>105-106</sup> Por conta disso, alguns experimentos foram realizados para inferir os valores de constantes para a formação dos complexos binários com os nucleotídeos.

#### 4.5.1.1 Formação dos complexos analisando a variação das $T_m$ s

Assim como o estabelecido anteriormente para a comparação das cepas de expressão, experimentos de VT-CD foram utilizados para a verificação dos valores de  $T_m$ s das amostras em complexo com GTP e GDP (Figura 40).

Os valores de  $T_m$ s determinados através do ajuste de *Boltzmann* dos pontos monitorados em 222 nm foram  $(50,3 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$  e  $(49,1 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ , para SelB.GTP e SelB.GDP, respectivamente. Em contrapartida, o valor de  $T_m$  para a amostra de SelB<sub>apo</sub> sob mesmas condições experimentais foi de  $(48,2 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$ . Os experimentos realizados em triplicata biológica, em mesmas condições experimentais de concentração e tampão utilizado, mostram um deslocamento positivo de  $T_m$  maior para SelB.GTP (2,1  $^\circ\text{C}$ ) em comparação com SelB.GDP (0,9  $^\circ\text{C}$ ), valores esses expressos na Tabela 6. Isso indica uma estabilidade térmica maior para o complexo binário com o nucleotídeo trifosfatado e, conseqüentemente, um complexo termicamente estável. Esse resultado é compatível com o esperado, uma vez que, de acordo com seu papel na via de biossíntese de Sec, SelB deve ter maior afinidade por GTP em comparação ao GDP.

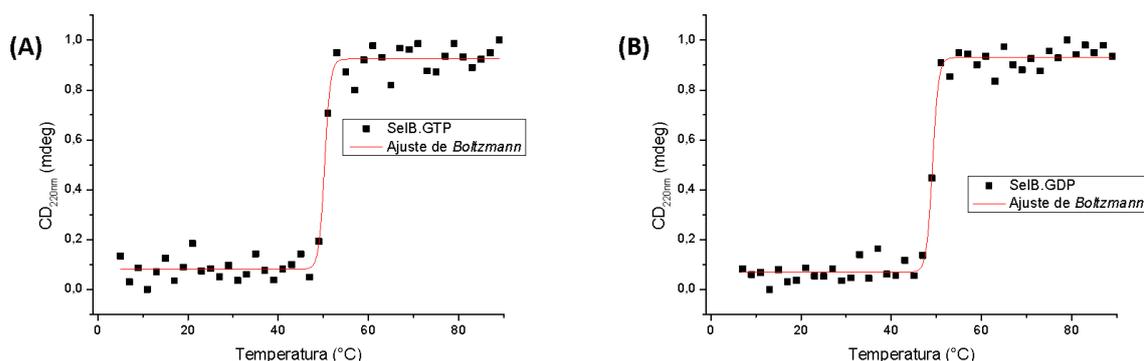


Figura 40 – Medidas normalizadas de VT-CD. Os complexos de SelB.GTP (A) e SelB.GDP (B) analisados em condições saturantes dos nucleotídeos resultaram em  $T_m$ s de  $(50,3 \pm 0,2)$  °C e  $(49,1 \pm 0,1)$  °C, respectivamente. A  $T_m$  de SelB<sub>apo</sub> sob mesmas condições experimentais  $(48,2 \pm 0,4)$  °C. Os valores foram normalizados de 0 a 1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Análises de estabilidade térmica dos complexos serão detalhados na seção 4.6 pelas análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

#### 4.5.1.2 Medidas de interações com nucleotídeos por técnica calorimétrica

Paleskava e colaboradores mostraram através ensaios de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) os valores de constante de dissociação ( $K_D$ ) na formação dos complexos binários entre SelB e os nucleotídeos de guanina.<sup>105-106</sup> Porém, os valores de constantes obtidas apresentavam-se elevados para sistemas biológicos ( $0,7 \mu\text{M}$  e  $12 \mu\text{M}$  para GTP e GDP, respectivamente). Desta forma, resolveu-se repetir tais experimentos utilizando o novo protocolo de preparo de amostras e mesmo procedimento experimental estabelecido para as interações por ITC desse sistema.

Curiosamente, os resultados divergiram dos resultados previamente publicados (Tabela 6), apresentando valores  $K_D^{\text{GTP}} = (124 \pm 8)$  nM (ou,  $0,124 \pm 0,008 \mu\text{M}$ ) utilizando o modelo de interação de um único sítio de interação e após a subtração do calor de diluição em tampão previamente obtido para o GTP (Figura 41-A). Esse valor, 17 vezes menor, sendo condizente para concentrações biológicas mesmo que esses nucleotídeos possuam elevada concentração em ambiente celular ( $(468 \pm 224) \mu\text{M}$  para GTP e  $(159 \pm 51) \mu\text{M}$  para GDP).<sup>157</sup>

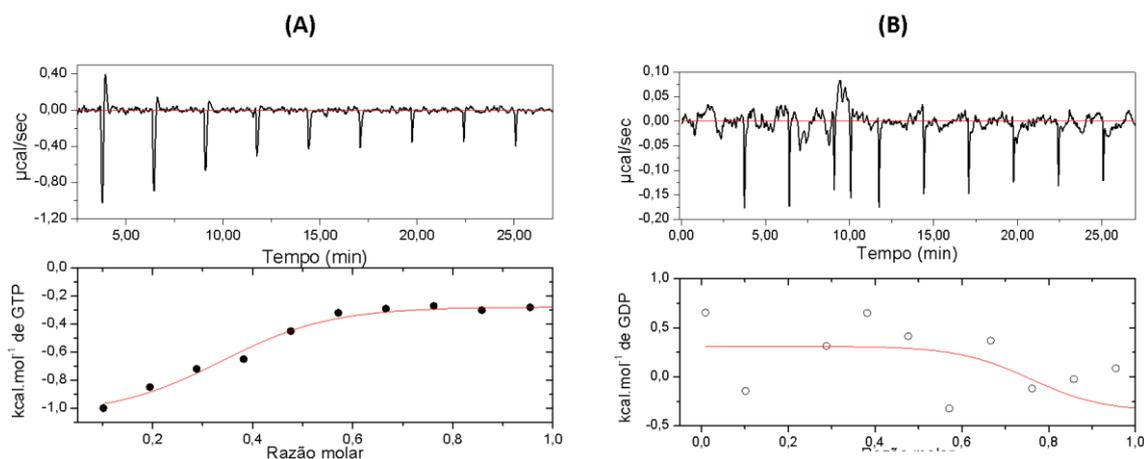


Figura 41 – Medidas de ITC na interação com os nucleotídeos de guanina. Os complexos de SelB.GTP (A) e SelB.GDP (B) analisados por ITC resultaram em  $K_D^{\text{GTP}} = (124 \pm 8)$  nM (ou,  $0,124 \pm 0,008$   $\mu\text{M}$ ) e não determinado para  $K_D^{\text{GDP}}$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, os ensaios titulando GDP não apresentaram um perfil de interação para os valores de concentrações utilizados (Figura 41-B), discordando dos resultados previamente estabelecidos. Apesar de apresentar elevado valor de  $K_D$  (12  $\mu\text{M}$ ), ainda está  $\sim 10$  vezes inferior ao valor encontrado no ambiente celular, porém foi observado sob essas condições experimentais adotadas.

Com o valor de  $K_D$  obtido para o GTP foi possível calcular o valor da energia livre de Gibbs dessa interação mostrada e, conseqüentemente, a variação de entropia do sistema apresentados na Tabela 5. Ambos os valores foram satisfatórios ( $\Delta G < 0$  e  $\Delta S > 0$ ), mostrando-se ser uma reação exergônica e biologicamente favorável.

Tabela 6 – Valores da interação de SelB com os nucleotídeos de guanina.

	SelB.GTP	SelB.GDP
$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$50,3 \pm 0,2$	$49,1 \pm 0,1$
$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	2,1	0,9
$K_D$ (nM)	$124 \pm 8$	-
$K_D^{\text{literatura}}$ (nM)	740	12.000
Concentração celular ( $\mu\text{M}$ ) <sup>157</sup>	$468 \pm 224$	$159 \pm 51$

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 4.5.2 Interação com RNAs e parceiros da via de biossíntese de Sec

Apesar de sabidamente ocorrer a interação entre SelB e os RNAs participantes da via de biossíntese de Sec, até o momento não haviam dados conclusivos das constantes de afinidade entre essas macromoléculas, tampouco da ordem dos eventos na formação dos complexos macromoleculares ao longo da incorporação de Sec. Para elucidar esses eventos, experimentos envolvendo técnicas espectroscópicas como fluorescência intrínseca da supressão da emissão dos resíduos aromáticos, anisotropia de fluorescência com os RNAs marcados especificamente, ultracentrifugação analítica e técnicas microcalorimétricas foram empregadas variando as concentrações e moléculas nas interações.

### 4.5.2.1 Supressão da emissão dos triptofanos (IFS)

Como já mencionado anteriormente, SelB possui 12 resíduos de triptofanos distribuídos majoritariamente nos domínios de interação aos RNAs (6 no domínio de reconhecimento ao tRNA<sup>Sec</sup> e 5 no domínio de reconhecimento ao SECIS). Logo, foi-se proposto experimentos de supressão da emissão dos triptofanos presentes nesses domínios através do incremento da concentração de tRNA<sup>Sec</sup> e monitoramento da banda de emissão intrínseca (IFS) desses resíduos aromáticos (Figura 42). Medidas prévias utilizando somente o tRNA<sup>Sec</sup> e GTP na cubeta foram realizadas, a fim de comprovar a ausência de filtros internos ao sistema analisado para o comprimento de onda de 295 nm para a excitação nesse experimento, não sendo observado nenhum sinal de emissão na região espectral monitorada (303-530 nm).

O monitoramento das bandas de emissão mostram um decaimento da intensidade em função do incremento do tRNA<sup>Sec</sup>, indicando um processo de supressão da emissão dos resíduos de triptofanos presentes em SelB nos sítios de interação aos RNAs. Com esse experimento foi analisada a média da emissão dos resíduos, sendo possível correlacionar o máximo de intensidade observado para SelB.GTP (55000 u.a.) com o valor máximo observado após a saturação (32000 u.a.) e inferir que aproximadamente 6,3 resíduos de triptofanos foram oclusos durante essa interação. Essa quantidade de resíduos está condizente com a quantidade presente no sítio específico de reconhecimento do tRNA<sup>Sec</sup> (6 resíduos).

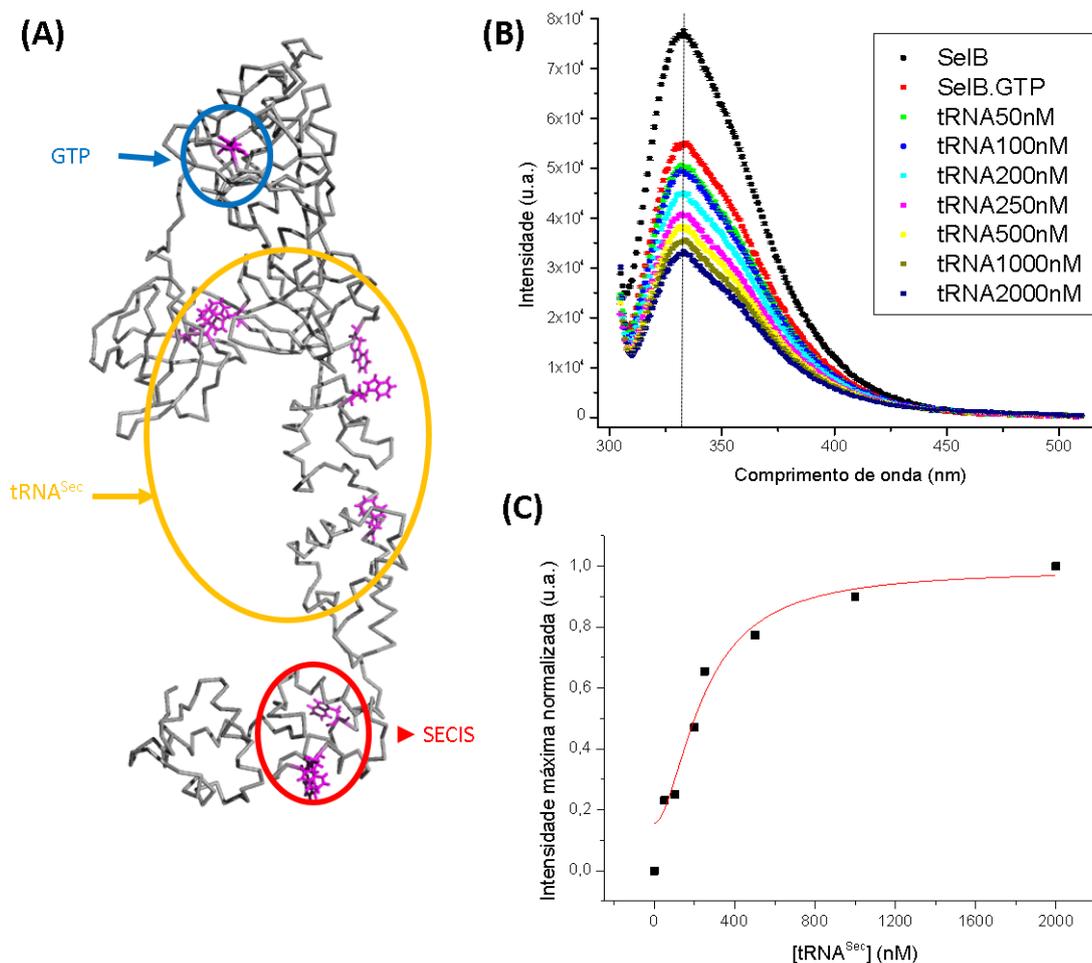


Figura 42 – Medidas de IFS na interação com o tRNA<sup>Sec</sup>. (A) Representação do modelo estrutural de SelB representado em *ribbon* com os resíduos de triptofanos destacados em roxo. As setas indicam as regiões preditas para interação com GTP (azul), tRNA<sup>Sec</sup> (laranja) e o elemento SECIS (vermelho). (B) Bandas de emissão de SelB à 50 nM e posterior adição de GTP [100 μM] com incremento da concentração de tRNA<sup>Sec</sup> utilizando excitação em 295 nm e monitoramento entre 303 – 510 nm com filtro de 295 nm. A linha tracejada indica o máximo de emissão observado em 333 nm. (C) Curva de máximo de intensidade de emissão em 333 nm normalizado relacionado à concentração de tRNA<sup>Sec</sup> titulado, evidenciando o perfil de interação específica sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com o ajuste de *Hill* mostrado na equação 9.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Além disso, foi possível correlacionar o máximo de intensidade de emissão em 333 nm (ponto de máximo do espectro emitido) com a concentração de tRNA<sup>Sec</sup> acrescida (Figura 42-C), resultando em um perfil de interação clássico para biomoléculas.<sup>60,95,100,104,135</sup> Curvas com essas características são ajustadas através da equação de *Hill*, o que permite determinar parâmetros fundamentais como constante de dissociação ( $K_D$ ) e índice de cooperatividade ( $n$ ).<sup>134-135</sup>

$$\text{Fração ligada} = f = \frac{[\text{SelB}_{\text{free}}]^n}{K_D^n + [\text{SelB}_{\text{free}}]^n} \quad (9)$$

Onde  $f$  é a concentração de complexo molecular formado,  $[\text{SelB}_{\text{free}}]$  é a concentração de macromolécula livre,  $K_D$  a constante de dissociação do sistema e  $n$  o índice de cooperatividade. Como já mencionado, o ajuste de *Hill* permite a determinação dos valores de constante de interação ( $K_D$  – constante de dissociação) e índice de cooperatividade para os complexos estudados. Esses parâmetros refletem a cerca de cooperatividade ( $n > 1$  indica cooperatividade positiva, ou seja, o favorecimento da interação da próxima molécula à sonda monitorada,  $n < 1$  cooperatividade negativa, ou seja, o desfavorecimento das interações subsequentes e  $n = 1$  indica sistema não cooperativo e sítios independentes de interação) e constantes de dissociação aparente em valores biologicamente aceitáveis.

Observou-se um  $K_D = (248 \pm 59)$  nM e  $n = (1,7 \pm 0,7)$  que não refletem a especificidade necessária para essa interação crucial no estágio de incorporação de Sec. O valor de  $n$  reflete a não-cooperatividade, uma vez que SelB apresenta um único sítio de reconhecimento ao tRNA<sup>Sec</sup>. O erro no valor de  $n$  pode ser devido às concentrações elevadas de tRNA<sup>Sec</sup> (2000 nM) utilizadas, pois deve ter acarretado em possíveis interações não específicas. Os valores das constantes termodinâmicas calculadas são expressos na Tabela 7 e comparados com as demais constantes obtidas nesse projeto.

Contudo, esse experimento consistiu em análises das médias da emissão dos triptofanos, possibilitando a dubiedade dos resultados uma vez que outros resíduos aromáticos poderiam influenciar nos espectros observados. Para complementar e refinar essas análises, foram utilizados ensaios com uma sonda específica covalentemente ligada ao tRNA<sup>Sec</sup>.

#### **4.5.2.2 Formação dos complexos macromoleculares: experimentos de espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS)**

Experimentos de espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS) foram amplamente utilizados ao longo da realização desse projeto, onde os RNAs estudados foram marcados covalentemente e especificamente em suas extremidades 5' com uma sonda (fluoresceína-maleimida). Através da titulação crescente de macromoléculas não marcadas, e que não interferem no comprimento de onda utilizado para excitação da sonda (492 nm) nem o monitoramento ( $\lambda > 520$  nm), foi possível analisar o incremento em massa dos complexos

formados em solução. A partir desses dados, determinaram-se as constantes de dissociação e índice de cooperatividade para cada complexo analisado.

Inicialmente, foram realizadas as interações de SelB com seus RNAs específicos (tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS) além de um controle negativo de interação (tRNA<sup>Ala</sup>) sempre em condições saturantes de GTP, uma vez que esse nucleotídeo é fundamental para permitir o reconhecimento e interação entre essas macromoléculas (Figura 43).

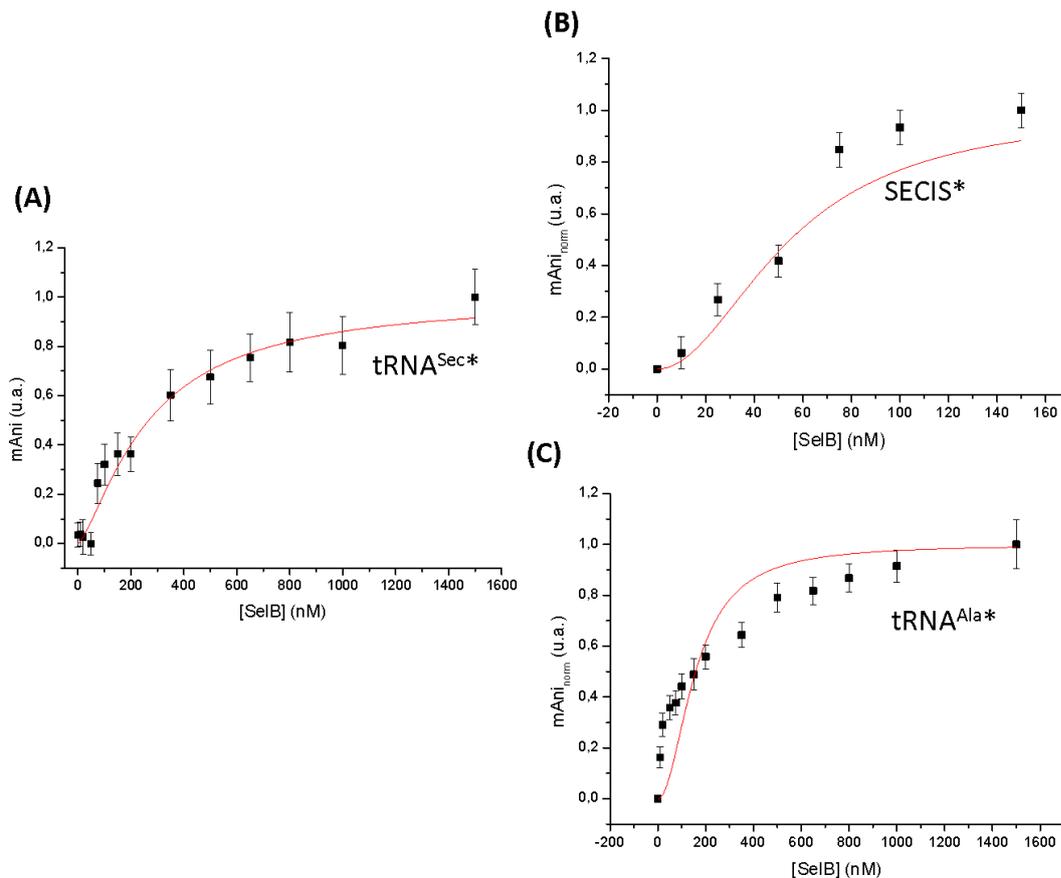


Figura 43 – Medidas de FAS. (A) Curva experimental normalizada da interação de tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de SelB utilizando excitação em 492 nm com filtro de 515 nm. (B) Analogamente ao item (A), curva normalizada da interação de SECIS (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de SelB e (C) Curva utilizada como controle negativo normalizada da interação com o tRNA<sup>Ala</sup> (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de SelB. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de Hill (curva em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Interessantemente, os valores de  $K_D$  ( $283 \pm 53$ ) nM e  $n$  ( $1,4 \pm 0,6$ ) obtidos para o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> utilizando essa abordagem metodológica foram

extremamente semelhantes ao observado previamente por IFS. Entretanto, ainda não foi indicada a especificidade ao qual se esperava para essa etapa da via de biossíntese de Sec. Neste caso,  $n$  indica a não-cooperatividade na formação desse complexo. Lembrando que nesse experimento o RNA marcado foi a molécula monitorada e, portanto, não apresentando mais de um sítio de interação específica.

Os valores obtidos para a formação do complexo ternário SelB.GTP.SECIS  $K_D = (53 \pm 13) \text{ nM}$  e  $n = (2,5 \pm 1,5)$  apresentam valores de  $K_D$  cuja especificidade fica notória pelo baixo valor observado. Em um primeiro momento, esse baixo valor indica uma preferência da interação SelB.GTP.SECIS ao se comparar com SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (valor de  $K_D \sim 5$  vezes menor, portanto maior afinidade). Isso será aprofundado nas discussões subsequentes de formação dos complexos quaternários. O índice de cooperatividade indica novamente uma tendência à cooperação (+), ou seja, favorecimento da interação da próxima molécula pela interação da molécula anterior. Isso pode ser indício de interação inespecífica de SelB pelo fato de possuir 2 domínios de interação às RNAs. Devido às elevadas concentrações, o sistema pode forçar a interação de SelB através de outros domínios (WHDs 2 e 3, por exemplo). Esse efeito também será discutido subsequentemente.

Ademais, o tRNA de alanina (tRNA<sup>Ala</sup>) empregado como controle negativo, por apresentar dobramento distinto ao tRNA<sup>Sec</sup>, apresentou uma constante de  $K_D = (645,8 \pm 129,4) \text{ nM}$ , cerca de 3 vezes maior que a constante observada para o tRNA específico. Isso justifica a especificidade do enovelamento e sequência do tRNA<sup>Sec</sup> para o correto reconhecimento por SelB, além de mostrar que constantes de dissociação  $> 500 \text{ nM}$  podem não apresentar a singularidade necessária para a função biológica da macromolécula ou complexo formado.

Contudo, é sabido que SelB deve reconhecer ambos os RNAs em um determinado momento da incorporação de Sec junto ao sítio-A do ribossomo, portanto, um complexo quaternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS deve existir nesse instante específico para a codificação do códon UGA-Sec. Para analisar a formação desse complexo contendo ambos os RNAs e compreender a ordem de formação dos mesmos, foram realizados experimentos onde cada um dos RNAs permanecia na cubeta e foi acrescido o complexo ternário previamente montado em concentrações saturantes e contendo o outro RNA não marcado com fluoresceína.

Desse modo, iniciou-se com o preparo análogo de tRNA<sup>Sec</sup> [(49 + 1\*) nM] na cubeta em concentrações saturantes de GTP e titulou-se concentrações crescentes de SelB.GTP.SECIS previamente preparados (Figura 44-A). Um fato marcante desse

experimento consiste no ajuste pela função de *Hill* ter sido o pior dentre os complexos analisados, o que pareceu uma curva com mais de uma transição (desligado/ligado). Por certo, a presença do tRNA<sup>Sec</sup> na cubeta pode afetar o complexo ternário titulado, no entanto, não houve maneira de sanar essa dúvida. A partir do ajuste dos dados experimentais foi possível novamente determinar o  $K_D$  ( $525 \pm 48$ ) nM e  $n$  ( $6,1 \pm 0,7$ ). Esses valores são extremamente maiores aos valores esperados, sendo superiores ao tRNA<sup>Ala</sup> utilizado como controle negativo, o que leva a crer que a formação do complexo SelB.GTP.SECIS.tRNA<sup>Sec</sup> partindo do complexo ternário SelB.GTP.SECIS não é a maneira biologicamente mais favorável.

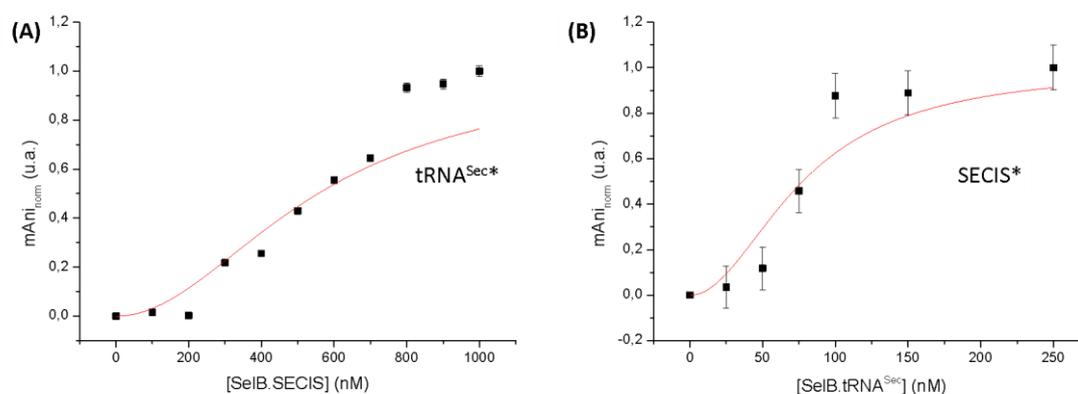


Figura 44 – Medidas de FAS para determinação da formação do complexo quaternário. (A) Curva experimental normalizada da interação de tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração do complexo SelB.GTP.SECIS. (B) Curva normalizada da interação de SECIS (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100  $\mu$ M] e incremento da concentração do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A outra maneira de se analisar a formação do complexo quaternário foi mantendo SECIS [(49 + 1\*) nM] e acrescentando o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> previamente montado (Figura 44-B). Diferentemente do observado para a ordem testada anteriormente, o ajuste da curva foi acurado e os valores de  $K_D$  ( $77 \pm 3$ ) nM e  $n$  ( $2,4 \pm 0,9$ ) satisfatórios, o que permitiu, a partir do valor de  $K_D$ , sugerir a ordem de eventos para a formação do complexo quaternário partindo do complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> que interage com SECIS com maior afinidade resultando no complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Também vale ressaltar o valor do índice de cooperatividade  $n > 1$ , indicando o favorecimento da interação de SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> ao SECIS após a interação da molécula precedente.

Uma vez sanada a ordem de eventos na formação do complexo para a entrega do

tRNA<sup>Sec</sup> junto ao SECIS contido no mRNA e conhecendo as constantes de dissociação dos complexos em solução, surgiu-nos a dúvida se SelB poderia reconhecer o tRNA<sup>Sec</sup> livre no ambiente celular ou ele deveria ser entregue dirigidamente pela enzima predecessora (SelA). Essa dúvida deve-se ao fato de que se trata de um tRNA raro e com poucas cópias transcritas no citoplasma celular.<sup>104</sup>

Para isso, novamente foram utilizadas medidas de anisotropia de fluorescência nas quais o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec\*</sup> foi previamente preparado, seguindo protocolos estabelecidos em nosso grupo de pesquisa.<sup>60,95,100,104</sup> Foram tituladas concentrações crescentes de SelB na presença de concentrações saturantes de GTP (Figura 45).

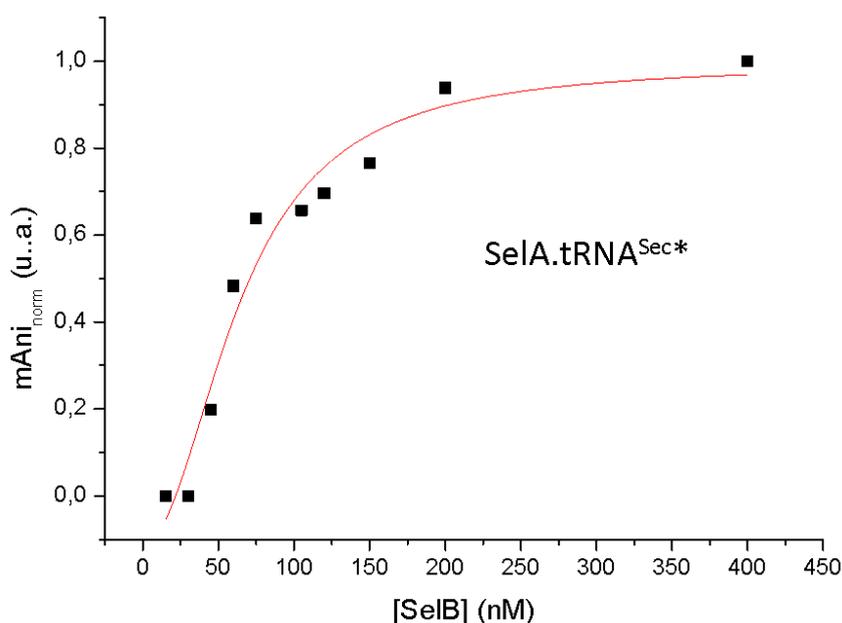


Figura 45 – Medidas de FAS para determinação da formação de complexos na presença de SelA. Curva experimental normalizada da interação de SelA.tRNA<sup>Sec\*</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de SelB. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Mais uma vez, obtém-se o valor de constante de dissociação  $K_D = (76 \pm 5)$  nM para a formação do complexo SelB.GTP.SelA.tRNA<sup>Sec</sup>. Este valor de  $K_D$  é inferior aos valores observados para os demais complexos analisados, incluindo SelB.GTP:tRNA<sup>Sec\*</sup> cujo  $K_D$  ( $283 \pm 53$ ) nM por FAS. Com isso é possível inferir que o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> deve ser previamente formado na célula para o posterior reconhecimento de SelB pelo tRNA<sup>Sec</sup>. Vale lembrar que dados literários mostram que SelA tem como regiões de

reconhecimento ao tRNA<sup>Sec</sup> o braços acceptor e D-loop, enquanto que SelB reconhece os braços acceptor, T $\psi$ C e variável, ou seja, com excessão do acceptor extenso (8 pares de base + extremidade CCA3'-OH). Os pontos de reconhecimento são distintos, o que permitiria a formação do complexo quaternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelB.GTP. Além disso, o índice de cooperatividade  $n = (2,5 \pm 0,4)$  indica cooperatividade positiva, portanto, a interação de SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> é facilitada pela presença de SelA, fato esse considerado biologicamente razoável dado que tRNA<sup>Sec</sup> não é abundante no ambiente celular e a via de incorporação de selênio deve ser extremamente eficiente devido à alta toxicidade deste composto.<sup>33,60</sup>

Conclui-se até o momento que SelB não deve reconhecer o tRNA<sup>Sec</sup> isolado no ambiente celular, mas sim interagindo com o complexo homodecamérico SelA. Posteriormente, o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> interage com o elemento SECIS para a entrega do tRNA<sup>Sec</sup> ao ribossomo. Logo, fez-se necessária as análises das formações dos complexos na presença do complexo ribossomal.

O ribossomo de *E. coli* foi adquirido da empresa *New England Biolabs* (NEB, P0763S – 1 mg ou 13,3  $\mu$ M) e foi preparado em tampão E, que contém MgCl<sub>2</sub> essencial para a montagem do complexo 70S. A certificação da qualidade e correta montagem do complexo foi realizada através de SDS-PAGE 10% comparando com o gel padrão enviado pela empresa para o lote do produto (Figura 46-A e B).

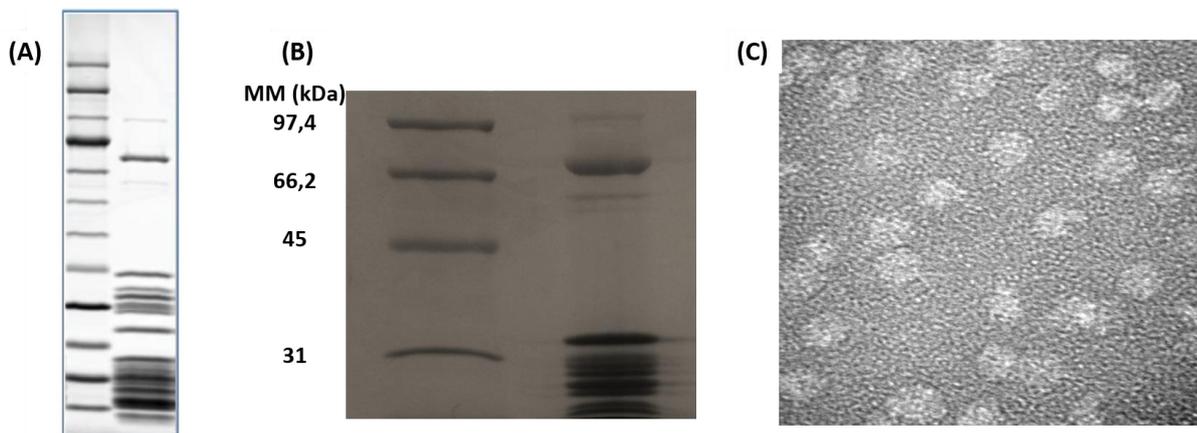


Figura 46 – Certificação de qualidade do ribossomo (NEB). (A) SDS-PAGE 10% enviado como controle pela empresa (NEB) contendo marcador de massa molecular e uma amostra de ribossomo do mesmo lote adquirido. (B) SDS-PAGE 10% da amostra de ribossomo checado como controle de qualidade da amostra adquirida comparado ao marcador de massa molecular e o ribossomo. (C) Micrografia obtida por microscopia eletrônica de transmissão em preparo por contraste negativo do ribossomo preparado em tampão E, confirmação da morfologia, monodispersividade e tamanho das partículas esperado para o complexo ribossomal de *E. coli* ( 25 nm).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando-se com o gel controle foi possível identificar as mesmas bandas com tamanhos semelhantes, apesar da migração diferenciada de ambos os géis. A checagem da montagem do complexo foi realizada através do preparo de grades de microscopia eletrônica de transmissão com contraste negativo (*negative stain*). As imagens coletadas (microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G<sup>2</sup>F20 HRTEM *single-tilt* operando em 200 kV) mostram o complexo ribossomal montado (sem a presença de partículas das subunidades menores) e com o tamanho esperado (~25 nm) (Figura 46-C).

Estabeleceu-se então o protocolo de montagem do complexo ribossomal e foram iniciadas as análises das interações entre os complexos quaternários (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec\*</sup>.ribossomo e SelB.GTP.SECIS\*.ribossomo) e do complexo macromolecular para incorporação de Sec (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec\*</sup>.SECIS.ribossomo).

Primeiramente, experimentos de titulação de ribossomo no complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec\*</sup> previamente montado foram realizados de maneira análoga ao descrito anteriormente para os demais complexos (Figura 47-A). A partir do ajuste de *Hill* foi possível determinar o  $K_D$  ( $84 \pm 6$ ) nM e  $n$  ( $7,3 \pm 3,2$ ) o que indica uma interação extremamente favorável na formação desse complexo. Analogamente, ensaios de interação entre ribossomo e o complexo SelB.GTP.SECIS\* (Figura 47-B) resultaram em  $K_D$  ( $110 \pm 9$ ) nM e  $n$  ( $3,3 \pm 0,7$ ), ou seja, uma menor afinidade ao se comparar com o dado prévio do complexo na presença do tRNA<sup>Sec</sup>. Fica evidente que o complexo quaternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec\*</sup>.ribossomo é favorável ao complexo na presença de SECIS, outro indício da sequência de eventos de modo que a SelB deve estar previamente carregando o tRNA específico para favorecer as interações subsequentes.

Todavia, a entrega de Sec no sítio-A do ribossomo acontece com a formação de um complexo envolvendo a interação entre SelB, tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS simultaneamente, o que direciona o tRNA específico para a codificação do UGA-Sec. Logo, ensaios de interação utilizando o complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec\*</sup>.SECIS, previamente preparado, foram realizados através da titulação de concentrações crescentes de ribossomo (Figura 47-C). Com base nesse experimento, determinou-se os valores de constante de dissociação  $K_D = (21 \pm 2)$  nM e  $n = (2 \pm 1)$ . Chama a atenção que o valor de  $K_D$  obtido foi o menor valor dentre os apresentados nesse trabalho (Tabela 7), o que indica a elevada afinidade e especificidade do complexo formado. Outro fato relevante foi a diminuição dos valores de constante comparativamente com os valores dos complexos somente com o tRNA específico e o elemento SECIS. Esse fato permite a sugestão de uma nova proposição de sequência de eventos, onde o complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> reconhece o elemento SECIS e, só então o complexo quaternário

SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS fica propício à reconhecer o ribossomo e entregar o tRNA no posicionamento correto.

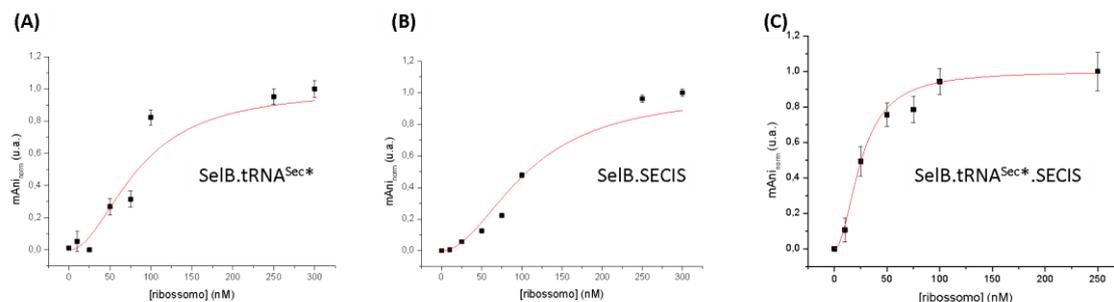


Figura 47 – Medidas de FAS da interação com o ribossomo. (A) Curva experimental normalizada da interação de SelB.tRNA<sup>Sec</sup> à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de ribossomo. (B) Curva normalizada da interação de SelB.SECIS (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de ribossomo e (C) Curva experimental normalizada da interação de SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS à 50 nM (49 nM + 1 nM marcado com fluoresceína) em concentrações saturantes de GTP [100 μM] e incremento da concentração de ribossomo. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de *Hill* (curva em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Baseando-se nas análises realizadas por FAS, foi possível determinar os  $K_D$ s e ns dos diferentes complexos formados na etapa final da via de biossíntese de Sec. E, utilizando-se as relações termodinâmicas representadas nas equações (1) e (3), foi possível determinar um parâmetro termodinâmico fundamental, a energia livre de *Gibbs* ( $\Delta G$ ). Lembrando que reações biologicamente favoráveis (exergônicas) possuem  $\Delta G < 0$ , como o observado para todos os complexos analisados nesse projeto e expressos na Tabela 7. Os valores de  $K_D$  para a interação com os nucleotídeos de guanina foram obtidos por ITC (seção 4.5.1.2) e SelB.tRNA<sup>Sec</sup> possui dois valores coerentes obtidos pelas técnicas de IFS (seção 4.5.2.1) e FAS. Todos os valores obtidos por medidas espectroscópicas foram a partir da análise utilizando equação de *Hill* (equação 9) e os erros associados às medidas foram determinados pelo desvio médio padrão dos dados em triplicata, com excessão do erro do  $\Delta G$  calculado pela propagação das incertezas das grandezas relacionadas.

Tabela 7 - Constantes de dissociação e parâmetros termodinâmicos dos complexos macromoleculares dependentes de SelB.

		$K_D$ (nM)	n	$\Delta G = RT \ln(K_D)$ (kcal/mol)	$R^2$
ITC	SelB.GTP	124 ± 8	-	-9,32 ± 0,08	98,2
	SelB.GDP	-	-	-	-
IFS	SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup>	248 ± 59	1,7 ± 0,7	-9,01 ± 0,14	96,4
FAS		283 ± 53	1,4 ± 0,6	-8,93 ± 0,11	98,8
	SelB.GTP.SECIS	57 ± 13	2,6 ± 1,5	-9,87 ± 0,13	95,1
	SelB.GTP.tRNA <sup>Ala</sup>	646 ± 129	0,6 ± 0,1	-8,48 ± 0,19	98,9
	SelB.GTP.SECIS.tRNA <sup>Sec</sup>	895 ± 57	1,8 ± 0,8	-8,25 ± 0,04	82,1
FAS	SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .SECIS	77 ± 3	7,3 ± 2,5	-9,70 ± 0,02	98,2
	SelB.GTP.SelA.tRNA <sup>Sec</sup>	72 ± 14	2,4 ± 0,9	-9,74 ± 0,11	95,2
	SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .ribossomo	84 ± 6	7,3 ± 3,2	-9,65 ± 0,04	94,8
	SelB.GTP.SECIS.ribossomo	110 ± 9	3,3 ± 0,7	-9,49 ± 0,05	97,3
	SelB.GTP.SECIS.tRNA <sup>Sec</sup> .ribossomo	21 ± 2	2,0 ± 1,0	-10,48 ± 0,06	96,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

Baseando-se nos dados contidos na Tabela 7 e a discussão proposta ao longo desse tópico, foi possível propor um modelo sequencial de eventos ilustrado na Figura 48.

É conhecido da literatura que todos os EFs interagem com seus tRNAs específicos na presença de GTP e não GDP,<sup>87,115</sup> uma vez que esse nucleotídeo serve de fonte energética para que as subunidades ribossomais se movimentem e consigam incorporar o aminoácido presente no tRNA do sítio-A para a cadeia nascente presente no sítio-P.<sup>86</sup> Além disso, as possíveis mudanças conformacionais dos EFs e, conseqüentemente de SelB, na formação do complexo binário (EF.GTP) permitem a interação com o tRNA específico na formação do complexo ternário. Sendo assim, o complexo binário SelB.GTP pode ser nomeado como complexo ativo para reconhecimento e interação com o tRNA<sup>Sec</sup>.

Nota-se que a constante de dissociação na formação do complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> é menor na presença do homocomplexo SelA, enzima responsável pela etapa de conversão Ser-Sec que precede a etapa na qual SelB participa. Isso indica a maior afinidade de SelB.GTP pelo tRNA<sup>Sec</sup> ainda preso à SelA e não em solução. Esse evento indica a entrega dirigida ao próximo passo da via, hipótese essa que vai ao encontro com a ideia de interactoma das vias bioquímicas presente no ambiente celular e dados prévios para essa mesma via específica.<sup>3-4</sup>

Uma vez o complexo terciário formado, esse interage com o elemento estrutural presente no mRNA, o elemento SECIS. Essa ordem de eventos pode ser observada pela diferença substancial dos valores de  $K_D$  na formação do complexo quaternário (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS), revelando a sequência e necessidade de SelB estar interagindo

com o tRNA específico antes de reconhecer SECIS. Essa ideia será apresentada novamente nos ensaios de mobilidade eletroforética em gel não desnaturante (seção 4.5.2.5).

Finalmente, o complexo quaternário reconhece e entrega o tRNA<sup>Sec</sup> ao ribossomo, fato esse elucidado pelos diferentes  $K_D$ s observados na ausência de cada um dos elementos necessários para a codificação UGA-Sec.

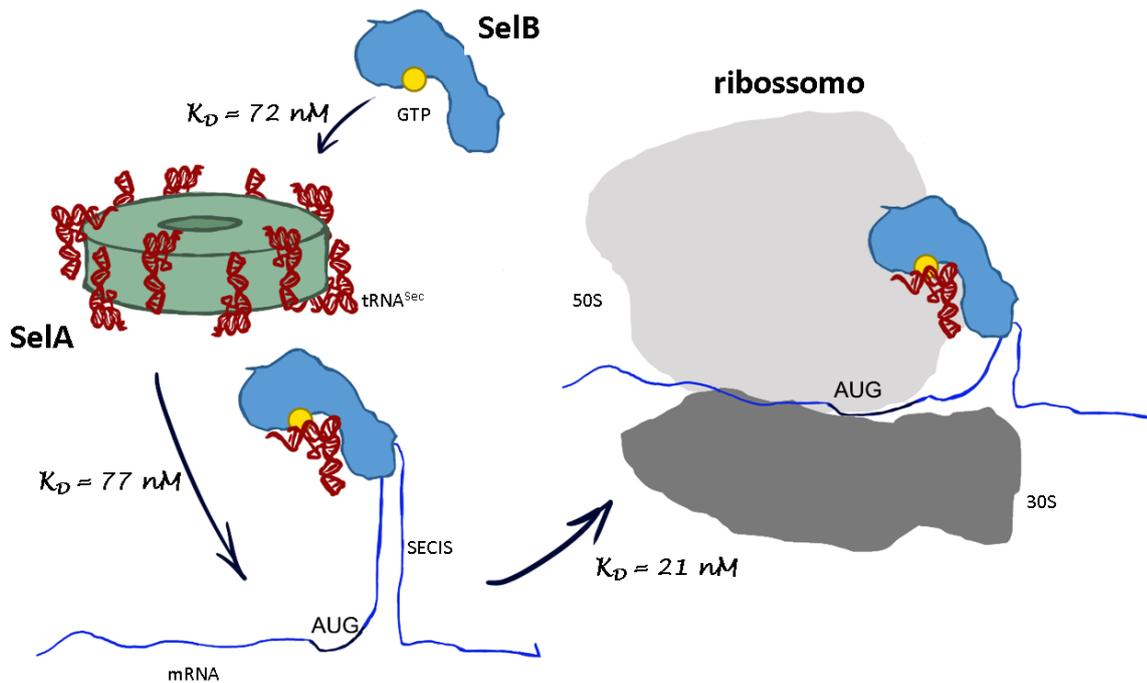


Figura 48 – Proposta de modelo sequencial de interação para a incorporação de Sec em bactérias. SelB ativada pela presença de um GTP em seu domínio N-terminal reconhece os braços aceceptor, TΨC e variável do tRNA<sup>Sec</sup> em complexo com SelA. Uma vez retirado, o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> reconhece a porção apical do elemento SECIS através do domínio C-terminal de SelB e, posteriormente, realiza a entrega do Sec.tRNA<sup>Sec</sup> junto ao sítio A do ribossomo para a incorporação de Sec na selenoproteína nascente.

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>††</sup>

Até o momento não existem trabalhos na literatura que evidenciam a sequência de eventos nessa etapa da via de biossíntese de Sec em solução e esses resultados contribuem com os modelos propostos recentemente pelos estudos estruturais desses complexos macromoleculares.<sup>33,60</sup> Os experimentos subsequentes contribuem com os dados mostrados até o momento.

<sup>††</sup> Em colaboração com a aluna de doutorado Ana Laura Lima (IFSC/USP).

#### 4.5.2.3 Confirmação dos complexos formados por ultracentrifugação analítica

Outra metodologia adotada para verificar a formação dos complexos entre SelB.GTP e tRNA<sup>Sec</sup> foram ensaios de ultracentrifugação analítica utilizando duas metodologias distintas: velocidade de sedimentação e equilíbrio de sedimentação.

Para o experimento de velocidade de sedimentação, SelB e os complexos formados na presença de GTP, tRNA<sup>Sec</sup> e tRNA<sup>Ala</sup>, utilizado como controle negativo, foram submetidos à sedimentação a um campo centrífugo uniforme. Os dados brutos foram coletados e posteriormente processados resultando na curva de distribuição (Figura 49) onde foram observados picos relativos à presença de diferentes populações em função da posição radial. Os experimentos foram realizados em colaboração com a Dra Fernanda Batista, Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira (ambas do LEC/CNPEM) e com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes.

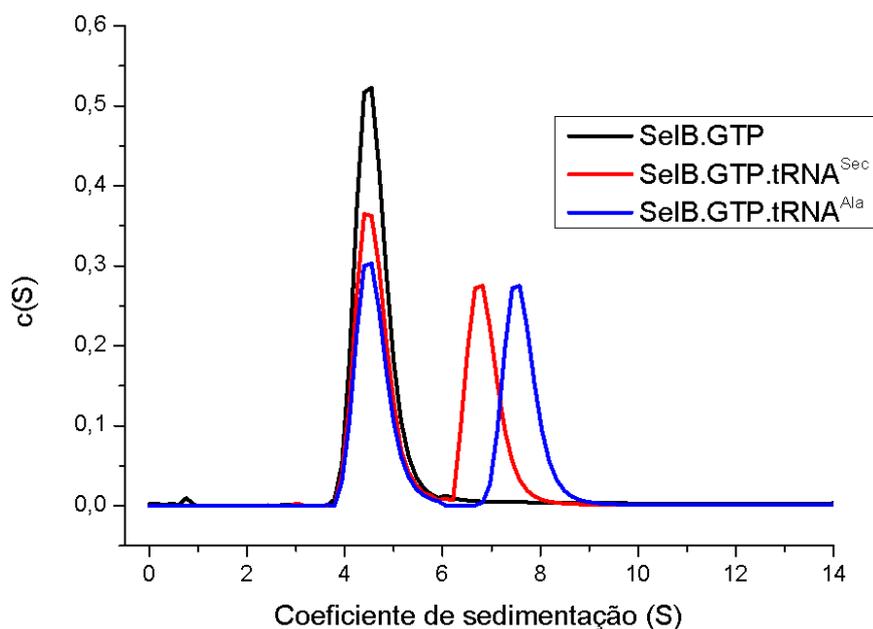


Figura 49 – Análises de velocidade de sedimentação. Picos correspondentes à SelB e complexos para o experimento de velocidade de sedimentação a 25 °C sob rotação de 40.000 rpm.  
Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

As análises do ensaio de sedimentação mostraram a presença de pico único para SelB.GTP, indicando única conformação oligomérica em solução e valor de massa molecular calculado como sendo monômero (63.426 Da), como esperado para essa amostra e

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

apresentando uma discrepância de apenas 8% em relação à massa calculada e teórica. Além disso, o raio de *Stokes* ( $R_s$ , ou raio hidrodinâmico) calculado foi 3,17 nm (Tabela 8).

Por outro lado, as análises realizadas com concentrações não saturantes de tRNAs, já que estes foram os limitantes experimentais, resultaram em 2 picos populacionais observados: SelB.GTP e SelB.GTP.tRNA (Figura 49). O cálculo de massa molecular para ambos resultou para SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> um valor esperado com uma discrepância de apenas 19%, uma vez que tRNA<sup>Sec</sup> possui massa molecular predita de 31.000 Da e o complexo ternário uma massa molecular esperada de 99.986 Da. No entanto, a massa obtida experimentalmente para o complexo utilizado como controle negativo diverge em 41% (massa predita para o complexo ~ 96 kDa), o que indica a possível interação promíscua desse tRNA para com SelB uma vez que não possuem o enovelamento necessário para o correto reconhecimento.

Tabela 8 – Resultados de AUC. Valores de coeficiente de sedimentação em função da concentração, massa molecular e raio de *Stokes* para as soluções das Equações de *Lamm*.

<b>Amostra</b>	<b>Sw (S)</b>	<b>Sw (20,w) (S)</b>	<b>MM (Da)</b>	<b>Rs (nm)</b>
SelB.GTP	4,507	4,779	63.426	3,17
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup>	6,894	7,310	119.984	3,91
SelB.GTP.tRNA <sup>Ala</sup>	7,556	8,012	137.671	4,10

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

Corroborando com a hipótese de interação inespecífica do tRNA<sup>Ala</sup>, o  $R_s$  maior (4,10 nm) pode indicar interações em regiões aleatórias da molécula, o que aumentaria o raio hidrodinâmico. O valor de  $R_s$  para o complexo ternário biologicamente esperado (3,91 nm) é coerente com o incremento em massa obtido na formação do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.

Os dados apresentados na Tabela 8 indicam o valor do coeficiente de sedimentação obtida para proteína SelB em  $sw(20,w) = 4,779$  S e os demais valores desta coluna são relativos aos coeficientes de sedimentação para cada complexo. Todos os casos havia o pico extra relativo à proteína excedente no experimento.

Posteriormente, foram realizados experimentos de equilíbrio de sedimentação dos complexos SelB.GTP.tRNAs afim de comparar os valores de  $K_{DS}$  obtidos previamente. Para isto, foram preparadas três razões estequiométricas diferentes (0,5:1; 1:1 e 2:1 relativos à SelB.GTP:tRNA) para os complexos: SelB.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.tRNA<sup>Ala</sup>. Os dados coletados foram processados utilizando o modelo de interação ( $A + B = AB$ ) (Figura 50).

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

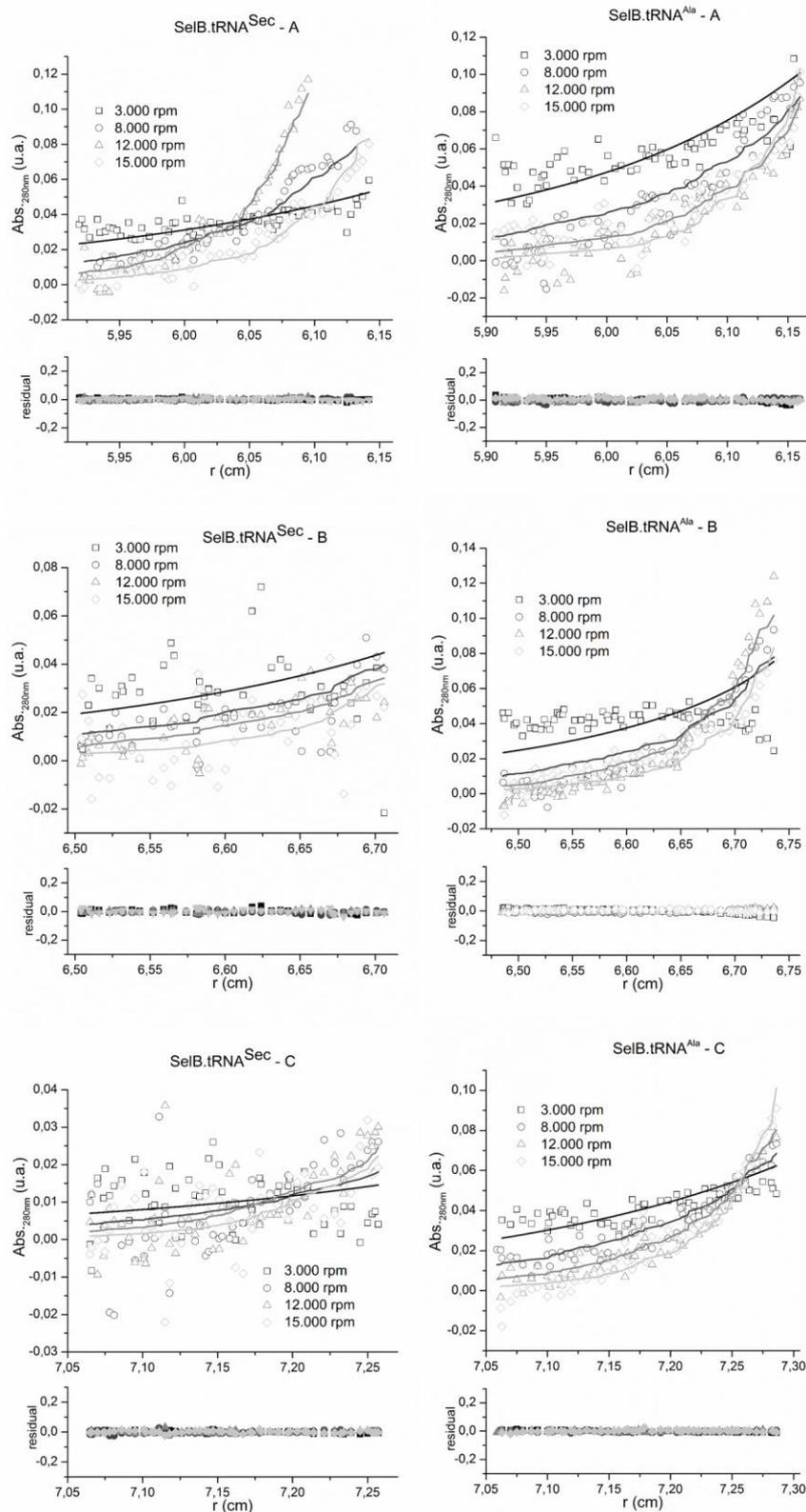


Figura 50 – Análises de sedimentação em equilíbrio. Curvas experimentais das amostras SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (esquerda) e SelB.GTP.tRNA<sup>Ala</sup> (direita) utilizado como controle negativo para o experimento utilizando três razões estequiométricas (0,5:1; 1:1 e 2:1 de SelB:tRNAs) nas velocidades 3.000, 8.000, 12.000 e 15.000 rpm.

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

Como observado, os valores de constante de dissociação para os complexos SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP:tRNA<sup>Ala</sup> ( $K_D^{\text{médio}} = 256,4$  nM e  $K_D^{\text{médio}} = 623,5$  nM, respectivamente) foram próximos aos determinados por FAS (Tabela 7). Estes resultados corroboram com os dados prévios e evidenciam a interação não-específica do tRNA<sup>Ala</sup> ao tRNA<sup>Sec</sup>, onde o aumento no valor de  $K_D$  reflete a diminuição de afinidade de formação desse complexo (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de constantes de dissociação para formação de complexos.

Amostra	$K_D$ (nM)	rmsd	$K_D^{\text{FAS}}$ (nM)
0,5 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	230,2	0,02	283 ± 53
1 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	261,0	0,04	
2 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	277,9	0,04	
	$K_D^{\text{médio}} = 256,4$		
0,5 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	610,9	0,03	645,8 ± 129,4
1 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	629,7	0,01	
2 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	629,9	0,05	
	$K_D^{\text{médio}} = 623,5$		

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

#### 4.5.2.4 Determinação da entalpia de interação por injeção única na calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os experimentos de interação até o momento forneceram os valores de  $K_D$ s dos complexos e, conseqüentemente, foi possível determinar a energia livre de Gibbs para cada interação (Tabela 7). Contudo, a termodinâmica desses sistemas interagentes ainda não foi completamente elucidada, sendo necessária a determinação dos valores de variação de entalpia ( $\Delta H$ ) e variação de entropia ( $\Delta S$ ) na formação dos complexos.

Para isso, experimentos de ITC foram realizados para determinar os valores de  $\Delta H_{\text{ap}}$  (variação de entalpia aparente) na formação dos complexos SelB.GTP; SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS através de ensaios de injeção única (*single injection*). A adição de uma quantidade saturante da macromolécula titulada foi monitorada e, após a subtração do calor de diluição desta em tampão de análise, foi possível determinar a variação da entalpia aparente para cada complexo à 25 °C, temperatura de realizações de todos os experimentos de

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

interação nesse projeto.

A formação do complexo binário SelB.GTP havia sido estabelecida por ITC (seção 4.5.1.2). No entanto, utilizou-se naquele experimento múltiplas injeções para a determinação do  $K_D$ . O experimento de injeção única,  $\Delta H_{ap}^{GTP} = - (8,40 \pm 0,03) \text{ kcal/mol}$  (Figura 51-A) juntamente com o valor de  $K_D$  previamente estabelecido e do  $\Delta G$  calculado (Tabela 7), possibilitou inferir o valor de  $\Delta S = (0,02 \pm 0,01) \text{ kcal/mol}$ . Analogamente, os  $\Delta H_{aps}$  para a formação do complexo ternário (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>) e quaternário (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS), ilustrados na figura 51, foram  $- (6,18 \pm 0,05) \text{ kcal/mol}$  e  $- (2,38 \pm 0,09) \text{ kcal/mol}$ , respectivamente (Tabela 10).

Logo, todas as interações foram exotérmicas, ou seja, liberam calor ao acontecerem. Em sistemas biológicos, reações que possuem  $\Delta H < 0$  são comumente encontradas e favoráveis, uma vez que a energia livre de Gibbs no equilíbrio também será negativa ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$ , onde  $T\Delta S > 0$  e, conseqüentemente com  $\Delta H < 0 \leftrightarrow \Delta G < 0$ ), portanto exergônica.

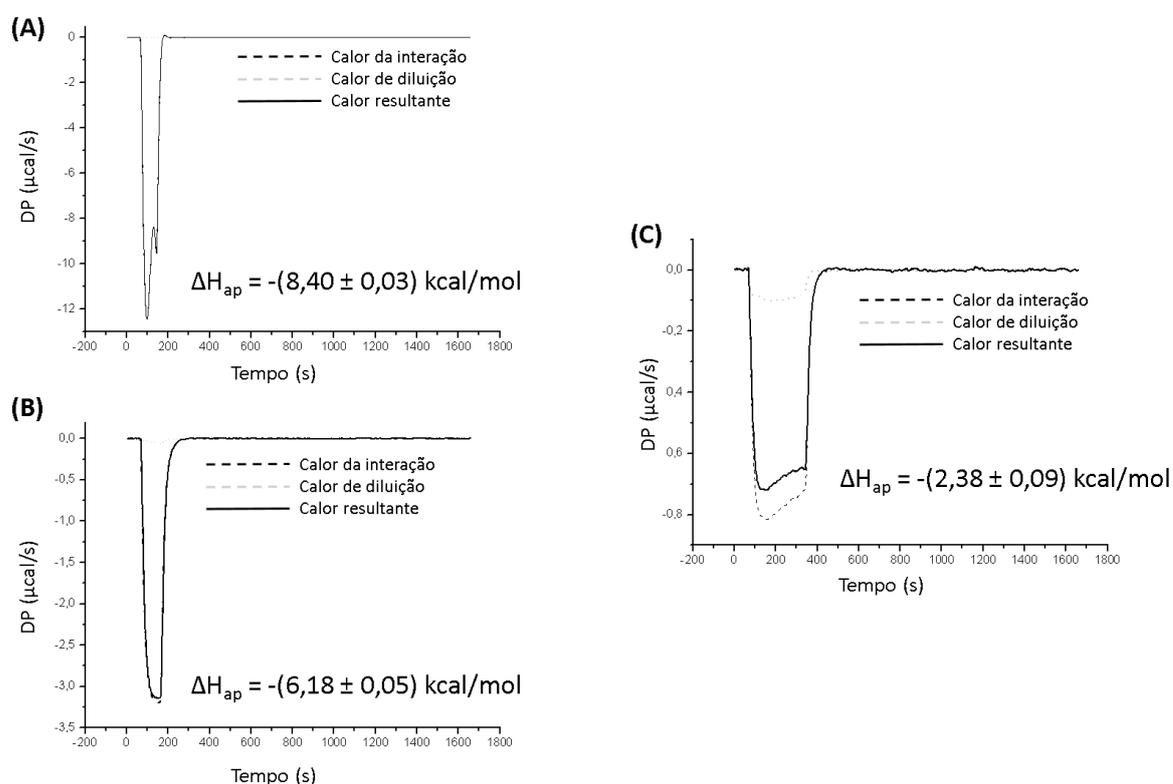


Figura 51 – Medidas de ITC por injeção única e determinação da variação de entalpia dos complexos. Os complexos de SelB.GTP (A), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (B) e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS analisados por ITC resultaram nos valores termodinâmicos expressos na Tabela 10.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Baseando-se nos valores medidos de  $\Delta H_{ap}$  e com os valores de  $\Delta G$  calculados a partir

das constantes de dissociação previamente determinadas, foi possível determinar a variação de entropia na formação desses complexos como  $\Delta S^{\text{tRNA}^{\text{Sec}}} = 0,01$  kcal/mol e  $\Delta S^{\text{SECIS}} = 0,02$  kcal/mol (Tabela 8). Os valores de  $\Delta S > 0$  são condizentes com o esperado para a termodinâmica de sistemas biológicos pelo aumento da desordem do sistema (macromoléculas + solvente), uma vez que é necessária a retirada de moléculas de água de solvatação para que haja a interação entre as macromoléculas. Estudos termodinâmicos da compensação entálpica-entrópica do sistema não foram realizados, mas são propostos como perspectivas para a continuidade da compreensão da termodinâmica desse sistema possibilitando ainda a inclusão dos demais complexos envolvidos na incorporação de Sec em *E. coli*.

Tabela 10 – Parâmetros termodinâmicos dos complexos de SelB.

	$\Delta H$ (kcal/mol)	$K_D$ (nM)	$\Delta G = RT \ln(K_D)$ (kcal/mol)	$\Delta S =$ $(\Delta H - \Delta G)/T$ (kcal/mol)
SelB.GTP	$-8,40 \pm 0,03$	$124 \pm 8$	$-9,32 \pm 0,08$	$0,02 \pm 0,01$
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup>	$-6,18 \pm 0,05$	$249 \pm 49$	$-8,99 \pm 0,11$	$0,01 \pm 0,01$
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .SECIS	$-2,38 \pm 0,09$	$77 \pm 3$	$-9,70 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,01$

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.5.2.5 Análise de mobilidade eletroforética

A fim de obter mais informações sobre a interação entre SelB com tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS e determinar a razão estequiométrica de interação entre essas macromoléculas, ensaios de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa em condições nativas, ou *gel-shift*, foram realizados, monitorando-se as moléculas de RNAs marcadas com fluoresceína a [1  $\mu\text{M}$ ] (valor 5 vezes acima da constante de interação SelB.GTP).

Amostra de SelB foi utilizada como controle, bem como tRNA<sup>Sec\*</sup> e SECIS\*, todos à 1  $\mu\text{M}$  e preparados em tampão E. Assim como esperado, SelB não apresentou sinal no experimento, sendo específico para monitoramento dos RNAs (Figura 52). O sinal mais intenso do tRNA<sup>Sec</sup> deve-se ao fato deste apresentar envelhecimento superior em relação ao elemento SECIS e, conseqüentemente, ser capaz de parear uma quantidade maior de moléculas de SyBr<sup>®</sup> Safe (Thermofisher).

No primeiro grupo analisado no gel de agarose 2%, concentrações crescente de SelB.GTP foram acrescidas em razões molares de 0,5, 1 e 2 vezes à concentração de tRNA<sup>Sec</sup>. Interessantemente, a razão 1tRNA<sup>Sec</sup>:0,5SelB.GTP não apresentou deslocamento em gel, fato

esse diferente ao observado para as demais estequiometrias (1:1 e 1:2), em que complexos de mais alta massa (migração menor em gel) foram observados. Esse fato corrobora com a ideia de SelB possuir uma razão estequiométrica com o  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  de  $1\text{SelB.GTP}:1\text{tRNA}^{\text{Sec}}$ .

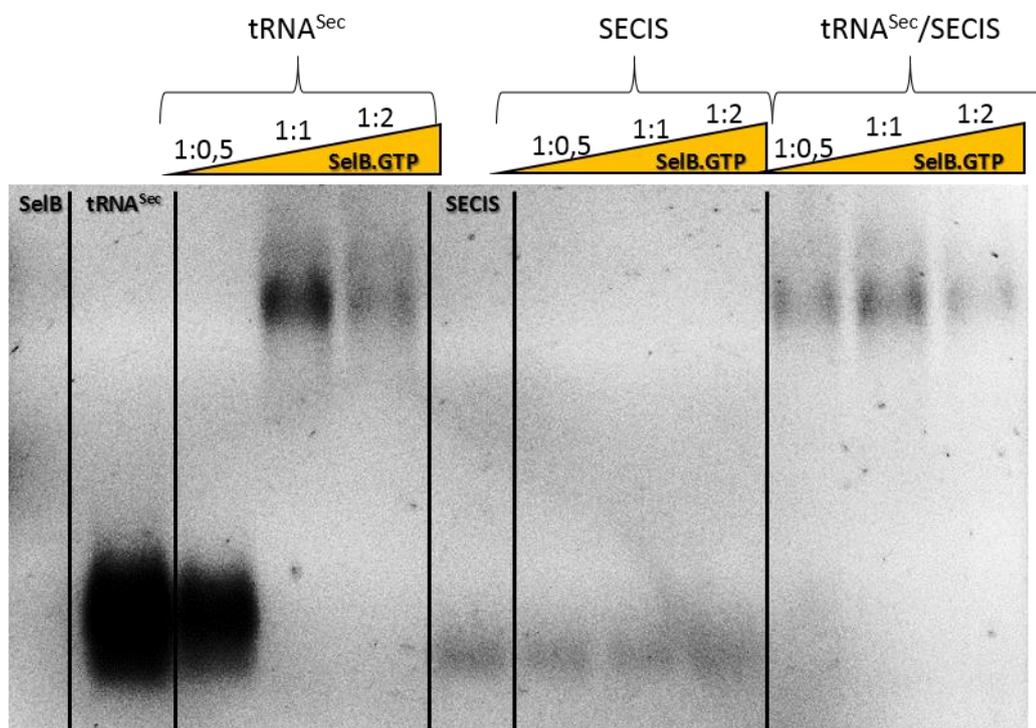


Figura 52 – Ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforética qualitativa em condições nativas. Foram utilizadas as amostras SelB,  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  e SECIS como controles à  $1 \mu\text{M}$  e titulações de concentrações em razões estequiométricas (0,5:1; 1:1 e 2:1).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por outro lado, a tentativa de formação do complexo  $\text{SelB.GTP.SECIS}^*$  não resultou na formação de complexos macromoleculares de massa superior, isto é, todas as amostras monitoradas permaneceram na mesma altura em gel relativas ao  $\text{SECIS}^*$  utilizado como controle independentemente da razão estequiométrica utilizada. Apesar de apresentar um valor de  $K_D$  baixo ( $57 \pm 13 \text{ nM}$ ) para essa interação, esse complexo apresentou comportamento diferenciado ao  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$ , onde a presença de ambos os RNAs se mostrou necessária para manter o complexo estável o suficiente para observação do aumento de massa nesse experimento.

Porém, utilizando-se de ambos os RNAs no preparo ( $\text{tRNA}^{\text{Sec}*}$  e  $\text{SECIS}^*$ ) foi observado um comportamento totalmente distinto ao observado previamente. Complexos macromoleculares de massa molecular superior foram observados até mesmo em razão estequiométrica inferior à razão equimolar, indicando a formação do complexo quaternário

SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS sem resquícios de RNAs livres. Esse resultado corrobora com a hipótese previamente proposta da sequência de eventos, onde o complexo mais estável formado necessita da presença de ambos os RNAs interagindo sequencialmente como esquematizado na figura 48.

#### 4.6 Análise da estabilidade térmica por calorimetria de varredura diferencial (DSC) dos complexos envolvendo SelB

A formação dos complexos proteína-RNA e proteína-nucleotídeo foram confirmadas através de experimentos de calorimetria diferencial de varredura (DSC) utilizando concentrações fixas de 14  $\mu\text{M}$  tRNA<sup>Sec</sup>, 12  $\mu\text{M}$  SECIS, 14  $\mu\text{M}$  tRNA<sup>Ala</sup> e 7  $\mu\text{M}$  SelB nas análises dos complexo binário (SelB.tRNA<sup>Sec</sup>), ternários (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.SECIS) e quartenário (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS). Além disso, experimentos que envolveram nucleotídeos de guanina foram acrescidos de 100  $\mu\text{M}$  de GTP e GDP, respectivamente para cada experimento. A partir dos termogramas obtidos (Figura 53) foi possível determinar os valores de  $T_m$  para cada complexo analisado além da  $C_p^{\text{max}}$  (capacidade calorífica à pressão constante máxima). Os resultados são expressos na tabela 11 e essas análises foram realizadas em colaboração com o Dr. Luís Guilherme Mansor Basso (USP-Ribeirão Preto).

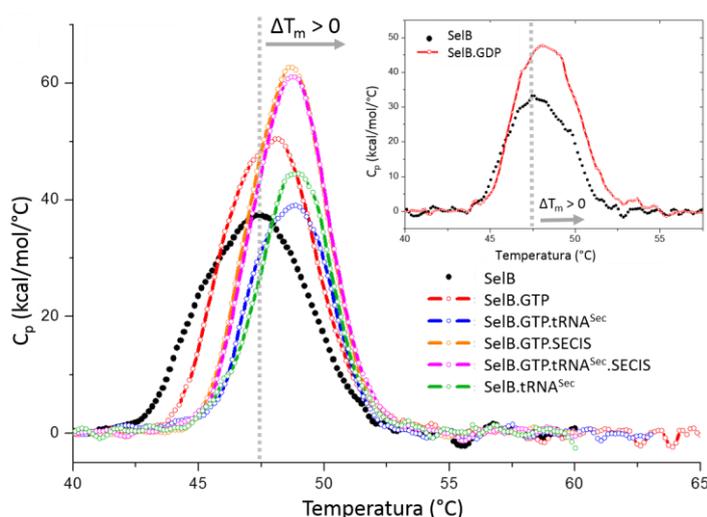


Figura 53 – Termogramas das análises de DSC dos complexos formados.  
Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>ξ</sup>

<sup>ξ</sup> Em colaboração com o Dr. Luís Guilherme Mansor Basso (FFCLRP/USP).

O valor de  $T_m$  obtido para SelB ( $47,4 \pm 0,2$ ) °C foi distinto ao previamente determinado por CD ( $48,2 \pm 0,4$ ) °C mesmo após ambas serem tratadas de maneira análoga no processo de retirada de RNAs endógenos. Essa diferença de 0,8 °C deve estar relacionada às etapas de desenovelamento de cada domínio de SelB separadamente, onde o ajuste do termograma feito por um modelo de dois estados (enovelado/desenovelado) não apresentou o melhor ajuste possível. Apesar disso, ainda foi a melhor escolha de modelo para a determinação de estados de transição, uma vez que aparentemente os domínios podem se desenovelar independentemente.

Todos os complexos analisados (Tabela 11) apresentaram deslocamento de  $T_m$ s positivos ( $\Delta T_m > 0$ ), contudo o complexo quaternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS apresentou o melhor termograma de transição, com a curva melhor definida e melhor ajuste utilizando um potencial de dois estados. Esse fato é um indício de um complexo termicamente mais estável.

Tabela 11 – Parâmetros termodinâmicos dos complexos de SelB por DSC.

Amostras	$T_{max}$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)
SelB	$47,4 \pm 0,2$	$210 \pm 10$
SelB.GTP	$48,1 \pm 0,1$	$220 \pm 20$
SelB.tRNA <sup>Sec</sup>	$49,0 \pm 0,1$	$210 \pm 10$
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup>	$48,9 \pm 0,1$	$260 \pm 10$
SelB.GTP.SECIS	$48,7 \pm 0,1$	$240 \pm 10$
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .SECIS	$48,7 \pm 0,2$	$240 \pm 10$

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de SelB.GTP resultou em uma diferença de 2,2 °C, cuja discrepância pode também estar relacionada ao desenovelamento diferencial de cada domínio de SelB. Complementarmente, o complexo SelB.GDP (*inset* da figura 53) também revelou uma  $\Delta T_m$  positiva, como esperado e previamente mostrado por CD.

Comparando-se à  $T_m$  de SelB, os deslocamentos de  $T_m$ s para valores superiores indicam complexos termicamente mais estáveis ( $T_m^{complexo} > T_m^{SelB}$ ) corroborando com os dados de formação de complexos macromoleculares observados anteriormente por outras técnicas.

#### 4.7 Mapeamento da superfície de interação de SelB com os RNAs específicos

Até 2015 não havia informações estruturais suficientemente relevantes de SelB ou homólogos. Para incrementar o conhecimento estrutural dessa macromolécula foram realizados experimentos de mapeamento da superfície de contato com os RNAs específicos através de troca isotrópica dos hidrogênios presentes nas amidas da cadeia principal, desde que expostas ao solvente, por deutério (Troca HDX) acoplada com a espectrometria de massas (HDX-MS). Esses experimentos foram conduzidos em colaboração com a Dra. Bibiana Monsor e o Prof. Dr. Mário Sérgio Palma (CEIS/UNESP – RC).

Inicialmente, amostras de SelB foram preparadas em tampão de análise acidificado (ácido fórmico adicionado) e submetidas à ação da pepsina (P6887, Sigma-Aldrich) por tempo determinado para a ação da protease. A pepsina age de maneira promíscua clivando nos sítios: Phe-Val, Gln-His, Glu-Ala, Ala-Leu, Leu-Tyr, Tyr-Leu, Gly-Phe, Phe-Phe e Phe-Tyr. Dessa maneira obtemos uma grande quantidade de peptídeos e com possíveis sobreposições, o que favorece as análises.

A amostra clivada foi então analisada em espectrômetro de massas micrOTOF-QII (Bruker Daltonics) utilizando diferentes filtros de  $m/z$  (relação massa/carga dos peptídeos) o que permitiu observar diferentes tamanhos de peptídeos obtidos. A partir dos valores de  $m/z$  observados experimentalmente e confrontados com a tabela predita pelo servidor PeptideCutter, foi possível identificar 79 peptídeos, isto é, uma cobertura de 52% da estrutura primária de SelB. Para a correta identificação dos peptídeos únicos de SelB, foram excluídos os peptídeos provindos da autoclivagem da pepsina.

Posteriormente, a amostra de SelB foi sujeita à marcação com 75% de óxido de deutério ( $D_2O$ ) por 5 e 30 minutos, respectivamente, e submetida as mesmas análises previamente realizadas para SelB sem marcação (Figura 54). Através de um mapeamento por mapa de calor (*heat map*) foi possível identificar os peptídeos e suas respectivas taxas de incorporação de deutério na sequência primária de SelB (Figura 54-A) ou nos modelos tridimensionais construídos pela modelagem teórica realizada inicialmente nesse projeto (Figura 54-B e C).

(A)

SelB t <sub>5min</sub>	MIIATAGHVDHGKTTLLQAITGVNADRLPEEKKRGMPTIDLGYAYWPQPDGRVPGFIDVPG
SelB t <sub>30min</sub>	MIIATAGHVDHGKTTLLQAITGVNADRLPEEKKRGMPTIDLGYAYWPQPDGRVPGFIDVPG
SelB t <sub>5min</sub>	HEKFLSNMLAGVGGIDHALLVVACDDGVMAQTREHLAILQLTGNPMLTVALTKADRVDEA
SelB t <sub>30min</sub>	HEKFLSNMLAGVGGIDHALLVVACDDGVMAQTREHLAILQLTGNPMLTVALTKADRVDEA
SelB t <sub>5min</sub>	RVDEVERQVKEVLRREYGFAEAKLEITAATEGRGMDALREHLLQLPEREHASQHSFRLAID
SelB t <sub>30min</sub>	RVDEVERQVKEVLRREYGFAEAKLEITAATEGRGMDALREHLLQLPEREHASQHSFRLAID
SelB t <sub>5min</sub>	RAETVKGAGLVVTGTALSGEVKVGDSLWLTGVNKPMPVRRLHAQNOPTETANAGQRIALN
SelB t <sub>30min</sub>	RAETVKGAGLVVTGTALSGEVKVGDSLWLTGVNKPMPVRRLHAQNOPTETANAGQRIALN
SelB t <sub>5min</sub>	IAGDAEKEQINRGDWLLADVPPEPFTRVIVELQTHTEPLTQWQPLHIHHAASHVTGRVSL
SelB t <sub>30min</sub>	IAGDAEKEQINRGDWLLADVPPEPFTRVIVELQTHTEPLTQWQPLHIHHAASHVTGRVSL
SelB t <sub>5min</sub>	EDNLAE LVFDTPLWLADNDRLLVLRDISARNTLAGARVVMNPPRRGKRKPEYLQWLASLA
SelB t <sub>30min</sub>	EDNLAE LVFDTPLWLADNDRLLVLRDISARNTLAGARVVMNPPRRGKRKPEYLQWLASLA
SelB t <sub>5min</sub>	RAQSDADALSVHLERGAVNLDFAWARQLNGEGMRELLQQPGYIQAGYSLLNAPVAARWQ
SelB t <sub>30min</sub>	RAQSDADALSVHLERGAVNLDFAWARQLNGEGMRELLQQPGYIQAGYSLLNAPVAARWQ
SelB t <sub>5min</sub>	RKILDTLATYHEQHRDEPGPGRERLRRLMALPMEDEALVLLLLIEKMRESGDIHSHHGWLHL
SelB t <sub>30min</sub>	RKILDTLATYHEQHRDEPGPGRERLRRLMALPMEDEALVLLLLIEKMRESGDIHSHHGWLHL
SelB t <sub>5min</sub>	PDHKAGFSEEQQAIWQKAEPLFGDEPWWVRDLAKETGTDEQAMRLTLRQAAQQGIITAI
SelB t <sub>30min</sub>	PDHKAGFSEEQQAIWQKAEPLFGDEPWWVRDLAKETGTDEQAMRLTLRQAAQQGIITAI
SelB t <sub>5min</sub>	KDRYYRNDRIVEFANMIRDLDQECGSTCAADFRDLGVGRKLAIQILEYFDRIGFTRRRG
SelB t <sub>30min</sub>	KDRYYRNDRIVEFANMIRDLDQECGSTCAADFRDLGVGRKLAIQILEYFDRIGFTRRRG
SelB t <sub>5min</sub>	NDHLLRDALLFPEK
SelB t <sub>30min</sub>	NDHLLRDALLFPEK

Legenda (%D<sub>2</sub>O)

(B)

(C)

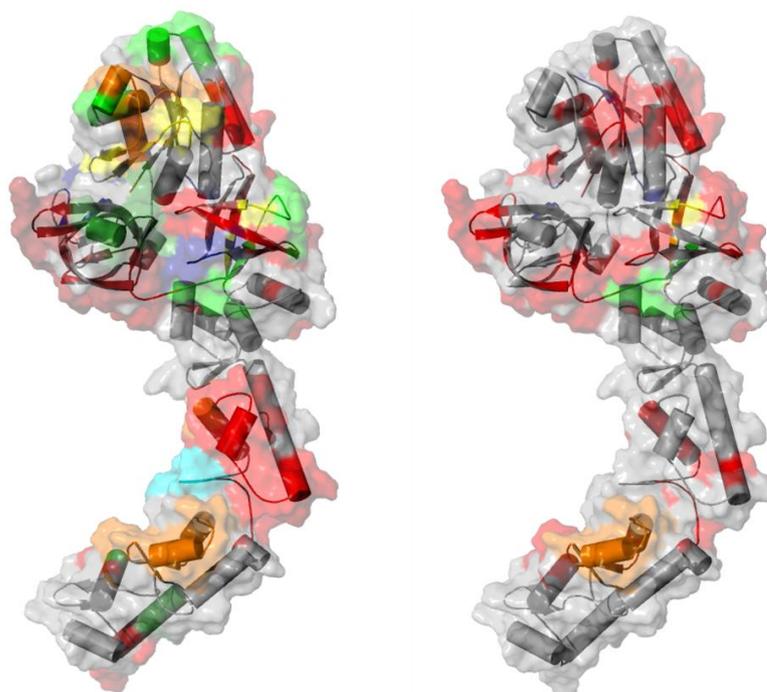


Figura 54 – Mapeamento da superfície acessível ao solvente de SelB através de HDX. (A) *Heat map* da estrutura primária de SelB para o tempo de 30 min de incorporação de deutério para os complexos SelB.GTP. Legenda do percentual de incorporação: 0-10% - azul escuro, 10-12,5% - azul, 12,5-20% - azul claro, 20-25% - ciano, 25-30% - verde escuro, 30-45% - verde claro, 45-55% amarelo, 55-70% - laranja, 70-80% marrom e 80-100% vermelho. *Heat map* da taxa de incorporação de deutério, para o complexo ternário (B) e quaternário (C), no modelo estrutural de SelB obtido por modelagem por homologia representado em *cartoon* e superfície.

Fonte: Elaborada pelo autor.

É evidente que para tempos maiores ( $T_{30}$  min), SelB apresenta maior taxa de incorporação com deutério apresentando uma quantidade maior de regiões em vermelho, 80-100% de incorporação (Figura 54-C). Além disso, foram encontrados apenas 65 peptídeos (14 a menos que SelB  $T_5$  min), o que torna o mapeamento deficitário para esse tempo de incorporação.

Interessantemente, SelB apresenta regiões conservadas com baixa incorporação (< 25%) em regiões internalizadas mesmo para tempos longos, caso das sequências I144-A149, L157-H160 ou R236-L239. Contudo, a superfície da molécula possui uma taxa de incorporação elevada (> 50%) em praticamente toda sua extensão.

As próximas análises consistiram na inclusão dos RNAs específicos de SelB na presença de concentrações saturantes de GTP, o que favorece a interação dessas macromoléculas. As amostras do complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> foram analisadas em tempo de incorporação longo (30 min) seguindo as mesmas etapas experimentais (Figura 55-A e B).

A intenção de acrescentar o tRNA<sup>Sec</sup> foi ocluir a superfície de SelB, o que consequentemente ficou menos acessível ao solvente e ação de marcação com D<sub>2</sub>O. Foram identificados 72 peptídeos, ou seja, 49% de cobertura da sequência de SelB. Contudo, os resultados revelaram informações cruciais da formação do complexo ternário.

As regiões Q280-L284, H292-R296, D310-T311 e R447-L450 apresentaram decréscimo na taxa de incorporação de deutério comparado com o mesmo tempo de marcação, logo, estavam menos acessíveis ao solvente (Figura 55-A). Esse fato indica a região na qual o tRNA<sup>Sec</sup> interagiu, de modo que ao se comparar com o modelo gerado previamente na seção 4.1.2 foi possível identificar uma interação crucial entre o braço variável e a região R447-L450 (Figura 55-B). Esse resultado vai de acordo com os trabalhos recentemente publicados sobre o possível reconhecimento e interação do braço variável com SelB e com os resultados provindos do projeto de mestrado do aluno Adriano de Freitas Fernandes onde são apresentadas pela primeira vez as constantes de dissociação de mutações presentes em todos os braços do tRNA<sup>Sec</sup>, concluindo que a estrutura em questão é crucial para o reconhecimento por SelB (dissertação e manuscrito em preparação).<sup>72,110</sup>

(A)

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **MIIATAGHVDHGKTTLLQAITGVNADRIPEEKRRGMTIDLGYAYW**QPDGGRVPGFIDVPG  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **MIIATAGHVDHGKTTLLQAITGVNADRIPEEKRRGMTIDLGYAYW**QPDGGRVPGFIDVPG

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **HEKFLSNMLAGVGGIDHALLVVACDDGVMAQTRHHLAILQLTGNPMLTVALTKFDRVDEA**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **HEKFLSNMLAGVGGIDHALLVVACDDGVMAQTRHHLAILQLTGNPMLTVALTKFDRVDEA**

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **RVDEVERQVKEVLR EYGF AEAKLITAAATEGRGMDALREHLLQLPEREHAS**CHSFR**LAIID**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **RVDEVERQVKEVLR EYGF AEAKLITAAATEGRGMDALREHLLQLPEREHAS**CHSFR**LAIID**

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **RAITVKGAGLVVVTGALSSEVKGDSLWLTGVNKPVRV**ALHAQ**NQPTETANAGQRIALN**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **RAITVKGAGLVVVTGALSSEVKGDSLWLTGVNKPVRV**ALHAQ**NQPTETANAGQRIALN**

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **IAGDAEKEQINRGDWLLADVP**PE**PFTRVIVELOTHPTLTQWQPLHIHHAASHVTGRVSL**L  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **IAGDAEKEQINRGDWLLADVP**PE**PFTRVIVELOTHPTLTQWQPLHIHHAASHVTGRVSL**L

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **EDNLAE LVI DTP LWLADNDRLVLRDISAR**N**TLAGARVVM LNPPRRGKRKPEYLQ**W**LASLA**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **EDNLAE LVI DTP LWLADNDRLVLRDISAR**N**TLAGARVVM LNPPRRGKRKPEYLQ**W**LASLA**

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **RAQSDADALSVHLERGA VNLADFAWARQLNGEGMRELLQ**Q**PGYIQAGYSLLNAPVAARWQ**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **RAQSDADALSVHLERGA VNLADFAWARQLNGEGMRELLQ**Q**PGYIQAGYSLLNAPVAARWQ**

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **RKILDTLATYHE**Q**HRDEPG**P**GRERLR**R**RMAL**P**ME**D**EALVLL**L**IEKMRESGD**I**HSHHG**W**LHL**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **RKILDTLATYHE**Q**HRDEPG**P**GRERLR**R**RMAL**P**ME**D**EALVLL**L**IEKMRESGD**I**HSHHG**W**LHL**

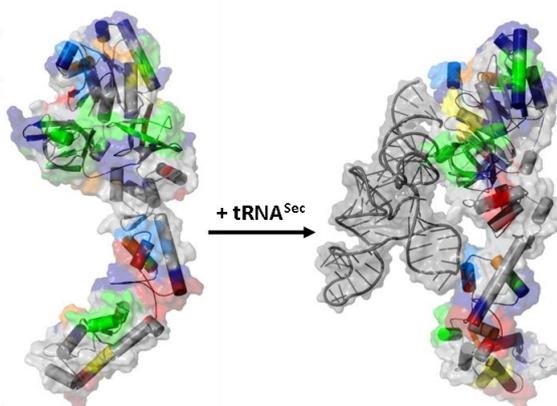
SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **PDHKAG**F**SEEQQAIWQKAEPLFGDEPWWVRDLAKETGTDEQAMRLTLR**Q**AA**Q**GIITAI**V****  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **PDHKAG**F**SEEQQAIWQKAEPLFGDEPWWVRDLAKETGTDEQAMRLTLR**Q**AA**Q**GIITAI**V****

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **KDRY**R**NRDRIVEFANMIRDL**D**Q**E**CGSTCAADFRDLGVGRKLA**I**Q**I**LEYFDRIGF**T**RRRG**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **KDRY**R**NRDRIVEFANMIRDL**D**Q**E**CGSTCAADFRDLGVGRKLA**I**Q**I**LEYFDRIGF**T**RRRG**

SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.t30min **NDHLLRDALL**F**PEK**  
 SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.t30min **NDHLLRDALL**F**PEK**

0-10% 10-12,5% 12,5-20% 20-25% 25-30% 30-45% 45-55% 55-70% 70-80% 80-100%  
 Legenda (% D<sub>2</sub>O)

(B)



(C)

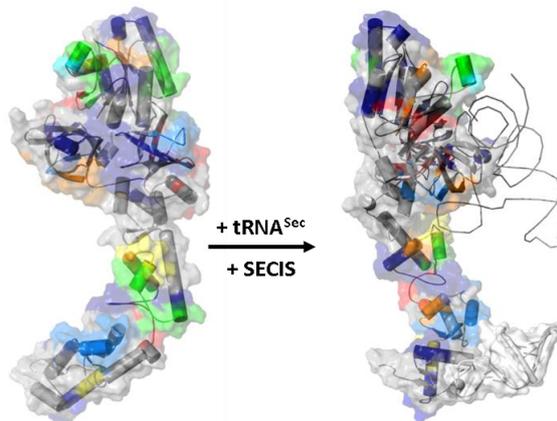


Figura 55 – Mapeamento da superfície acessível ao solvente dos complexos de SelB através de HDX. (A) *Heat map* da estrutura primária de SelB para o tempo de 30 min de incorporação de deutério para os complexos SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP:tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Legenda do percentual de incorporação: 0-10% - azul escuro, 10-12,5% - azul, 12,5-20% - azul claro, 20-25% - ciano, 25-30% - verde escuro, 30-45% - verde claro, 45-55% amarelo, 55-70% - laranja, 70-80% marrom e 80-100% vermelho. *Heat map* da taxa de incorporação de deutério, para o complexo ternário (B) e quaternário (C), no modelo estrutural de SelB obtido por modelagem por homologia representado em *cartoon* e superfície.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, o complexo quaternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS foi analisado, obtendo-se a mesma cobertura que o complexo ternário (Figura 55-A). Sabidamente SelB interage com SECIS através da WHD4, ou domínio C-terminal, logo, as regiões de diminuição da taxa de incorporação de SelB foram encontradas nessa região. Os peptídeos R510-E520, G534-Y544 e N555-E562 apresentaram decréscimo significativo na incorporação de deutério, indicando assim serem os responsáveis pelo reconhecimento de SECIS (Figura 55-C) o que indica a correta posição do elemento SECIS presente na estrutura cristalográfica obtida para o truncamento desse domínio em complexo com o *loop* apical (PDB.ID 2UWM) e com o modelo previamente proposto na seção inicial do capítulo de resultados e discussões. Essas informações foram recentemente confirmadas através da estrutura do complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS obtido por Cryo-EM.<sup>72</sup>

#### 4.8 Mudanças conformacionais de SelB na interação com os RNAs

Os EFs, incluindo SelB, apresentam mudança conformacional quando interagem com GTP<sup>87</sup>, o que permite um enovelamento tal que favorece a interação com o respectivo tRNA e mantém o GTP numa posição conhecida como GTP ativado.<sup>72,87</sup> Porém, não existem estudos até o momento que garantam uma mudança de conformação na interação com o tRNA específico e, mais ainda, para SelB que deve interagir com dois RNAs distintos.

Com o intuito de verificar possíveis mudanças conformacionais de SelB.GTP ao interagir com o tRNA<sup>Sec</sup> e posteriormente SECIS, medidas de espectroscopia de infravermelho foram realizadas. Semelhantemente ao CD, essa técnica permite a determinação do percentual de estruturas secundárias da amostra analisadas. No entanto, pelo fato dos modos normais de vibração dos RNAs (1240 - 1075 cm<sup>-1</sup>) serem distintos dos presentes em proteínas (1700 – 1600 cm<sup>-1</sup>), possibilita uma análise sem que haja contribuição dos ácidos nucléicos. Os experimentos e análises foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Cornélio do IBILCE/UNESP.

Inicialmente, foi realizada a análise do espectro IR-médio das varreduras para SelB. De início, os pequenos *spikes* experimentais foram removidos, tendo por base a avaliação do desvio do espectro de segunda derivada, que seria reprovado no caso do desvio das frequências ultrapassarem um número maior que 6 cm<sup>-1</sup>. Abaixo desse valor foi considerado como tolerável, pois as bandas de assinalamento são largas e os assinalamentos de estruturas secundárias mantem-se estáveis dentro dessa variação.

Na primeira etapa, foram utilizadas sete curvas gaussianas para o ajuste da banda da

amida-I analisada. As posições centrais de cada gaussiana foram estabelecidas de acordo com as estruturas secundárias e os assinalamentos previamente conhecidos para cada estrutura secundária (Figura 56-A).

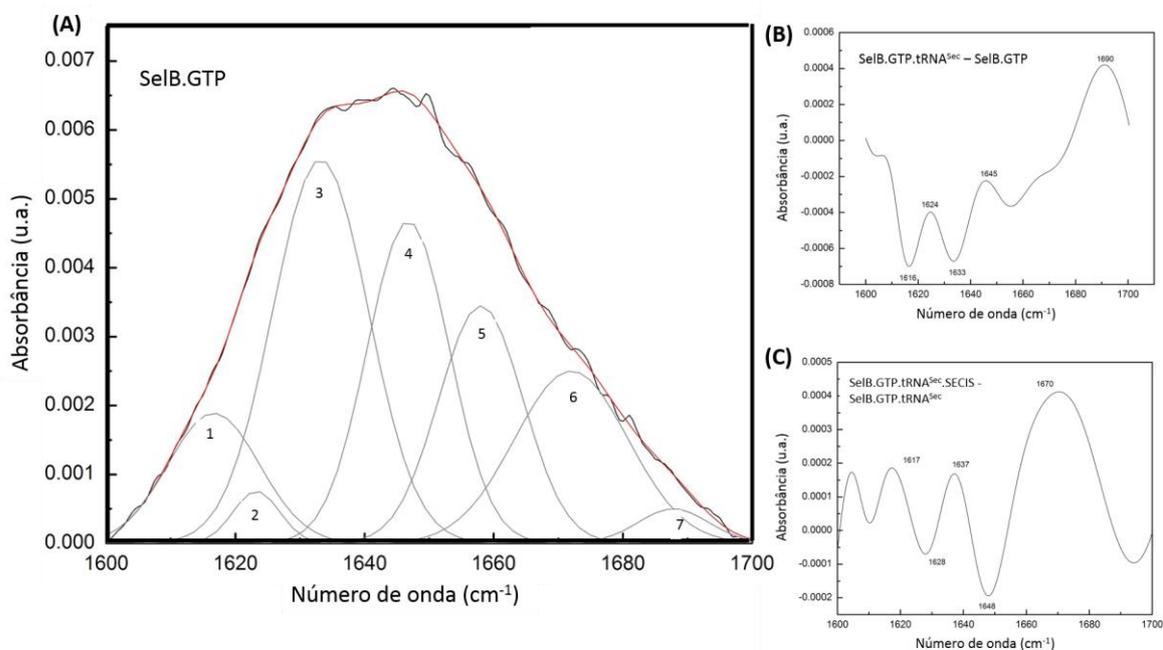


Figura 56 – Quantificação das estruturas secundárias de SelB e variação na presença dos RNAs (A) Análise da banda da amida-I de SelB.GTP com ajuste da curva de deconvolução pelas 7 gaussianas ( $\beta_{\perp}$  - 1610 cm<sup>-1</sup>,  $\beta_{\parallel}$  - 1623 cm<sup>-1</sup>,  $\beta_{\perp}$  - 1633 cm<sup>-1</sup>, randômicas - 1644 cm<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -hélices - 1654 cm<sup>-1</sup>, volta - 1674 cm<sup>-1</sup>,  $\beta_{\perp}$  - 1690 cm<sup>-1</sup>). (B) Espectro de diferença SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> - SelB.GTP. (C) Espectro de diferença SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS - SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.  
Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>6</sup>

Os percentuais de estrutura secundária para SelB.GTP, apresentados na tabela 12, estão de acordo com o percentual conhecido da literatura. Este é dado pelas estruturas homólogas resolvidas,<sup>72,87,107</sup> através dos primeiros resultados de SelB de *E. coli* por meio de medidas de CD e pelos resultados previamente apresentados nesse trabalho na seção 4.4.1.<sup>107</sup>

Para as análises dos complexos cujos RNAs são presentes, foi utilizada a metodologia de espectros de diferença, onde o espectro deconvoluído do complexo de interesse foi subtraído do complexo anterior para a análise da diferença do sinal provindo por eventuais mudanças de estruturas secundárias. Sendo assim, o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> teve seu espectro subtraído de SelB.GTP (Figura 56-B) e os máximos e mínimos observáveis trazem a informação necessária das mudanças conformacionais, também apresentadas na Tabela 12.

<sup>6</sup> Em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Cornélio (UNESP/SJRP).

Destaca-se a variação de estrutura em  $\alpha$ -hélices com um aumento de 2,4 vezes e consequente diminuição de estruturas em volta (1,4 vezes) e em fitas- $\beta_{\perp}$  (17,6 vezes). Além disso, fica evidente uma alteração de fitas- $\beta_{\perp}$  para fitas- $\beta_{\parallel}$ . Essa mudança de estruturação secundária deve ocorrer para permitir a correta acomodação do tRNA<sup>Sec</sup> nas WHD 2 e 3.

Tabela 12 – Percentual de estruturas secundárias para cada complexo macromolecular analisado.

<b>Estrutura secundária</b>	<b>SelB.GTP</b>	<b>SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup></b>	<b>SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS</b>
$\beta_{\perp}$ (1690 cm <sup>-1</sup> )	2,9	2,3	2,1
Volta (1674 cm <sup>-1</sup> )	16,1	11,6	9,8
$\alpha$ -hélices (1654 cm <sup>-1</sup> )	15,6	37,2	39,9
Randômicas (1644 cm <sup>-1</sup> )	23,1	22,4	11,3
$\beta_{\perp}$ (1633 cm <sup>-1</sup> )	29,9	1,7	24,6
$\beta_{\parallel}$ (1623 cm <sup>-1</sup> )	2,2	22,8	10
$\beta_{\perp}$ (1610 cm <sup>-1</sup> )	10	1,8	2,2

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>6</sup>

Analogamente, o espectro de diferença do complexo quaternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS foi obtido pela subtração do espectro previamente obtido para SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. O aspecto que ressalta para esse complexo foi a diminuição considerável de estruturas randômicas, ou seja, não estruturadas de 22,4% para 11,3%. Isso indica um ganho de estruturação secundária dividida entre estruturas em hélices e fitas com uma contribuição majoritária para fitas- $\beta_{\perp}$  (28,9% ao total). Esse resultado mostra que a conexão entre as WHDs 3 e 4 não é estruturada, e deve se enovelar em contribuições de fitas- $\beta$  quando o complexo quaternário é montado.

<sup>6</sup> Em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Cornélio (UNESP/SJRP).

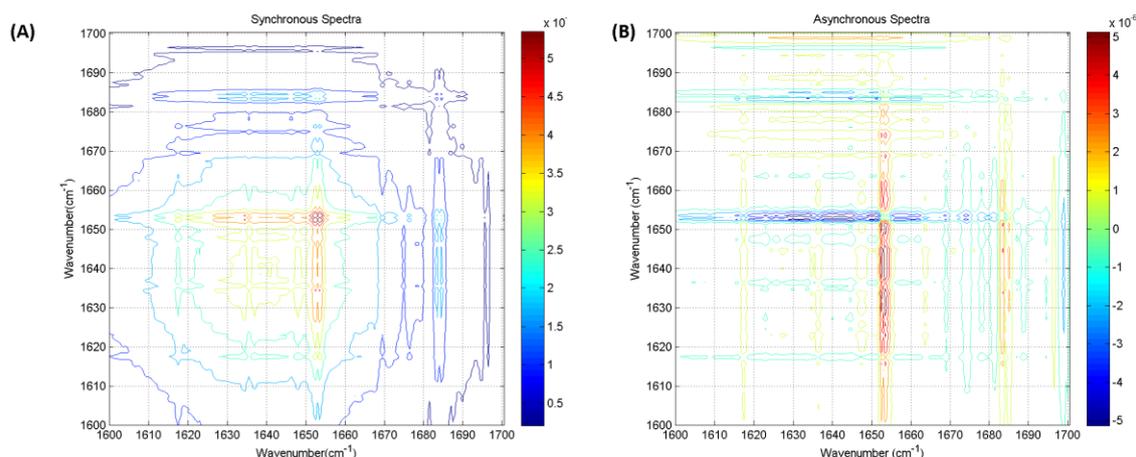


Figura 57 – Análise 2D dos espectros de FTIR. (A) Análise do espectro sincrônico e (B) do espectro assíncrono, indicando a formação preferencial de estruturas secundárias em  $\alpha$ -hélices.  
Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>6</sup>

Sabendo a sequência de eventos de interação previamente determinada pelas demais técnicas utilizadas, foi possível a construção de uma representação bidimensional da variação de estruturas secundárias ao analisar os espectros de diferença de SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> comparativo à SelB.GTP (Figura 57-A) e do complexo quaternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS com relação ao complexo ternário (Figura 57-B). Isso permite a indicação visual de uma elevada variação nos elementos de estrutura em  $\alpha$ -hélices na formação dos complexos, o que sugere em ganho de estruturas desse tipo ao interagir com os RNAs específicos da via, podendo servir como reconhecimento para o favorecimento da interação com o parceiro subsequente na via de biossíntese de Sec.

Esses resultados devem ser confirmados através da resolução estrutural dos complexos ternários e quaternário, preditos nas perspectivas futuras da continuidade desse projeto.

#### 4.9 Análises estruturais dos complexos

Como já mencionado previamente, no início desse projeto eram escassas as informações estruturais relevantes sobre SelB e seus complexos. Portanto, estudos relativos à obtenção de informações estruturais se faziam cruciais para a validação dos modelos teóricos de interação bem como angariar informações desse sistema. Por isso, medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo, tentativas de cristalização e estudos por microscopia eletrônica de transmissão foram amplamente utilizados nesse projeto.

<sup>6</sup> Em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Cornélio (UNESP/SJRP).

#### 4.9.1 Modelos a baixa resolução de SelB e seus complexos

Devido à necessidade de obtenção de informações estruturais de SelB e seus complexos, foram realizados esforços para determinar os modelos a baixa resolução através de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS). Em colaboração com o Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto (UNESP/Botucatu) e do aluno Adriano de Freitas Fernandes. As curvas experimentais de espalhamento foram coletadas na linha de luz síncrotron SAXS-1 do LNLS/CNPEM utilizando as concentrações de 15  $\mu\text{M}$  e concentrações idênticas para os complexos SelB.GTP, SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (Figura 58). Somado a isso, medidas do tRNA<sup>Sec</sup> em solução também foram realizadas e analisadas para a determinação de um envelope molecular para o tRNA<sup>Sec</sup>.

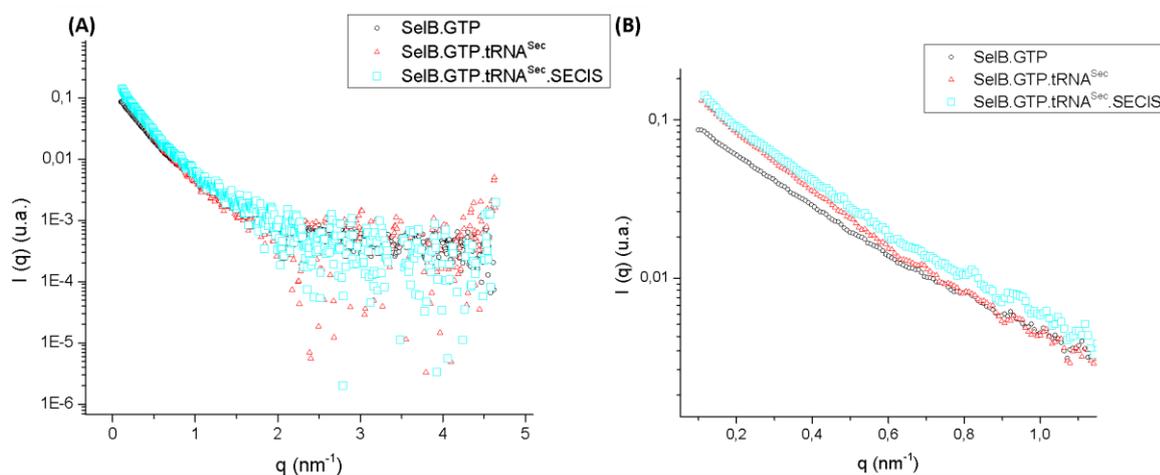


Figura 58 – Resultados das curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo. (A) Curvas de espalhamento experimental das amostras SelB.GTP (●), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (▲) e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (■). (B) Gráfico representando o início das curvas de espalhamento utilizados para a determinação do Raio de *Guinier* das amostras SelB.GTP (●), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (▲) e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (■), resultando nos raios 4,88; 5,21 e 5,33 nm, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

A partir das curvas experimentais coletadas (Figura 58-A) foi possível a determinação do raio de giro, ou raio de *Guinier* ( $R_g$ ), que consiste na aproximação da partícula em solução para um esfera de raio igual à  $R_g$  calculado pela análise da região de baixo ângulo do padrão de espalhamento ( $qR_g < 1,3$ ). O tratamento das curvas experimentais de espalhamento permitiu a determinação das curvas de distribuição de probabilidade ( $p(r)$ ) dos complexos após o tratamento da subtração da constante de *Porod*, que foi previamente calculada, e o que elimina o efeito da elevada flexibilidade das moléculas em solução (Figura 59).

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

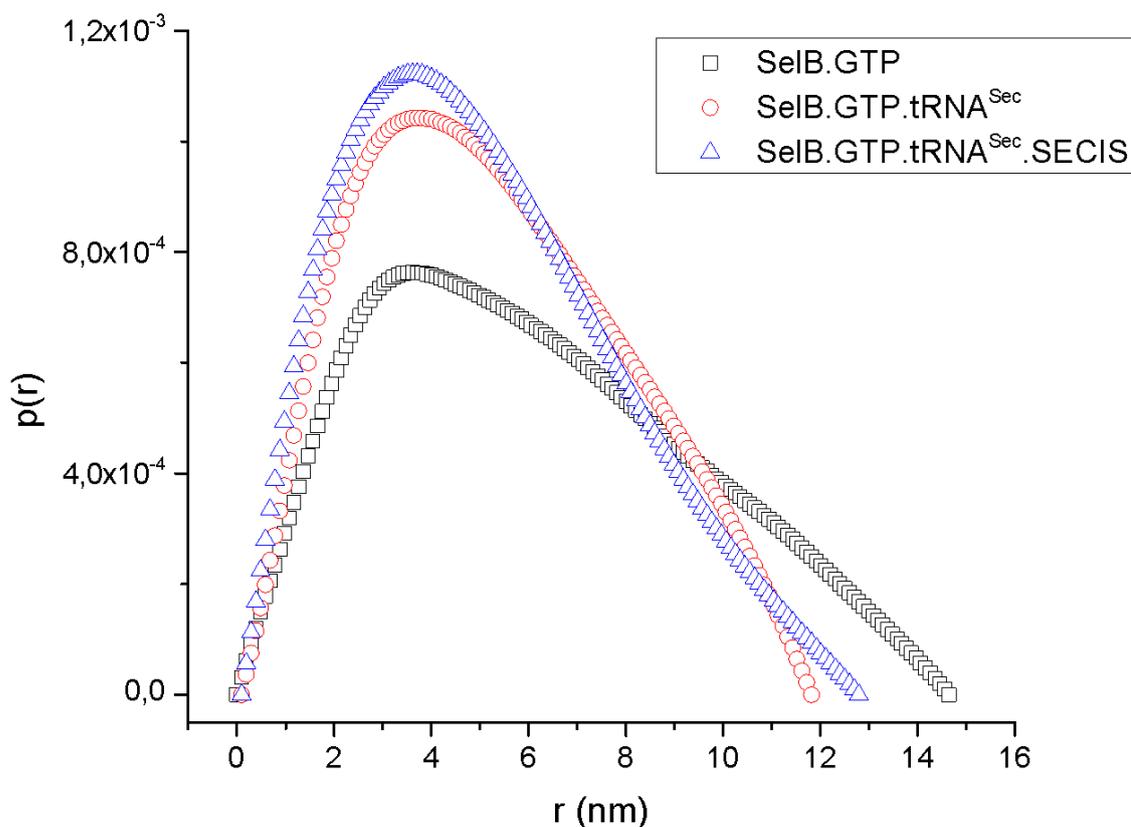


Figura 59 – Curvas de distribuição de probabilidade  $p(r)$  obtida pela Transformada de *Fourier* das curvas de espalhamento de raios-X. São mostradas as  $p(r)$  das amostras SelB.GTP ( $\square$ ), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> ( $\circ$ ) e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS ( $\blacktriangle$ ). A partir desses dados foi possível determinar o diâmetro máximo das partículas em solução como sendo: 14,65; 15,0 e 18,77 nm, respectivamente.  
Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>†</sup>

As curvas de distribuição refletem a probabilidade de átomos da amostra de interesse estarem presentes em função da distância radial da partícula em solução. Essas informações são cruciais para a determinação do diâmetro máximo ( $D_{\text{máx}}$ ) da molécula além do perfil da curva refletir a forma em solução da distribuição eletrônica da partícula espalhadora. Dessa forma, é possível inferir um envelope molecular à baixa resolução baseando nos dados da curva de distribuição obtidos sem a imposição de simetria pelo método *ab initio* (P1) (Figura 60).

Analisando-se o perfil das curvas de distribuição fica nítido o aumento do  $D_{\text{máx}}$  dos complexos com o aumento da complexidade das interações, além de alterar as formas dos complexos em solução. Isto é evidente pela mudança nos pontos de inflexão da curva para diâmetros grandes ( $r > 12$  nm).

<sup>†</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

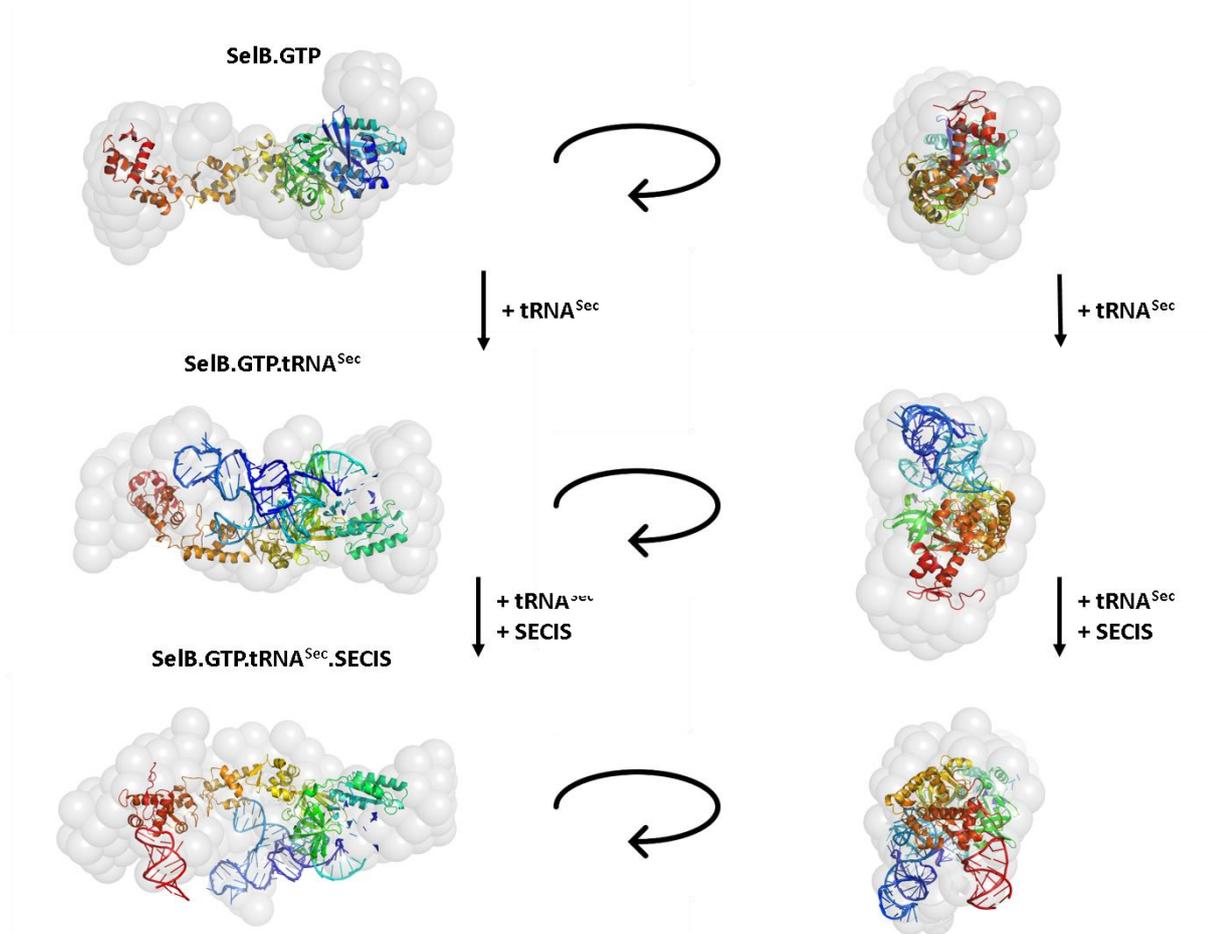


Figura 60 – Modelos à baixa resolução dos envelopes moleculares dos complexos SelB.GTP, SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Os envelopes moleculares apresentados em esferas (cinza) foram ajustados com as estruturas dos complexos gerados por modelagem molecular (seções 4.1.1 e 4.1.2) em que SelB foi representada em *cartoon* e colorida em *rainbow*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O ajuste dos modelos estruturais realizados nos envelopes moleculares de baixa resolução indicam a elevada flexibilidade dos complexos em solução mesmo após a subtração da constante de *Porod*, fato esse constatado também pela análise do gráfico de *Kratky* (Figura 61).

Além disso, esses modelos ajudaram a corroborar com os modelos teóricos preditos (seção 4.1.2) e com os dados de mapeamento da superfície de interação de SelB com os RNAs (seção 4.7). Isto foi possibilitado através do ajuste coerente no interior da densidade gerada e com mudança considerável da forma dos complexos.

Embasando-se nas curvas experimentais (Figura 58-A) e nas curvas de distribuições calculadas (Figura 59), foi possível determinar os parâmetros contidos na tabela 13.

Tabela 13 – Dados obtidos pelas análises de SAXS e determinação de parâmetros hidrodinâmicos.

	<b>Massa molecular (kDa)</b>	<b>D<sub>máx</sub> (nm)</b>	<b>Raio de Guinier (nm)</b>	<b>R<sub>g</sub>/R<sub>h</sub></b>
<b>SelB.GTP</b>	78,0 ± 10,3	14,65	4,880 ± 0,004	1,54
<b>SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup></b>	180,7 ± 44,6	15,0	5,210 ± 0,004	1,33
<b>SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS</b>	136 ± 18	17,0	5,330 ± 0,004	-
<b>tRNA<sup>Sec</sup></b>	24,5 ± 5,1	9,5	2,551 ± 0,008	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

A massa molecular estimada para cada complexo foi determinada utilizando o servidor online SAXSMoW<sup>144</sup> a partir da  $p(r)$  e obtenção do gráfico de *Kratky* (Figura 61), como já mencionado, importante para a interpretação da flexibilidade da molécula em solução. Na análise do gráfico de *Kratky* fica evidente que SelB pode ser categorizada como uma proteína com flexibilidade, assim como os demais complexos. O espalhamento é mais intenso dos RNAs, uma vez que são eletronicamente mais densos, assim, contribuem interferindo no padrão de espalhamento em altos ângulos ( $q > 3 \text{ \AA}^{-1}$ ), como o observado nas figuras 58-A e 61. Esses efeitos de interferência e baixa relação sinal/ruído também são ampliados devido à baixa concentração dos complexos nas análises.

Além dos parâmetros hidrodinâmicos usuais determinados por SAXS tais como massa molecular dos complexos, diâmetro máximo e raio de giração em solução ( $R_g$ ), utilizando os dados previamente obtidos pelas análises de ultracentrifugação analítica foi possível determinar a razão entre o raio de *Guinier* (giração,  $R_g$ ) e o raio de *Stokes* (hidrodinâmico,  $R_h$ )  $R_g/R_h$  para dois dos complexos analisados, indicando novamente a elevada flexibilidade desses complexos em solução, uma vez que proteínas globulares apresentam valor de aproximadamente 0,775 enquanto que a maioria das proteínas com mais de 100 resíduos de aminoácidos possuem regiões desestruturadas, o que faz com que esse valor seja de ~1,3. Por fim, proteínas intrinsecamente desordenadas ou proteínas denaturadas apresentam valor de  $R_g/R_h$  superior a 1,4.

As massas moleculares calculadas pela integração dos gráficos de *Kratky* apresentaram valores que divergiram dos valores preditos em aproximadamente 15%, provavelmente pela interferência da flexibilidade das moléculas em solução. Contudo, fica claro que as massas moleculares aumentam com o aumento do complexo, assim como o  $R_g$  e  $D_{máx}$  já mencionados.

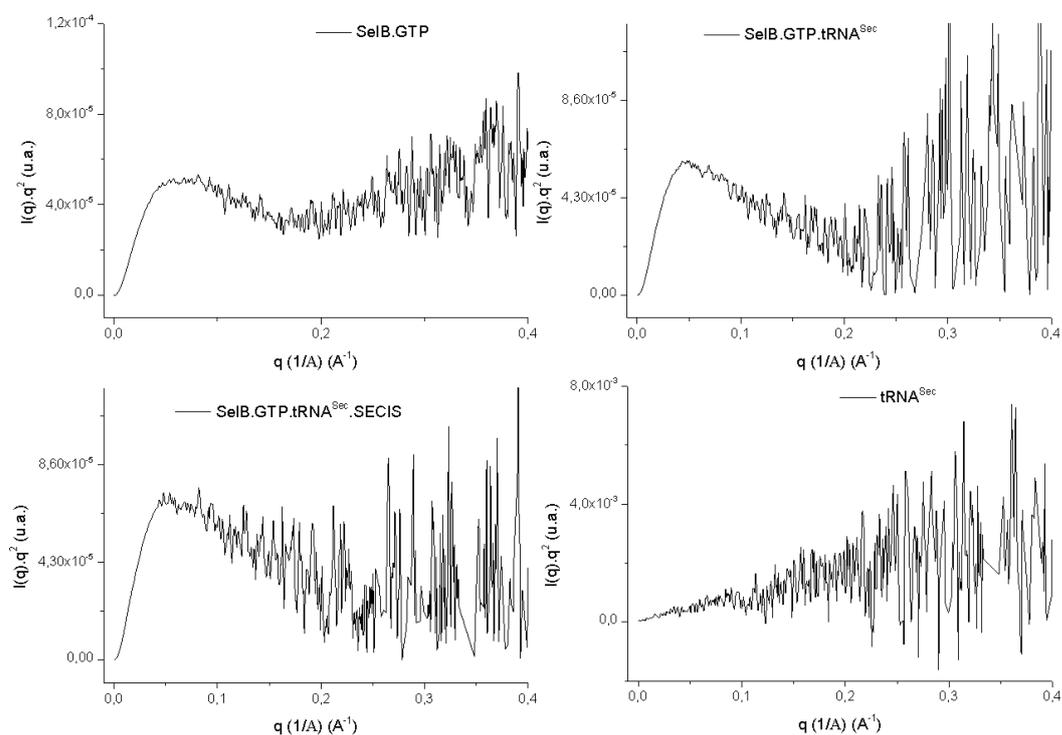


Figura 61 – Gráfico de *Kratky* dos complexos analisados revelando a flexibilidade dessas moléculas em solução.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.<sup>‡</sup>

Além dos parâmetros já apresentados, a constante de *Porod* que descreve a rugosidade da superfície da partícula em solução, ou seja, uma aproximação da área superficial das moléculas, mostrou um aumento de 52% na formação do complexo ternário e de apenas 7% entre os complexos ternário e quaternário. Isso mostra que a superfície da partícula não deve sofrer alterações bruscas na interação com o elemento SECIS, o que faz sentido dado à pequena diferença no volume e massa incorporados ao complexo.

As mesmas análises foram realizadas para o conjunto de dados coletado para o tRNA<sup>Sec</sup> (Figura 62). A partir da média das curvas de espalhamento a baixo ângulo (Figura 62-A) foi possível determinar a curva de distribuição de probabilidade (Figura 62-B) e, assim, gerar modelos estruturais do envelope molecular a baixa resolução (Figura 62-C).

<sup>‡</sup> Em colaboração com o aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes (IFSC/USP).

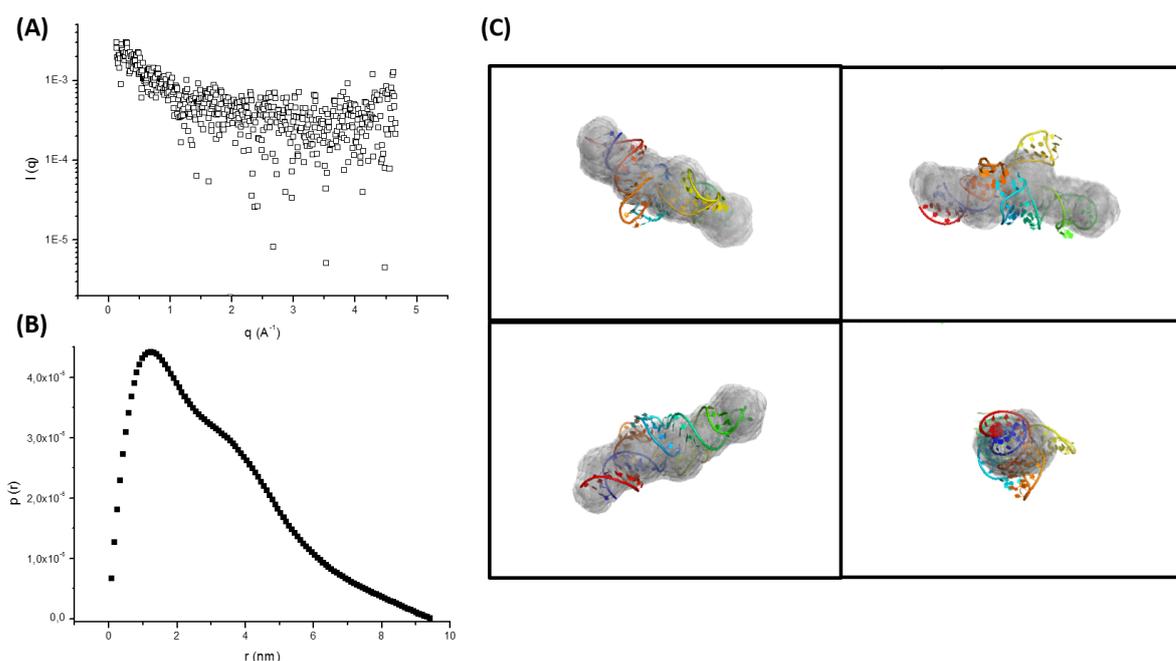


Figura 62 – Resultados dos experimentos de SAXS para o tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*. (A) Curvas de espalhamento experimental de tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Curvas de distribuição de probabilidade  $p(r)$  obtida pela Transformada de *Fourier* das curvas de espalhamento de raios-X, resultando no  $D_{\text{máx}}$  9,5 nm. (C) Modelos à baixa resolução dos envelopes moleculares do tRNA<sup>Sec</sup>. O envelope molecular apresentado em esferas (cinza) foi ajustado com a estrutura cristalográfica do tRNA<sup>Sec</sup> humano (PDB.ID 3A3A) representado em *cartoon*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O envelope molecular gerado foi ajustado com a estrutura do tRNA<sup>Sec</sup> humano (PDB.ID 3A3A) e os parâmetros calculados foram representados na tabela 11, sendo coerentes com o tamanho ( $R_g$  e  $D_{\text{máx}}$ ) da partícula. Além disso, o modelo obtido é semelhante ao enovelamento canônico para os tRNAs e a dados prévios utilizando essa metodologia para esse tipo de macromolécula.

#### 4.9.2 Tentativas de cristalização

Uma vez que informações estruturais são extremamente relevantes para a compreensão dos mecanismos aos quais as macromoléculas são participantes, ensaios de cristalização foram realizados com o objetivo de obter monocristais que apresentassem padrões de difração construtivos.

Para isso foram realizadas triagens iniciais de possíveis condições de cristalização de SelB e o complexo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS, ambos em concentrações saturantes de GTP. Dado o baixo rendimento no processo de obtenção dessa amostra, utilizou-se 16 L de cultura para a expressão e posterior purificação da amostra com a única finalidade desses testes iniciais de

cristalização.

Como SelB possui diferentes domínios conectados por *links* extremamente flexíveis, as tentativas de cristalização se tornam um objetivo realmente desafiador. Contudo, mesmo com enovelamento complexo e não favorável para a formação de contatos cristalinos, foi possível obter monocristais (Figura 63) em algumas condições testadas (Tabela 14).

Tabela 14 – Condições favoráveis de cristalização de SelB.

<b>A</b> <b>(SelB.GTP)</b>	<b>B</b> <b>(SelB.GTP.RNAs)</b>	<b>C</b> <b>(SelB.GTP.RNAs)</b>	<b>D</b> <b>(SelB.GTP)</b>
Crystal Screen HT (HAMPTON RESEARCH)	SG1 HT-96 (Molecular Dimensions)	Morpheus (Molecular Dimensions)	JCSG- <i>plus</i> HT-96 (Molecular Dimensions)
A04: 0,1 M tris/HCl pH 8,5 2,0 M sulfato de amônio	E03: 0,1 M Hepes pH 7,5 0,2 M cloreto de magnésio 30% v/v PEG 400	A03: 0,1 buffer system 1 pH 6,5 0,06 M divalentes 50% v/v precipitantes 4	F01: 0,1 M MES 0,05 M cloreto de césio 30% v/v Jeffamina® M-600

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todos os testes realizados no equipamento de raio-X Rigaku R-AXIS-IV<sup>++</sup> (Rigaku), que possuímos no laboratório de biologia estrutural (LBEst-IFSC/USP), foram infrutíferos e não foi possível obter nenhum padrão de difração significativo para proceder com a resolução estrutural. Devido a isso, os cristais foram congelados e serão coletados na linha de luz síncrotron MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEN) e em SOLEIL (França) em datas futuras, sendo assim uma das perspectivas em aberto para a continuidade do projeto.

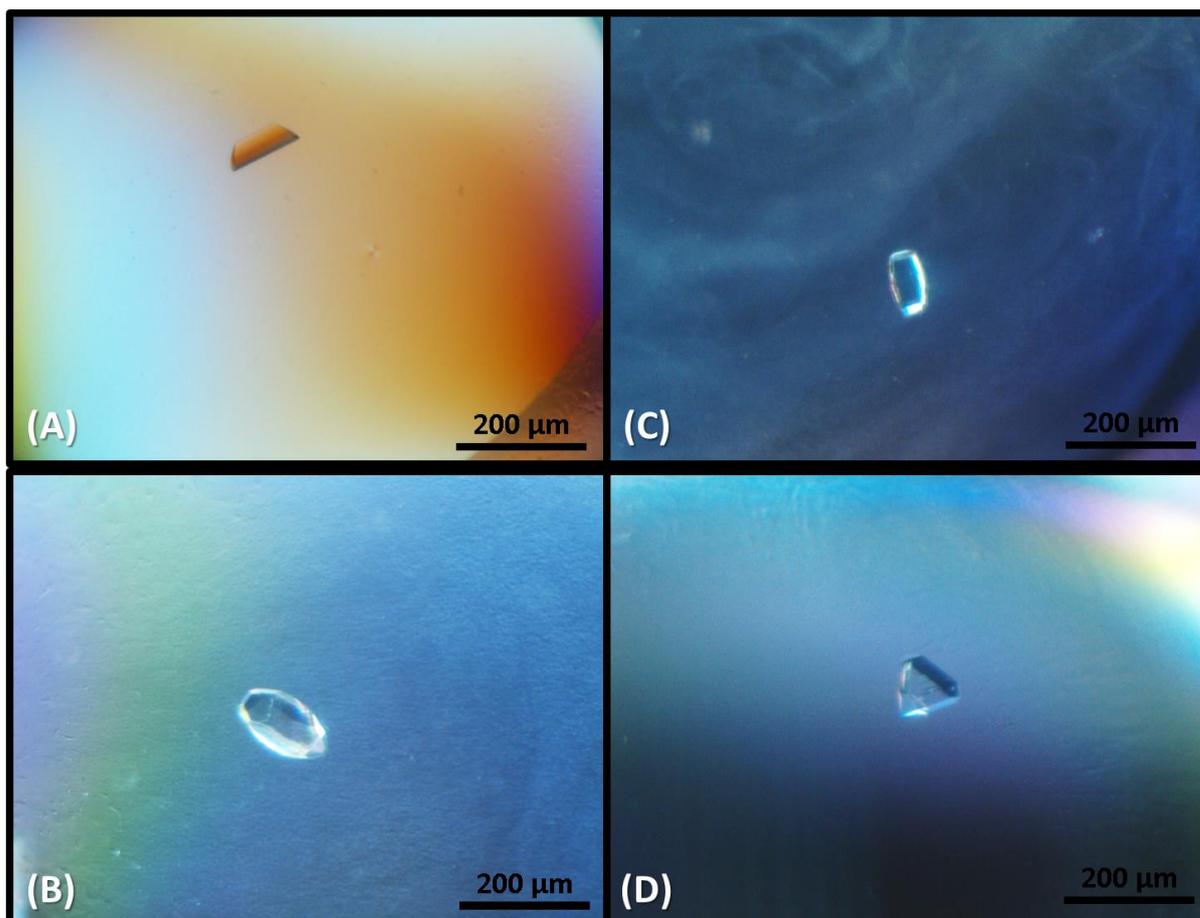


Figura 63 – Ensaio de cristalização de SelB e seus complexos. (A) Cristal obtido para a amostra SelB.GTP com o kit comercial CS (Hampton Research) condição A04. (B) Cristal do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS kit SG1 (Molecular Dimensions) condição E03. (C) Cristal do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS kit Morpheus (Molecular Dimensions) condição A03. (D) Cristal obtido para a amostra SelB.GTP com o kit comercial JCSG+ HT-96 (Molecular Dimensions) condição F01. Todos esses cristais foram obtidos no sistema automatizado *HoneyBee* 963 (DigiLab) com micro gotas de 0,2  $\mu$ L de amostra e mesmo volume de solução do poço em placas de 96 ensaios simultâneos no método de *sitting drop* e as imagens dos cristais foram coletadas utilizando um estereo-microscópio Discovery.V20 acoplado a uma câmera AxioCam MRC-5 (Zeiss) e software integrado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 4.9.3 Estudos por microscopia eletrônica de transmissão

Finalmente, a metodologia de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) vem sendo empregadas no estudo desse sistema desde 2011 em colaboração com o Dr. Rodrigo Villares Portugal do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano – CNPEM). Experimentos utilizando contraste negativo (*negative stain*, NS-EM) e preparo em gelo vítreo (Cryo-EM) foram publicados recentemente por nosso grupo de pesquisa e colaboradores,<sup>95-96</sup> apesar de ser uma técnica recentemente implantada no Brasil. Devido a isso, experimentos

foram realizados no *Netherland Centre of Nanoscopy* (NeCEN) vinculado à *Universiteit Leiden* (Holanda) no período de doutoramento sanduíche (Janeiro à Julho de 2015) pelo programa “Ciência Sem Fronteiras” (CsF - CNPq).

#### 4.9.3.1 Complexos de interação com ribossomo

A ausência de informações estruturais de SelB motivaram estudos por diferentes abordagens, dentre elas a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Contudo, SelB e os complexos com os RNAs não possuem massa e tamanho suficientes para a utilização dessa metodologia. Por isso, a associação com uma macromolécula maior seria necessária. Haja visto que SelB e seus complexos interagem com o ribossomo (seção 4.5.2.2) e são estáveis (seção 4.6), estudos estruturais utilizando TEM foram iniciados.

Foram coletados 4 conjuntos de dados utilizando preparo em contraste negativo com 2% de acetato de uranila: (i) ribossomo (Figura 64-A); ii) ribossomo.SelB.GTP (Figura 64-B); iii) ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (Figura 64-C) e iv) ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (Figura 64-D). Cada conjunto de dados possui 12 imagens coletadas em um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G<sup>2</sup>F20 HRTEM *single-tilt* (Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE/DeMa - UFSCar) operando em 200 kV em uma câmera TIA 1 Mp (FEI) de alta resolução utilizando 1 segundo de exposição e -5  $\mu\text{m}$  de *defocus*.

A amostra contendo somente o ribossomo montado foi utilizada como controle da correta montagem do complexo ribossomal após a diluição em tampão 100 mM fosfato de potássio pH 7,0; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 5 mM MgSO<sub>4</sub>. Conferiu-se a monodispersividade e tamanho da partícula visualizada, sendo condizentes com o ribossomo procariótico (~ 25 nm).

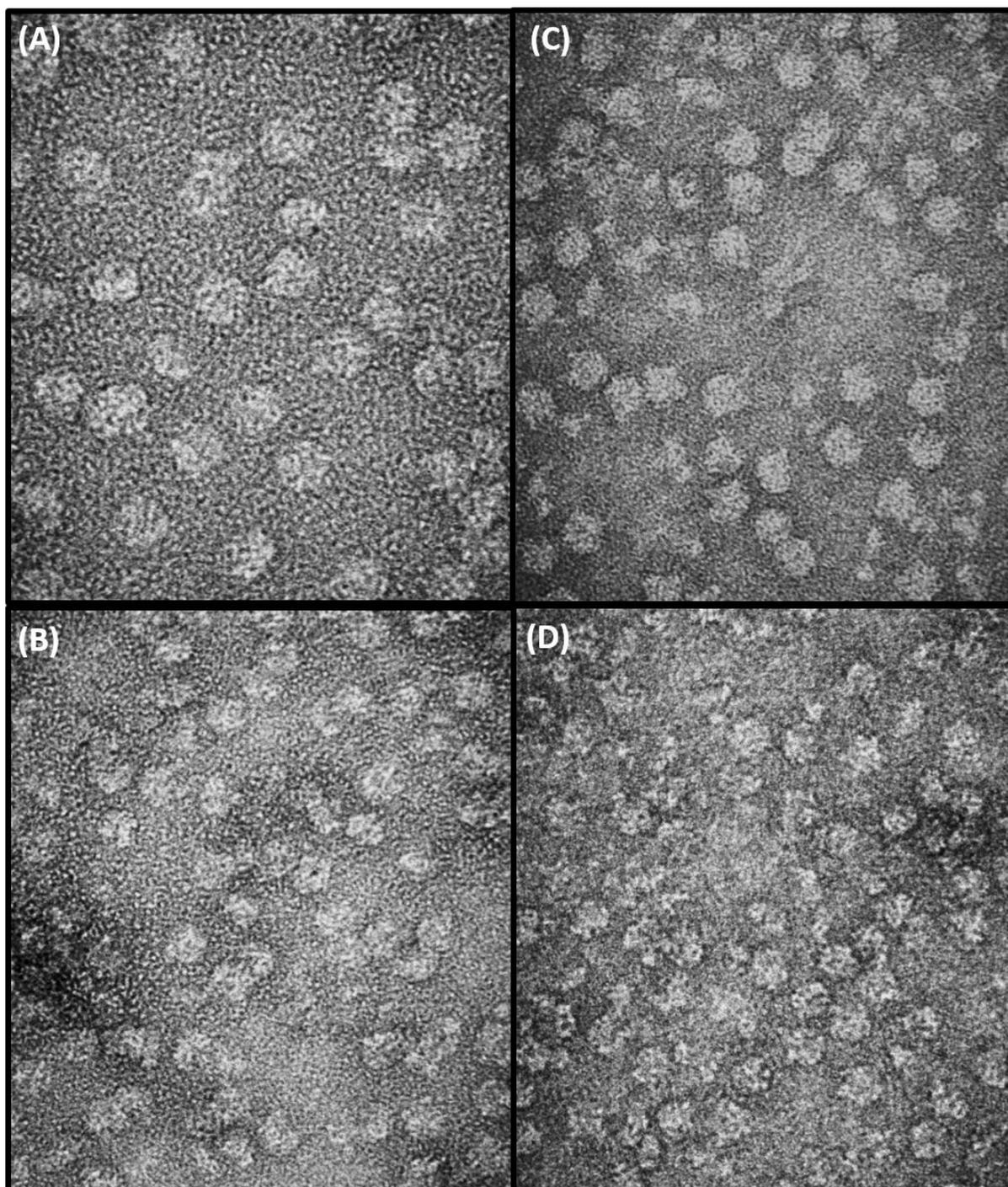


Figura 64 – Visualização dos complexos macromoleculares por TEM. (A) Imagem de ribossomo de *E. coli* corretamente associado, monodisperso e com dimensões esperadas (~ 25 nm). (B) Complexo ribossomo.SelB.GTP. (C) Complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. (D) Complexo ribossomo.SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Todas as imagens foram obtidos em um Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Tecnai G<sup>2</sup>F20 HRTEM *single-tilt* (Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE/DeMa - UFSCar) operando em 200 kV em uma camera TIA 1 Mp (FEI) de alta resolução utilizando 1 segundo de exposição e -5  $\mu$ m de *defocus*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As 12 imagens coletadas foram tratadas utilizando o pacote de programas IMAGIC 4-D<sup>151</sup>, não sendo necessária a correção da função de transferência de contraste (*contrast*

*transfer function*, CTF) devido à baixa resolução observada e alta defocagem utilizada. Encontraram-se aproximadamente 380 partículas isoladas de ribossomo de *E. coli* pré-selecionadas manualmente, das quais 120 foram posteriormente selecionadas como sendo as melhores e mais representativas para dar continuidade ao processamento de dados.

As imagens possuíam um bom contraste dado o tamanho da partícula em análise e o elevado valor de *defocus* utilizado ( $\sim 5\mu\text{m}$ ) como o observado nos exemplos da figura 65-A. As partículas selecionadas foram então utilizadas no processo de atribuição angular, onde cada partícula representa uma projeção com valores de ângulos ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) específicos e que foram vinculados para a obtenção de um modelo tridimensional (Figura 65-B).

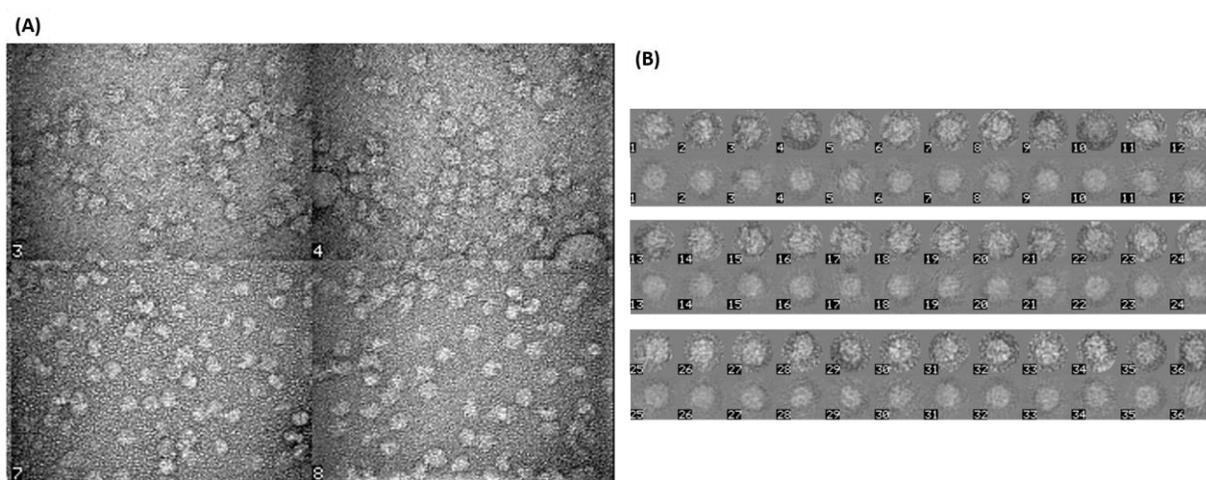


Figura 65 – Processamento de dados do conjunto controle do complexo ribossomal. (A) Imagens de ribossomo de *E. coli*. (B) Partículas selecionadas para a reconstrução tridimensional pelo processamento utilizando o pacote IMAGIC-4D.<sup>151</sup> As linhas superiores de cada bloco de partículas representa a partícula isolada e logo abaixo sua respectiva reprojeção obtida do modelo tridimensional reconstruído. As reprojeções foram utilizadas como referências para a melhoria do alinhamento roto-translacional das partículas e, conseqüentemente, melhoria no modelo tridimensional reconstruído.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após etapas iterativas de seleção de partículas e atribuição angular, um modelo tridimensional à baixa resolução foi obtido ( $\sim 40 \text{ \AA}$ ). A cada passo de processamento, novas reprojeções foram criadas e serviram como referências para novos alinhamentos rotacionais e translacionais das partículas, a fim de melhorar o modelo final, através do processo de alinhamento roto-translacional pelo alinhamento multi referência (*multireference alignment*, MRA). Após este alinhamento, novos ciclos MRA-MSA foram realizados no mesmo conjunto de dados de partículas previamente selecionadas. As reprojeções (linha inferior da figura 65-B) foram usadas como referências até que o modelo convergiu e estabilizou, isto é, imagens e reprojeções são idênticas, como o observado na referida figura. Após 7 passos de

alinhamento, o modelo final foi gerado e ajustado com a estrutura cristalográfica de alta resolução do complexo ribossomal de *E. coli* (PDB.ID 5IT8), evidenciando o ajuste correto da estrutura dentro do mapa de densidade obtido, mesmo que em baixa resolução (Figura 66).

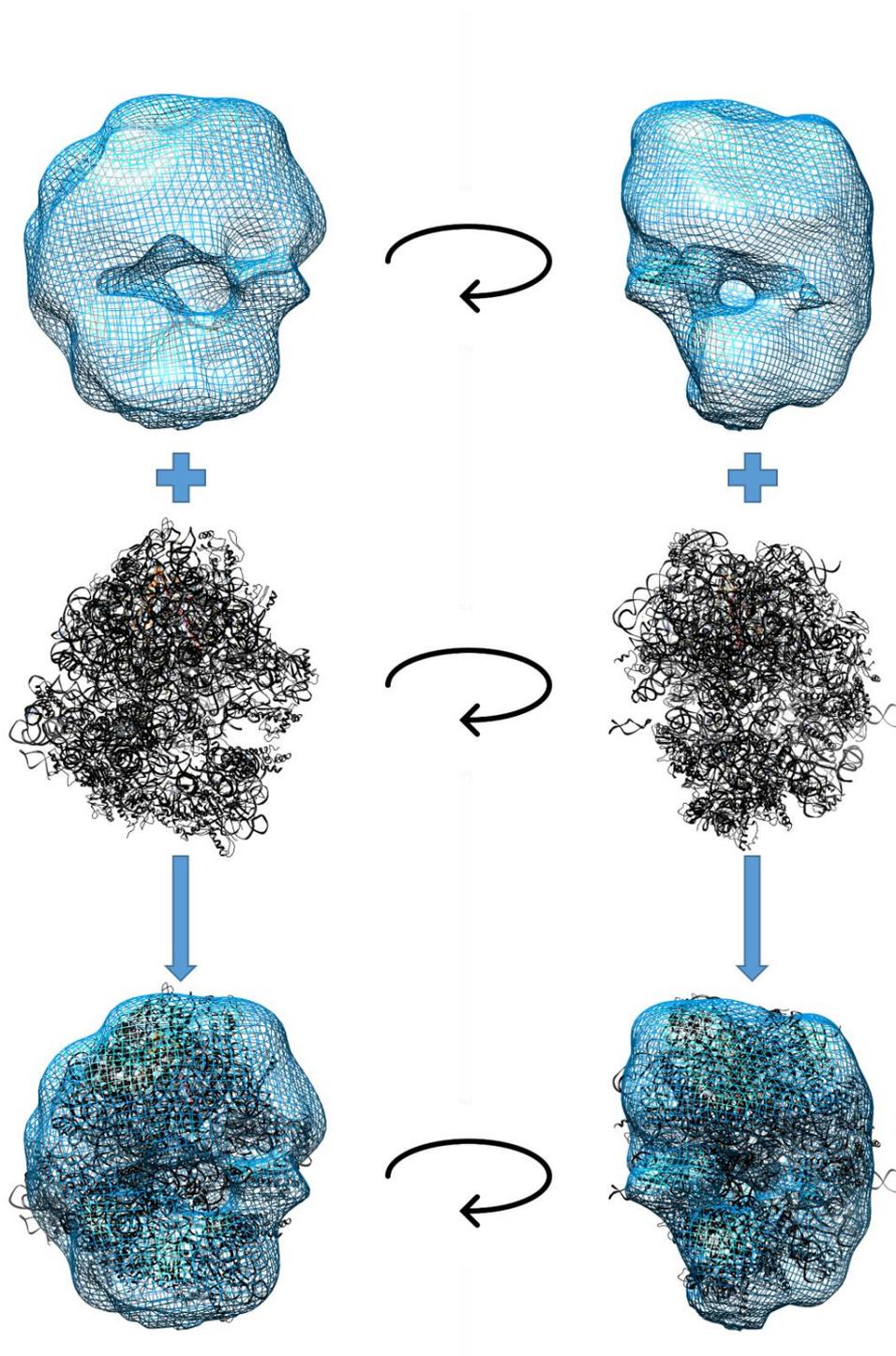


Figura 66 – Reconstrução tridimensional do complexo ribossomal de *E. coli*. Através do processamento de dados e atribuição angular às 120 imagens selecionadas foi possível obter um modelo estrutural, representado em superfície azul, à 40 Å de resolução do ribossomo de *E. coli* que ajustou com a estrutura cristalográfica recentemente melhorada (PDB. ID 5IT8), representada em fitas e hélices em preto.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A baixa resolução obtida,  $\sim 40 \text{ \AA}$ , foi determinada pela equação 10 a seguir. Ela está relacionada com a câmera utilizada, que não é a ideal para esse tipo de análise (TIA 1K,1K camera - FEI). Além disso, as poucas imagens coletadas (12) acarretou em poucas partículas (120). O alto valor de defocagem empregado ( $\sim 5 \mu\text{m}$ ) melhora a visualização das partículas pelo aumento de contraste, mas em contrapartida diminui significativamente a resolução máxima a ser obtida para o conjunto de dados.

$$Cut - off_{Highfrequency}(\text{A}) = \frac{2.3,9 \left( \frac{\text{A}}{\text{pixel}} \right)}{[Resolução(\text{A})]} \quad (10)$$

Um filtro de 0,2 no espaço de frequências (espaço recíproco ou espaço de *Fourier*) para altas frequências (*high frequency*) foi empregado ao longo do processamento. Isso favoreceu a visualização da partícula e determinações de seus contornos, no entanto, limitou a resolução em  $40 \text{ \AA}$ . Todavia, a não utilização desse filtro agressivo não afetaria a resolução da partícula, haja vista os itens mencionados à cima.

Mesmo sendo um modelo à baixa resolução, foi possível mostrar a correta montagem do complexo ribossomal comercial, servindo como controle para os experimentos que envolveram essa macromolécula. Além disso, a proposta inicial de visualização dos complexos na presença de SelB e os RNAs específicos podem ser realizadas através da análise de um mapa de diferença dos complexo com o modelo de ribossomo de *E. coli* apresentado. Isso porque é possível subtrair um mapa de densidade do outro, criando um mapa das densidades resultados, ou seja, o que há de diferente presente no complexo.

Com isso, as coletas de dados do complexo ribossomo.SelB.GTP foram realizadas e o processamento transcorreu de maneira análoga ao descrito anteriormente para o ribossomo (Figura 67). Sabendo previamente que esse complexo macromolecular não hidrolisa GTP (seção 4.6) e por isso deve ser estável para as análises estruturais propostas por TEM.

O processamento nesse conjunto de dados até o momento resultou em 322 partículas isoladas inicialmente selecionadas e esse conjunto de dados foi posteriormente reduzido para 115 das melhores partículas encontradas. O conjunto de dados tem sido constantemente processado, no entanto, apresenta problemas de alinhamento e, conseqüentemente, prejudica a obtenção de um modelo estrutural satisfatório. Por isso, a continuidade desse processamento de dados e melhoria do modelo obtido através da reconstrução tridimensional dessas imagens

de projeção se fazem presentes nas atividades propostas para a continuidade desse projeto no capítulo de perspectivas futuras (Capítulo IV).

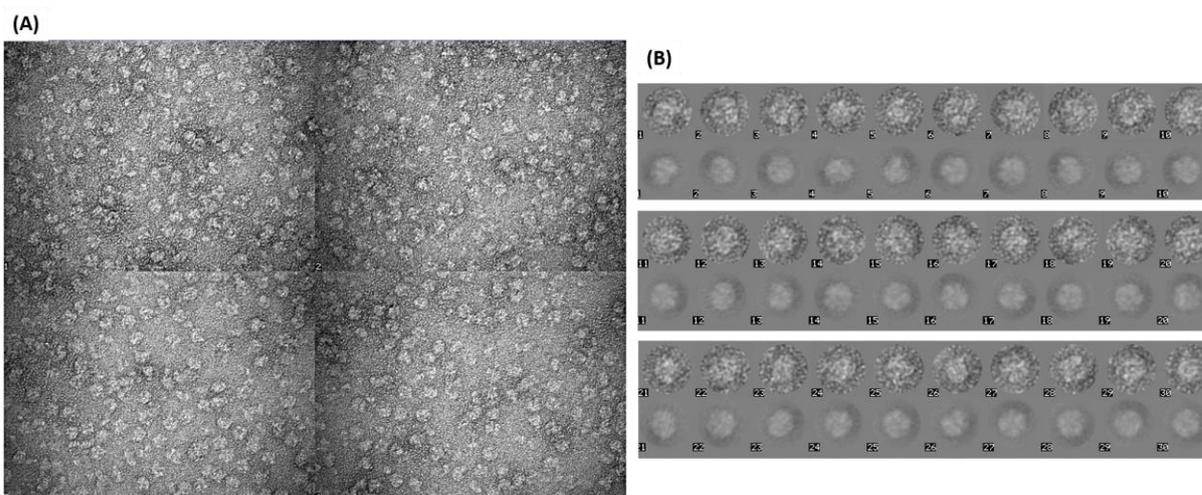


Figura 67 – Processamento de dados do conjunto controle do complexo ribossomo.SelB.GTP. (A) Imagens coletadas do complexo ribossomo.SelB.GTP. (B) Partículas selecionadas para a reconstrução tridimensional pelo processamento utilizando o pacote IMAGIC-4D.<sup>151</sup> As linhas superiores de cada bloco de partículas representa a partícula isolada e logo abaixo sua respectiva reprojeção obtida do modelo tridimensional reconstruído.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Somado a isso, os conjuntos de dados dos complexos macromoleculares ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS foram coletados (Figura 68) e também não foram processados em sua totalidade. Como perspectiva futura, o processamento desses conjuntos de dados será realizado bem como o mapa de diferença entre os complexos analisados, provendo assim os modelos estruturais dos complexos SelB e interações com seus RNAs específicos.

Por fim, esse modelo estrutural poderá ser comparado à estrutura obtida recentemente por crio-microscopia eletrônica de transmissão por análise de partícula isolada, que resultou em uma resolução de 3,6 Å para o complexo bacteriano ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Apesar de já haver a estrutura desse complexo macromolecular, é fundamental para o estabelecimento dessa técnica incipiente no país, além de contribuir com os dados coletados e inicialmente processados antes da publicação desse trabalho realizado no *Max Planck Institute* (Alemanha), centro renomado na técnica em questão.

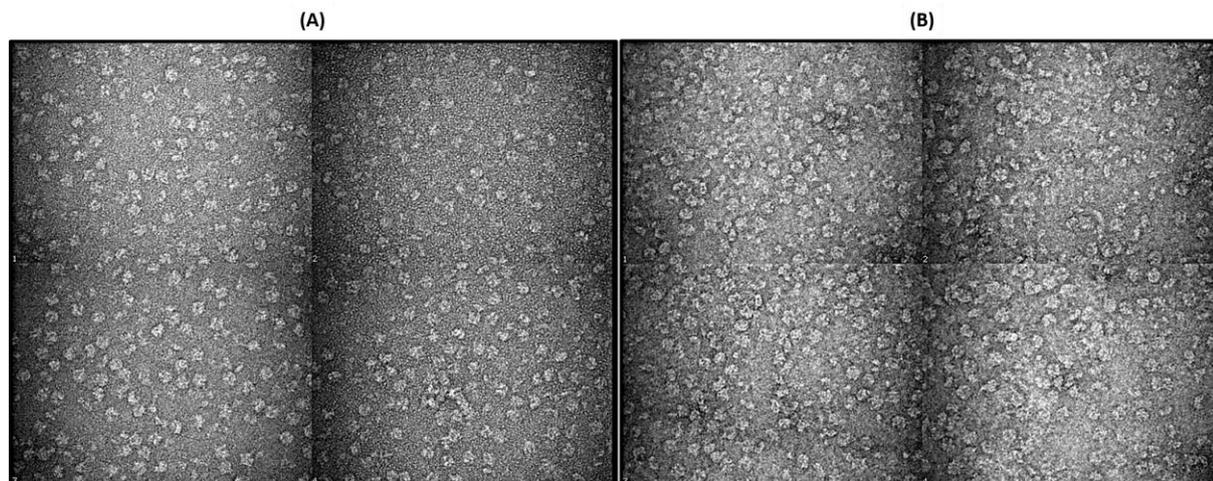


Figura 68 – Visualização dos complexos macromoleculares ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS por TEM. (A) Imagens coletadas do complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Imagens coletadas do complexo ribossomo.SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ademais, o emprego de técnicas de TEM foram utilizadas ao longo do projeto de mestrado no estudo da formação do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> e ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD, resultando em publicações prévias.<sup>60</sup> Em continuidade a esse projeto, estudos empregando preparo da amostra em gelo vítreo foram realizadas tanto na dependência do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano/CNPEN) como no *Netherland Centre of Electron Nanoscopy* (NeCEN – *Universiteit Leiden*, Holanda) durante o período de doutoramento sanduíche nessa instituição.

#### 4.9.3.2 Complexos transientes preparados em gelo vítreo (Cryo-EM): SelA.tRNA<sup>Sec</sup> e SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD

Dando continuidade às perspectivas do projeto de mestrado realizado entre 2011-2013 sob orientação do Prof. Dr. Otavio Thiemann, estudos estruturais dos complexos transientes envolvendo SelA foram realizados utilizando a metodologia de TEM com preparo em gelo vítreo (Cryo-EM) e posterior análise de partícula isolada (*single particle analysis*).

Inicialmente, o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> foi preparado seguindo protocolo estabelecido nos estudos por contraste negativo pelas primeiras amostras preparadas em condições criogênicas.<sup>95-96</sup> As grades foram preparadas em sistema automatizado *Vitrobot Mark IV* (FEI) e a aquisição das imagens foi realizada em um Microscópio Eletrônico de

Transmissão JEOL 2100 LaB<sub>6</sub> (LNNano/CNPEM) operando em 200 kV em uma camera CCD 16 MP (TVips). Diferentemente de imagens coletadas de amostras preparadas com recobrimento por sal metálico, imagens de Cryo-EM possuem uma baixa relação sinal/ruído, o que dificulta a visualização das partículas, mas provê um ganho significativo na resolução do modelo gerado pela reconstrução tridimensional.

Como etapa inicial do processamento de dados, foi necessária a correção da CTF das 600 imagens coletadas. Isso possibilita a determinação do valor preciso do *defocus* utilizado na coleta de cada imagem individualmente bem como a flipagem e modulação dos valores negativos de contraste, tornando-os positivos e, conseqüentemente, positivamente contribuintes para a intensidade eletrônica observada na imagem. A comparação entre a CTF experimental e calculada das primeiras 54 imagens desse conjunto de dados é mostrada na figura 69 abaixo.

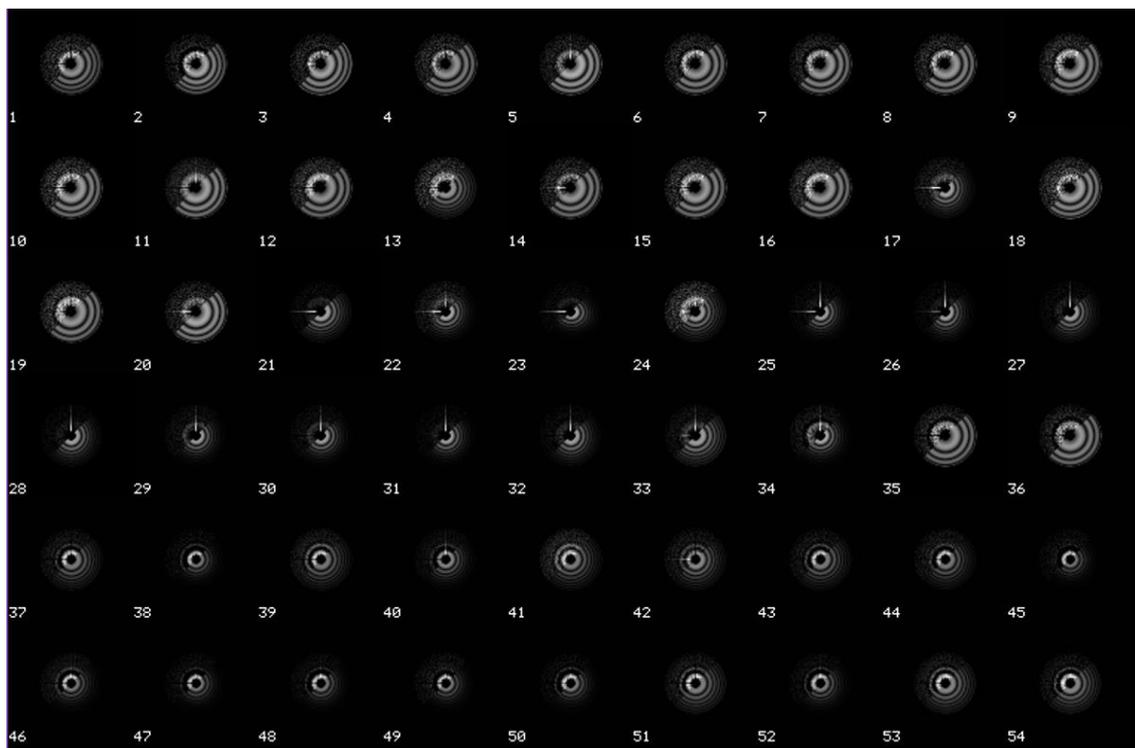


Figura 69 – Determinação da CTF. Função de transferência de contraste (CTF) experimental (diagonal superior esquerda) e calculada (diagonal inferior direita) das primeiras 54 imagens adquiridas desse conjunto de dados. Isso permitiu a identificação dos valores de defocagem para aquelas que possuem um bom ajuste entre ambas as curvas, como, por exemplo, as imagens 2; 6; 35 e 53. Contudo, as imagens que possuem um ajuste incorreto entre ambas as curvas (28; 31 ou 34, por exemplo) foram descartadas do processamento pela indefinição dos valores de *defocus* utilizado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os anéis observados (*Thon rings*) são a projeção bidimensional da função de transferência de contraste e indicam parâmetros importantes para o processamento de dados

como o limite da informação dos dados adquiridos. A análise do ajuste entre curvas experimentais (diagonal superior esquerda) e teóricas (diagonal inferior direita) da CTF permitiram a seleção das imagens cujos valores de defocagem empregados são conhecidos. Somado a isso, a CTF pode indicar (dependendo da fonte produtora de elétrons) qual a resolução máxima do seu conjunto de dados (Figura 27-B).

Após essa etapa, as imagens flipadas foram normalizadas e reduzidas em 4 vezes em seu tamanho (*course factor* 4), o que facilita a velocidade do processamento de dados (Figura 70). As imagens possuem baixa relação sinal/ruído, portanto dificultando o processo de seleção das partículas manualmente (*particle picking*). Por isso que foi realizada a seleção de partículas utilizando uma referência previamente conhecida.

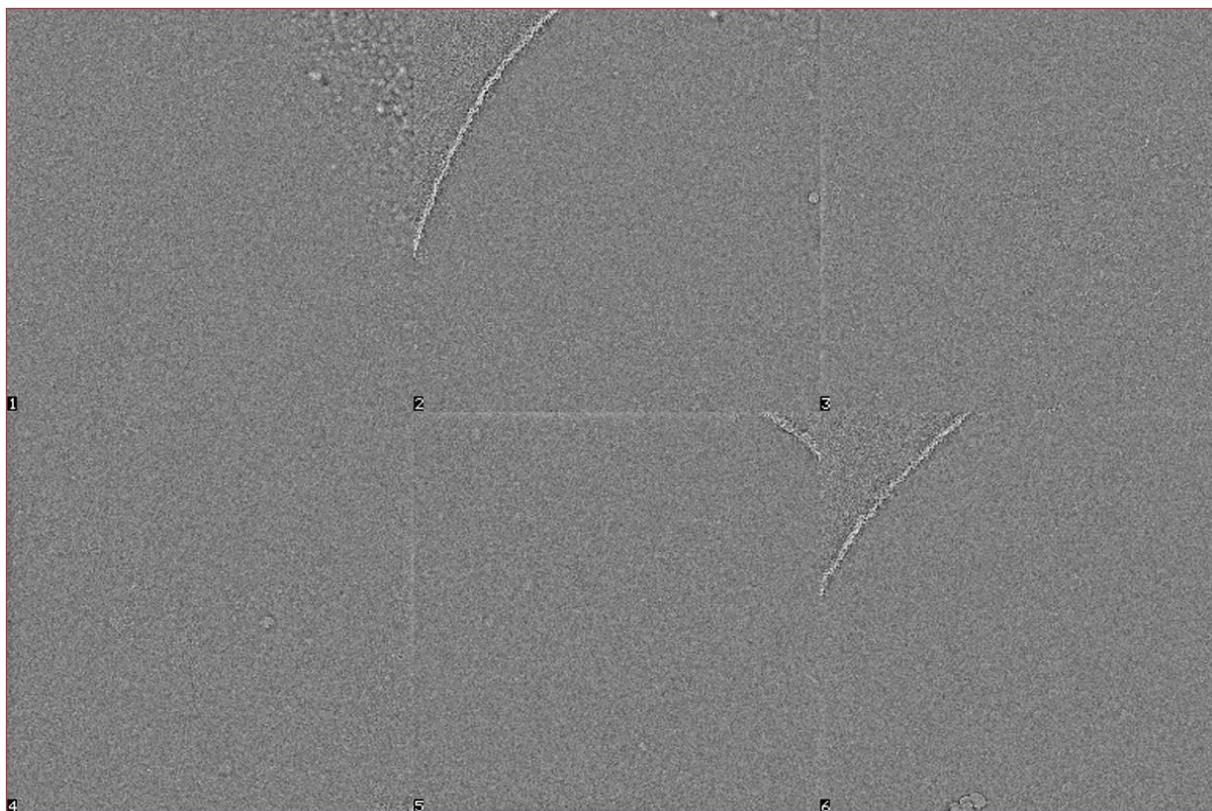


Figura 70 – Visualização das imagens de SelA.tRNA<sup>Sec</sup> em preparo criogênico, evidenciado a baixa relação sinal/ruído, o que torna praticamente impossível a determinação precisa da posição das partículas nas imagens.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Anteriormente, um modelo estrutural de SelA à 15 Å de resolução havia sido obtido pelo processamento de dados de Cryo-EM previamente coletados mas que apresentavam elevada polidispersividade, onde os complexos observados apresentavam estequiometrias diversas, divergindo do resultados biologicamente esperado de 1SelA:10tRNA<sup>Sec</sup> como

mostrado pelas diferentes publicações subsequentes a esse trabalho.<sup>95,100,104</sup> Contudo, foi possível obter um modelo através da reconstrução tridimensional com a simetria (D5, ou seja, um eixo principal de rotação de ordem 5 central perpendicular a eixos de rotação de ordem 2) e forma esperadas (Figura 71). Utilizando-se desse modelo estrutural, foram geradas 48 reprojeções (destacadas na caixa preta da figura abaixo) que serviram como referências para o reconhecimento automatizado das partículas nas imagens coletadas através da função de correlação cruzada (CCF), isto é, a referência percorre a imagem em distâncias determinadas em pixels. Quando a função apresenta valor máximo comparado aos valores de intensidade de cada pixel, é indicativo de que há uma partícula naquelas coordenadas mesmo com a relação sinal/ruído ínfima.

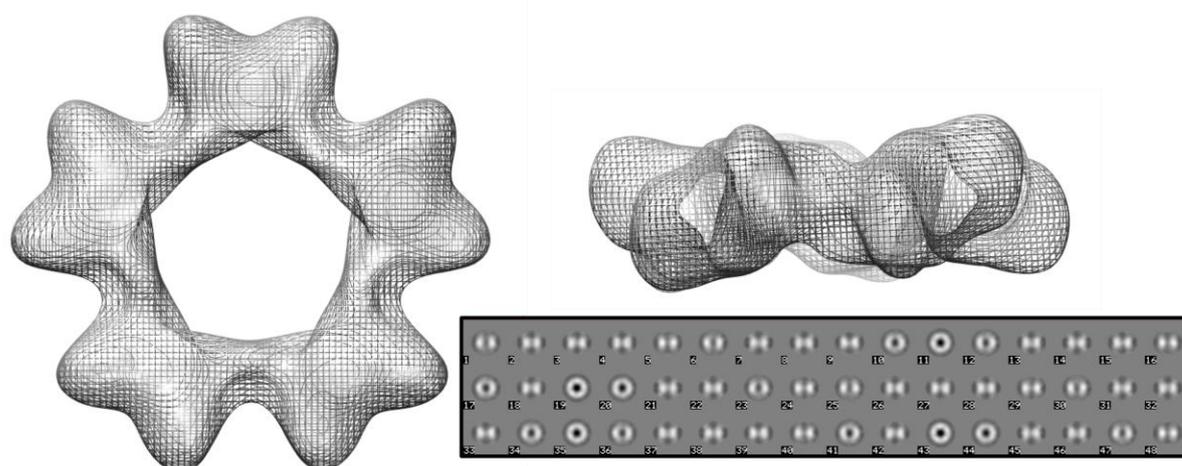


Figura 71 – Modelo estrutural de SelA. Modelo obtido por reconstrução tridimensional de um conjunto de dados heterogêneo resultando em um modelo à 15 Å de resolução com simetria D5. Em destaque na caixa em preto, as 48 referências geradas randomicamente utilizadas para o processo de *particle picking*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> é diferente em forma de SelA, contudo, as informações à baixa resolução são extremamente semelhantes. Isto tornou viável a utilização dessas referências para a identificação das partículas de interesse.

As partículas foram recortadas da imagem principal em caixas de tamanho em pixels conhecidos (128,128) e selecionadas segundo critério de desvio médio dos valores de intensidade/pixel observados ( $\sigma$ ). O corte nas informações de alta resolução favorece a visualização das partículas, pois as altas frequências (ou alta resolução) remetem à informações com nível de detalhamento maior que informações à baixa frequências (ou baixa resolução). Esta baixa resolução favorece a determinação da forma da partícula pelo aumento

da relação sinal/ruído. Nesse momento do processamento de dados, informações de alta resolução não são levadas em consideração, já que é crucial a determinação da forma da partícula como um todo. O detalhamento é realizado em etapa subsequente para conjunto de dados de alta resolução, onde a relação sinal/ruído é baixa e a informação possui maior detalhamento para cada átomo analisado.

As partículas foram filtradas e então mascaradas com um círculo de raio 80% tamanho da caixa e o processamento foi realizado utilizando a metodologia proposto pelo Prof. Dr. Marin van Heel (*Leiden Universiteit*, Holanda). Nela, as partículas são categorizadas e agrupadas através do método baseado na análise de componentes principais (*principal components analysis*, PCA). Este método é denominado análise estatística multivariada (*multivariate statistical analysis*, MSA) e possui a intensão de reduzir conjunto de dados, agrupando as partículas por meio de semelhanças apresentadas dentro do conjunto de dados.

Através do MSA foi possível determinar auto-imagens (*eigenimages*) que representam o conjunto de dados (Figura 72-A), identificando-se os eixos de simetria de ordem 5 (imagens 5 e 6) e ordem 2 (imagens 2 e 3). Isso indica a presença de uma simetria D5 no conjunto de dados, mostrando a presença de estequiometria completa como previsto anteriormente e verificado em publicação recente de nosso grupo de pesquisa.<sup>95</sup> Caso a estequiometria estivesse em razões molares discordantes, não se faria presente tais eixos de simetria observados, uma vez que o tRNA é uma molécula intrinsecamente assimétrica.

As *eigenimages* obtidas foram utilizadas para identificar imagens similares, ou seja, que estejam em orientações similares, e agrupá-las em clusters (classes). Assim, as imagens do conjunto são consideradas como combinação linear de outras imagens pertencentes a esse conjunto. A média dessas classes (*class averages*) denominada *classsums* (Figura 72-B) e foi utilizada para incrementar a relação sinal/ruído, permitindo assim a visualização das partículas.

As 10 *classsums* que apresentaram orientações variadas e melhor relação sinal/ruído foram selecionadas (Figura 72-C) e empregadas na primeira etapa de reconstrução tridimensional a partir de atribuição angular randômica e imposição da simetria conhecida para o sistema (D5). O primeiro modelo estrutural obtido (Figura 73) foi então reprojeto em imagens bidimensionais (Figura 72-D) que serviram como referências para o processo de alinhamento roto-translacional através do alinhamento multi referência (*multireference alignment*, MRA). Após este alinhamento, novos ciclos MRA-MSA foram realizados no mesmo conjunto de dados de partículas previamente selecionadas.

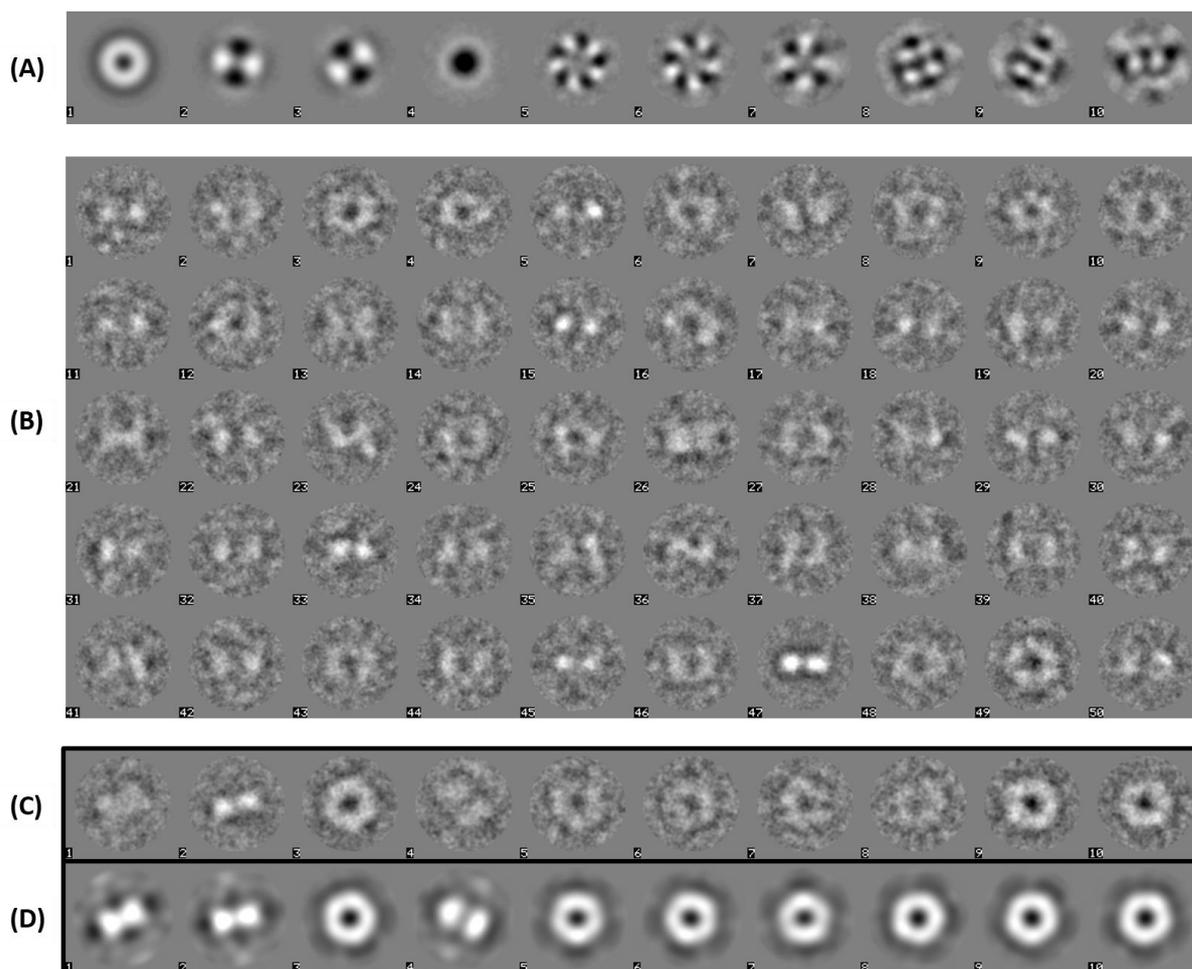


Figura 72 – Análise dos dados por MSA. (A) Auto-imagens (*eigenimages*) obtidas evidenciando a simetria D5 das partículas do complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Algumas *classums* (*class averages*) calculadas utilizando uma média de 20 membros/classe. (C) 10 *classums* selecionadas para os primeiros ciclos de reconstrução tridimensional. (D) Reprojeções do modelo tridimensional obtido após alguns ciclos MRA-MSA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a melhoria no alinhamento das partículas, o modelo tridimensional obtido para o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> (representado em densidade vermelha) cuja resolução está em  $\sim 18 \text{ \AA}$ , pode ser comparado ao modelo 3D de SelA (representado em superfície em amarelo) utilizado como referência para o *particle picking* inicial (Figura 73).

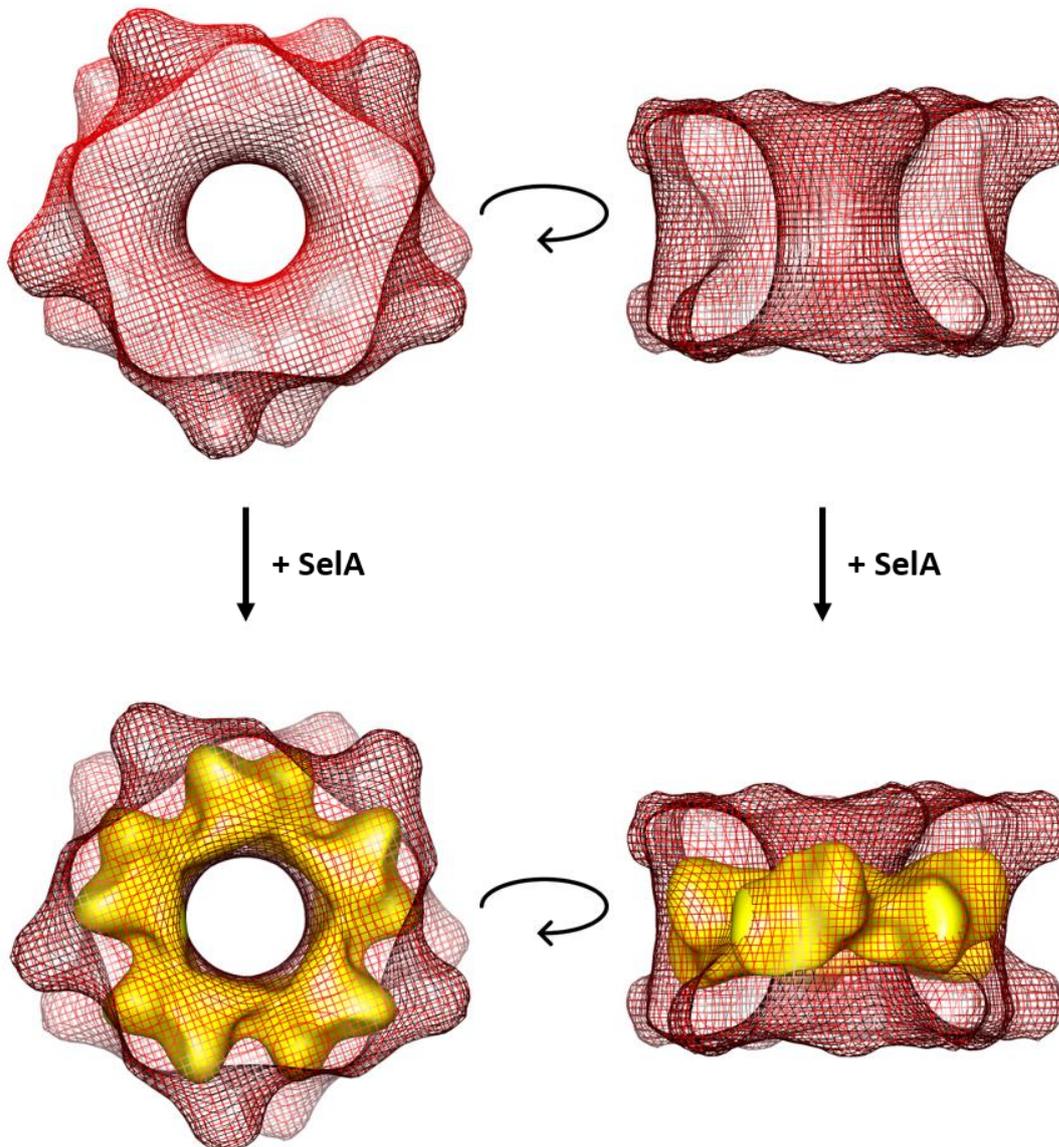


Figura 73 – Reconstrução tridimensional do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*. Através do processamento de dados e atribuição angular foi possível obter um modelo estrutural, representado em densidade vermelha, à 18 Å de resolução e comparada com a estrutura de SelA previamente utilizada para o *particle picking*, representada em superfície amarela.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Evidenciam-se as diferenças nos tamanhos das partículas, principalmente na orientação em vista lateral (à direita da figura em questão). Contudo, a simetria e densidades extras são observadas, sendo indício de reconstrução tridimensional do complexo binário e que o conjunto de dados devêsse ser melhor trabalhado.

Baseando-se nesse modelo estrutural, novas reprojeções foram criadas e o processo foi inteiramente refeito desde o *particle picking*, isso porque a utilização de novas referências

mais parecidas com o esperado retornariam partículas que se parecessem mais com o complexo binário, excluindo assim partículas de SelA com ocupação incompleta que prejudicariam o processamento de dados. Foi possível chegar ao modelo final apresentado na figura 74 após etapas iterativas do processamento de dados com cerca de 5 etapas de classificação por MSA, escolha de *classsums* e novos alinhamentos por MRA, fechando o ciclo MRA-MSA após as reconstruções tridimensionais.

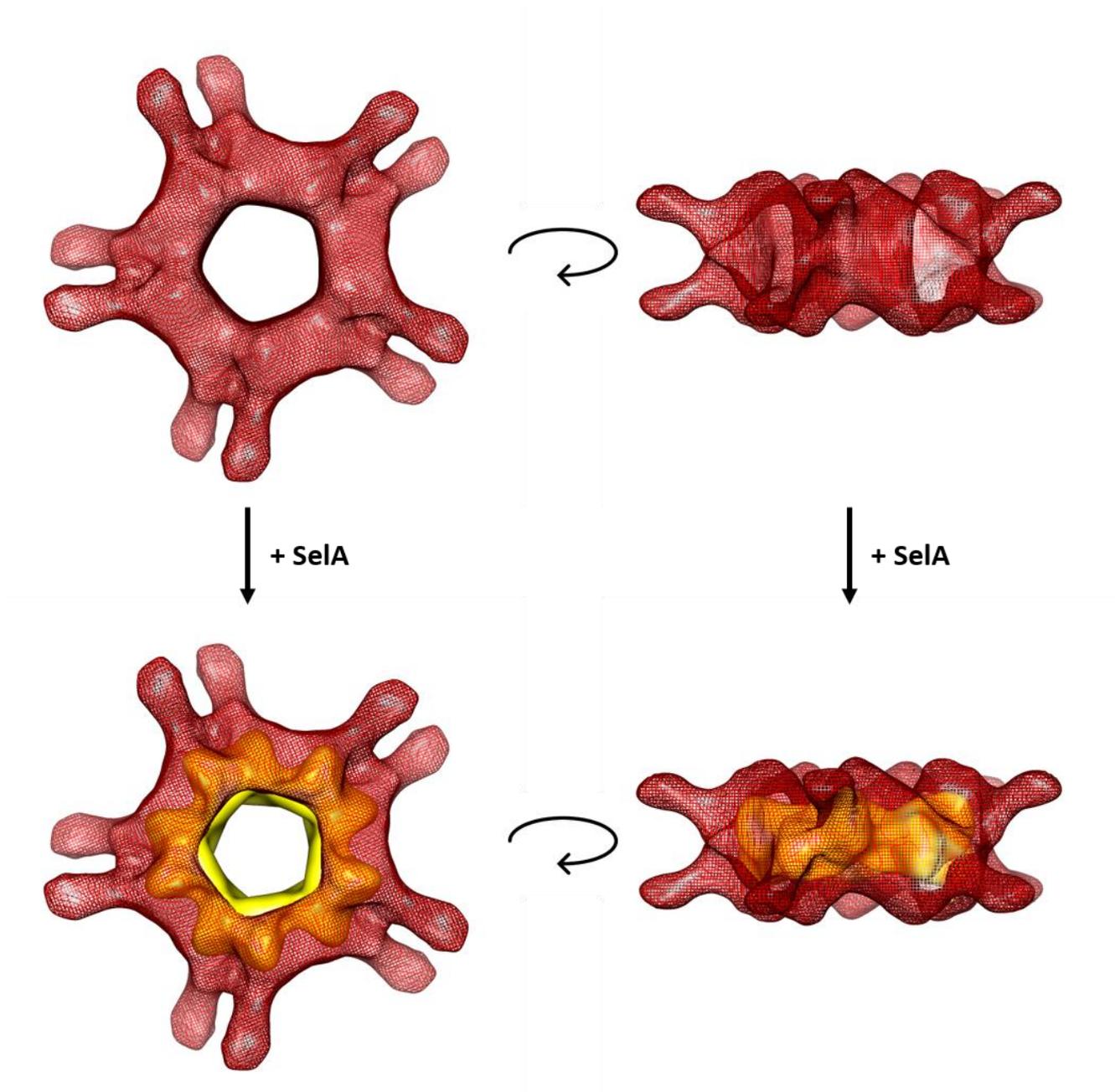


Figura 74 – Reconstrução tridimensional do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli* após etapas de alinhamento. O complexo é representado pela densidade vermelha e SelA é representada em superfície amarela.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar do modelo ainda ser em baixa resolução para a técnica e equipamentos utilizados (cerca de 12 Å pela filtragem utilizada segundo a equação 10), fica evidente a presença de 10 braços pertencentes aos tRNA<sup>Sec</sup> onde o anticódon aponta para fora do mapa de densidade além do sutil aumento das dimensões observadas nas vistas laterais e frontais. Esses resultados concordam com os dados publicados recentemente para as dimensões observáveis do complexo binário montado (Figura 11) e com a estrutura cristalográfica à 7,5 Å de resolução para o mesmo complexo de *A. aeolicus* (Figura 10-F).

A melhoria desse modelo tridimensional está previsto no capítulo de perspectivas futuras desse projeto, com o intuito de evidenciar os possíveis domínios e peptídeos específicos para o reconhecimento do tRNA específico para a incorporação de Sec, bem como confirmar quais as estruturas do tRNA<sup>Sec</sup> são cruciais para esse reconhecimento em *E. coli*. Além disso, fica a motivação de melhoria da resolução desse modelo para valores melhores que os observáveis para a estrutura cristalográfica, ou seja, resolução < 7,5 Å.

A metodologia de Cryo-EM também foi empregada para o estudo da interação do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD. Estudos biofísicos anteriores comprovaram a existência desse complexo ternário transiente responsável pela entrega de monoselenofosfato diretamente ao sítio catalítico de SelA, evitando assim o possível risco de toxicidade celular.<sup>60</sup> Os ensaios por espectroscopia de anisotropia de fluorescência mostraram valor de  $K_D \sim 750$  nM, valor considerado elevado para interações biológicas, porém, satisfatória para complexos transientes e estequiometria de 1SelA<sub>monômero</sub>:1tRNA<sup>Sec</sup>:1SelD<sub>monômero</sub>, ou 1SelA:10tRNA<sup>Sec</sup>:5SelD, uma vez que SelA é um complexo homodecamérico e SelD é um dímero.<sup>60,104</sup>

Com a finalidade de confirmar a condição cujo complexo ternário é mais estável para análises estruturais, experimentos de anisotropia de fluorescência foram conduzidos. Estes se deram de maneira análoga ao apresentado anteriormente para os complexo envolvendo SelB ou mesmo na publicação previamente feita para esse sistema interagente.<sup>60,100,104</sup>

Inicialmente, 490 nM de tRNA<sup>Sec</sup> foram incubados com 10 nM tRNA<sup>Sec\*</sup> e 500 nM de SelA por 25 minutos à 25 °C e excesso de ATP [100 µM] em tampão 20 mM KPB pH 7,5 para posterior titulação de SelD em concentrações crescentes (Figura 75-A). Através do ajuste com o modelo de *Hill*, foi possível determinar o valor da constante de dissociação,  $K_D$ , em (770 ± 70) nM, semelhante o observado anteriormente para o complexo ternário na ausência de ATP.

Analogamente, os experimentos foram conduzidos na presença de Se<sup>2+</sup> [100 µM] (Figura 75-B) e ATP [100 µM] + Se<sup>2+</sup> [100 µM] (Figura 75-C). Interessantemente, os valores

de anisotropia não aumentaram, mas diminuíram até valores de anisotropia total de  $\sim 30$  mA, ou seja, valores anisotrópicos pequenos para o giro de macromoléculas em solução. Além disso, os experimentos em triplicata biológica propiciaram valores de  $K_{DS}$  semelhantes ( $(120 \pm 48)$  nM e  $(135 \pm 21)$  nM) para complexos com  $\text{Se}^{+2}$  e  $\text{Se}^{2+} + \text{ATP}$ , respectivamente).

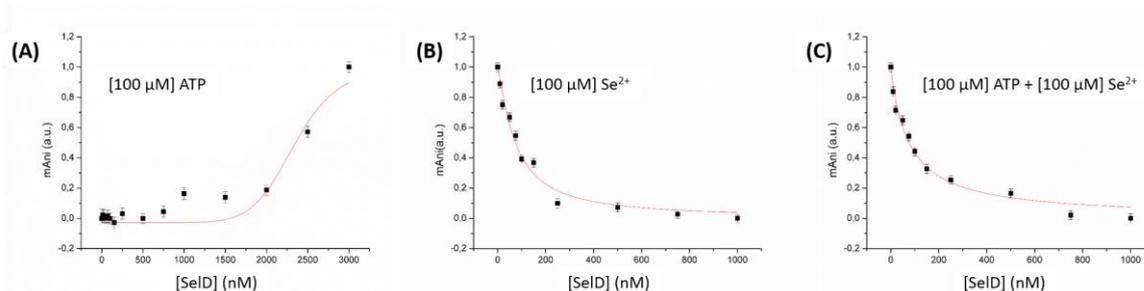


Figura 75 – Medidas de FAS dos complexos de SelA. (A) Curva experimental normalizada da interação de  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  à 500 nM (490 nM + 10 nM marcado com fluoresceína) em complexo com 500 nM de SelA em concentrações saturantes de ATP [100  $\mu\text{M}$ ] e incremento da concentração de SelD utilizando excitação em 492 nm com filtro de 515 nm. (B) Analogamente ao item (A), curva normalizada da interação do complexo binário SelA. $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  em concentrações saturantes de  $\text{Se}^{2+}$  [100  $\mu\text{M}$ ] e incremento da concentração de SelD e (C) concentrações saturantes de ATP [100  $\mu\text{M}$ ] +  $\text{Se}^{2+}$  [100  $\mu\text{M}$ ]. Todos os experimentos realizados em triplicata e normalizados evidenciaram perfil de interação sendo possível utilizar o ajuste dos dados experimentais com a equação de Hill (curva em vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A hipótese para esses resultados é que SelD está biologicamente ativa e utilizando o excesso de fosfato no tampão (KPB) para fazer a entrega da forma biológica de selênio à SelA, que por sua vez o incorpora à extremidade 3'OH do  $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$  através do mesmo mecanismo descrito por Böck em 1991.<sup>56</sup> Esse mecanismo mostra um possível ataque nucleofílico do grupo selenol a ligação formada entre o PLP-K295 e a hidroxila do resíduo de Ser. No entanto, nesse caso não há o resíduo de aminoácido em questão, tornado o mecanismo ineficiente. Estudos futuros da conversão Ser-Sec são propostos para a continuidade desse projeto para a compreensão desse sistema *in vitro*, bem como comprovação experimental dessa hipótese e justificativa do decaimento dos valores de anisotropia para essas interações.

Contudo, para fins de preparo das grades em gelo vítreo foi possível observar que a estabilidade do complexo ternário na presença de  $\text{Se}^{2+}$  ou  $(\text{ATP} + \text{Se}^{2+})$  inviabiliza as análises, uma vez que o complexo exerce sua função catalítica e possivelmente não permanece montado. Sendo assim, as análises estruturais do complexo ternário SelA. $\text{tRNA}^{\text{Sec}}$ .SelD por Cryo-EM foram realizadas de acordo com o preparo do complexo previamente descrito.<sup>96</sup>

Os complexos previamente preparados foram levados até o LNNano/CNPEM para a preparação das grades pelo Dr. Alexandre Cassago e com a supervisão do Dr. Rodrigo Villares

Portugal e posterior envio para o *Netherland Centre of Electron Nanoscopy (Universiteit Leiden - NeCEN-LU, Holanda)* no qual o projeto teve a orientação do Prof. Dr. Marin van Heel juntamente com o Dr. Pavel Afanasyev.

#### 4.9.3.2.1 Correções da câmera de detecção direta

A correção de câmera foi realizada utilizando os critérios de *average density* (541, 618) e *sigma* (65,3; 68,7), representados nas figuras 76-A e 76-B, respectivamente. Esta foi realizada de acordo com a normalização utilizada para a câmera *Falcon-2*.<sup>152</sup>

A etapa de correção *a posteriori* da câmera evidencia imperfeições presentes nas imagens quando observadas as imagens da soma total do conjunto de dados indicadas pelos círculos em vermelho (Figura 76-C e D). Esses defeitos nas imagens além de prejudicar o processamento de dados, interferem diretamente na resolução do conjunto de dados a ser analisado.

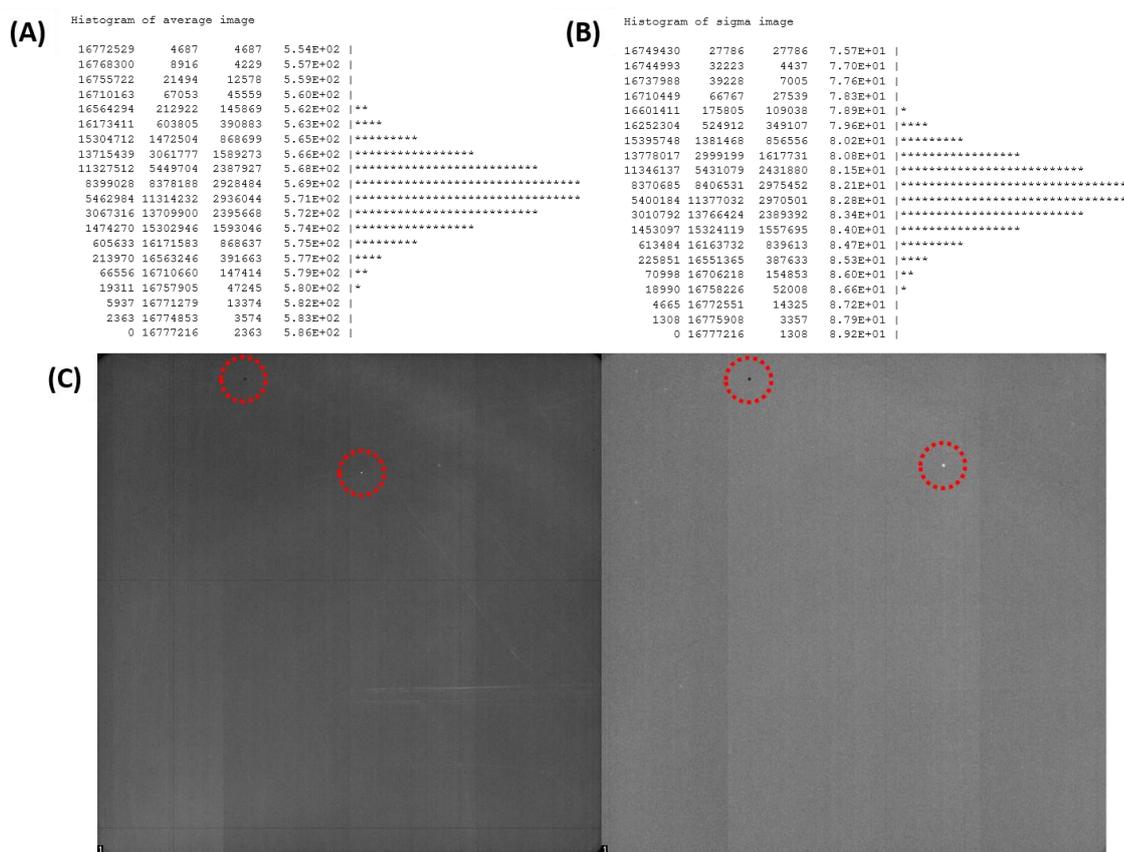


Figura 76 – Correção da câmera *a posteriori*. Utilizando normalização através dos valores da média de densidade (A) e de *sigma* (B), foi possível corrigir as imperfeições da câmera. (C) A soma total da média de densidade mostra pontos que são decorrentes de pixels danificados com o passar do tempo. (D) A soma total de *sigma* das imagens revela algumas faixas com variação nos valores esperados. Em vermelho, os destaques para defeitos encontrados nas imagens.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez corrigidas as imperfeições da câmera, os *frames* pertencentes a cada *movie* foram alinhados. Pois durante a aquisição de dados os *frames* possuem deslocamentos que interferem diretamente na resolução do conjunto de dados. Os 5138 *frames* foram alinhados em 734 *movies* e equivalem a 7 *frames/movie* agrupados.

Para o alinhamento, inicialmente os *frames* foram corseados por um fator 4, resultando em *frames* de 1024,1024 pixels. Isto favorece o contraste nos *frames* e diminui o custo computacional pela redução do número de pixels, facilitando o tratamento das imagens.

Os *frames* filtrados utilizando valores de filtro passa-banda de (0,01, 10000) foram alinhados por deslocamento translacional utilizando referências criadas pela soma total das imagens e pela função de correlação cruzada (CCF) adotando um deslocamento máximo, em pixels, de 15. O alinhamento dos *frames* é uma etapa fundamental no processamento de dados, apesar de não ser evidente ao se observar o espaço real, ou seja, nas imagens coletadas (Figura 77). No entanto, observam-se diferenças no espaço recíproco das imagens alinhadas e não alinhadas (Figura 78).

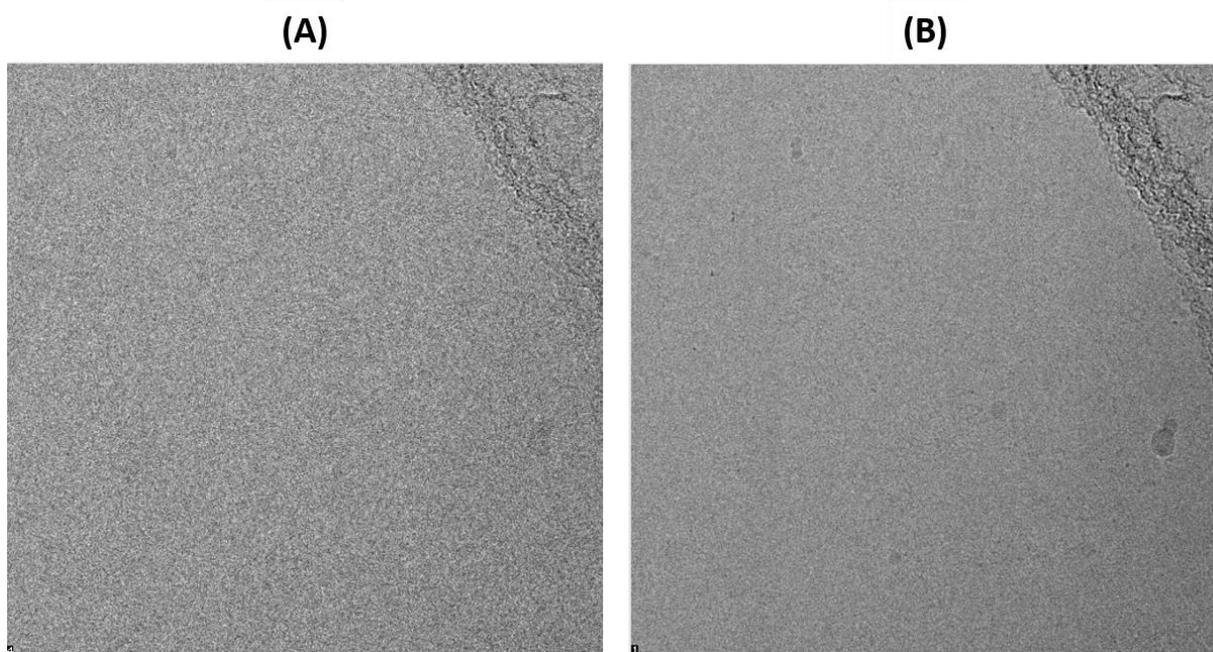


Figura 77 – Resultado do alinhamento dos *frames* no espaço real. (A) Imagem (*movies*, ou seja, somatória dos 7 *frames*) não alinhada. (B) Imagem da mesma área de exposição, no entanto, após o alinhamento dos *frames*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O ganho de detalhamento nas imagens, bem como a melhoria da relação sinal/ruído, ficam evidentes, porém, sem uma quantificação detalhada para isso. Analisando os dados no espaço recíproco (ou espaço de *Fourier*), após a determinação da CTF, foi possível identificar

que aproximadamente 55% (401/734) dos *movies* analisados possuem um ajuste satisfatório entre as curvas teórico e experimental da função de transferência de contraste (Figura 78).

A determinação do alinhamento dos *frames* permitiu inferir a resolução do conjunto de dados coletado em  $\sim 2,048 \text{ \AA}$  (2 x tamanho do pixel) para as imagens cujos *frames* foram ajustados e esses 401 *movies* foram flipados (análogo ao descrito na seção anterior) para dar início ao processo de identificação das partículas.

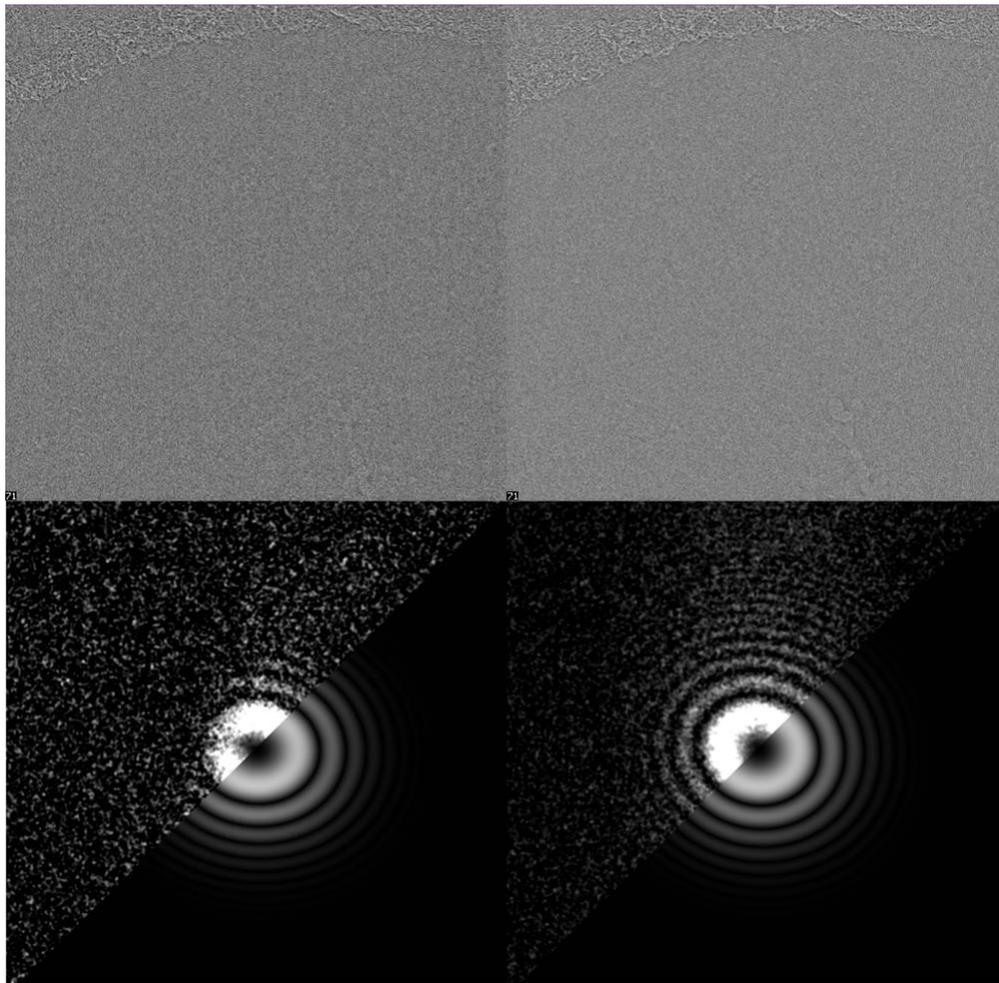


Figura 78 – Comparativo de bons e maus ajustes da CTF. Acima, as imagens que geraram as CTFs apresentadas, abaixo, antes (à esquerda) e após (à direita) ao alinhamento dos *frames* e ajuste das curvas de CTF. É possível observar o alinhamento no espaço recíproco (abaixo), ficando evidente que o alinhamento dos *frames* (direita) incrementa a resolução do conjunto de dados, fato esse observado pelo grande número de *Thon Rings* e melhor ajuste com o CTF teórico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.9.3.2.2 *Particle picking*, processamento dos dados e primeiro modelo estrutural

Uma vez corrigida a CTF e as imagens flipadas, deu-se início ao *particle picking*

automatizado utilizando as referências manualmente selecionadas (Figura 79). As imagens filtradas para eliminar interferências de altas frequências (0,3) permitiram a identificação de 8 partículas em diferentes orientações que foram usadas como as referências para o processo automatizado. Este foi realizado após a filtragem e após o mascaramento das referências com parâmetro 85% do tamanho da caixa selecionada para recortar cada partícula.

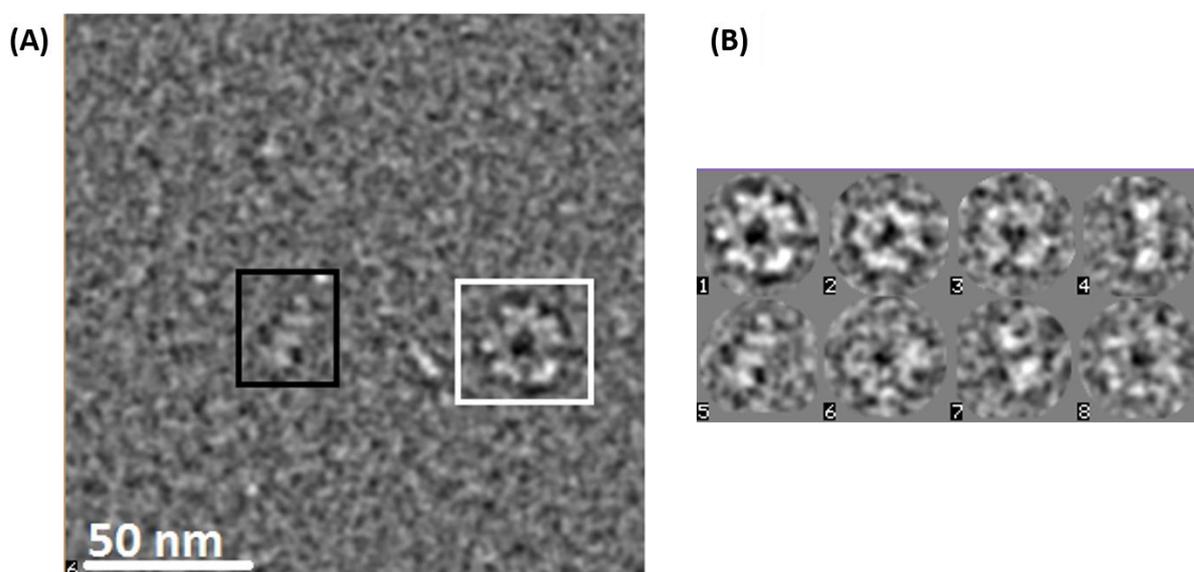


Figura 79 – Seleção das referências para o primeiro *particle picking* automatizado. (A) Exemplo de *movie* com alto contraste utilizado na primeira parte do processamento de dados. A caixa branca indica uma partícula em orientação “*top-view*” e a caixa preta indica uma partícula em orientação “*side-view*”. (B) 8 referências utilizadas para o *particle picking* através de CCF. Por fim, o histograma dos valores de *defocus*, mostrando que existem duas populações de *defocus* bem destacadas, em torno de 1,5  $\mu\text{m}$  (346 imagens) e 3,5  $\mu\text{m}$  (55 imagens).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através da CCF foi possível identificar ~200 mil partículas que foram recortadas das imagens em caixas (192,192) e selecionadas pelo critério de desvio médio dos valores de intensidade/pixel observados ( $\sigma$ ), resultando em 165 mil partículas. Essas, por sua vez, foram filtradas para corte de altas frequências (0,4) e posteriormente mascaradas com um círculo de raio 80% do tamanho da caixa.

Através da categorização utilizando MSA, as auto-imagens foram determinadas (Figura 80-A), indicando a simetria D5. Este dado corroborou com a razão estequiometria molar previamente determinada para esse complexo ternário de 1Se1A:10tRNA<sup>sec</sup>:5Se1D,<sup>60</sup> única maneira desse grupo pontual de simetria ser conservado.

Novamente, as *eigenimages* foram utilizadas para identificar imagens similares e agrupá-las em classes. A média dessas classes, mostradas na figura 80-B, foram utilizadas

para incrementar a relação sinal/ruído, permitindo assim a visualização das partículas. Fica evidente que o conjunto de dados é heterogêneo, uma vez que foi possível identificar vistas que são características de SelA e SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, não apresentando a montagem completa do complexo ternário. O processamento de dados heterogêneos depende de processos iterativos de limpeza e reprocessamento a fim de retirar as partículas que não fazem parte do conjunto de dados de interesse.

25 *classsums* foram selecionadas (Figura 80-C) e empregadas na primeira etapa de reconstrução tridimensional a partir de atribuição angular randômica e imposição da simetria conhecida para o sistema (D5).

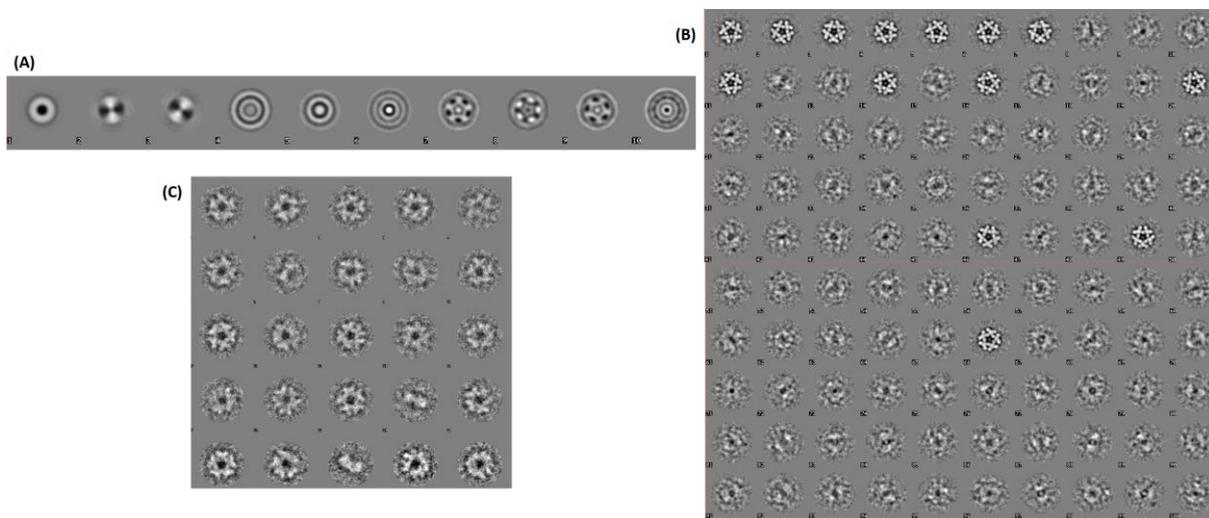


Figura 80 – Análise dos dados por MSA do complexo ternário. (A) Auto-imagens (*eigenimages*) obtidas evidenciando a simetria D5 das partículas do complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD. (B) Algumas *classsums* (*class averages*) calculadas utilizando uma média de 50 membros/classe. (C) 25 *classsums* selecionadas para os primeiros ciclos de reconstrução tridimensional.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

O primeiro modelo estrutural obtido por imposição da simetria D5 e utilizando atribuições randômicas aos valores angulares foi posteriormente reprojetoado em imagens bidimensionais que serviram como referências um novo *particle picking*. Dessa vez, eliminando os possíveis contaminantes de complexo com ocupação incompleta. Após as etapas de identificação e recorte das partículas, as mesmas foram filtradas e mascaradas para nova análise classificatória.

Após 5 ciclos de classificação e reconstrução tridimensional iterativos variando as seleções das *classsums* e reprojeções do modelo 3D, obteve-se um modelo cujas diferenças entre essas imagens não se alteraram (Figura 81). O modelo estrutural do complexo ternário, destacado em densidade azul, pode ser comparado com os modelos de SelA (superfície

amarela) e do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> (densidade vermelha) previamente obtidas.

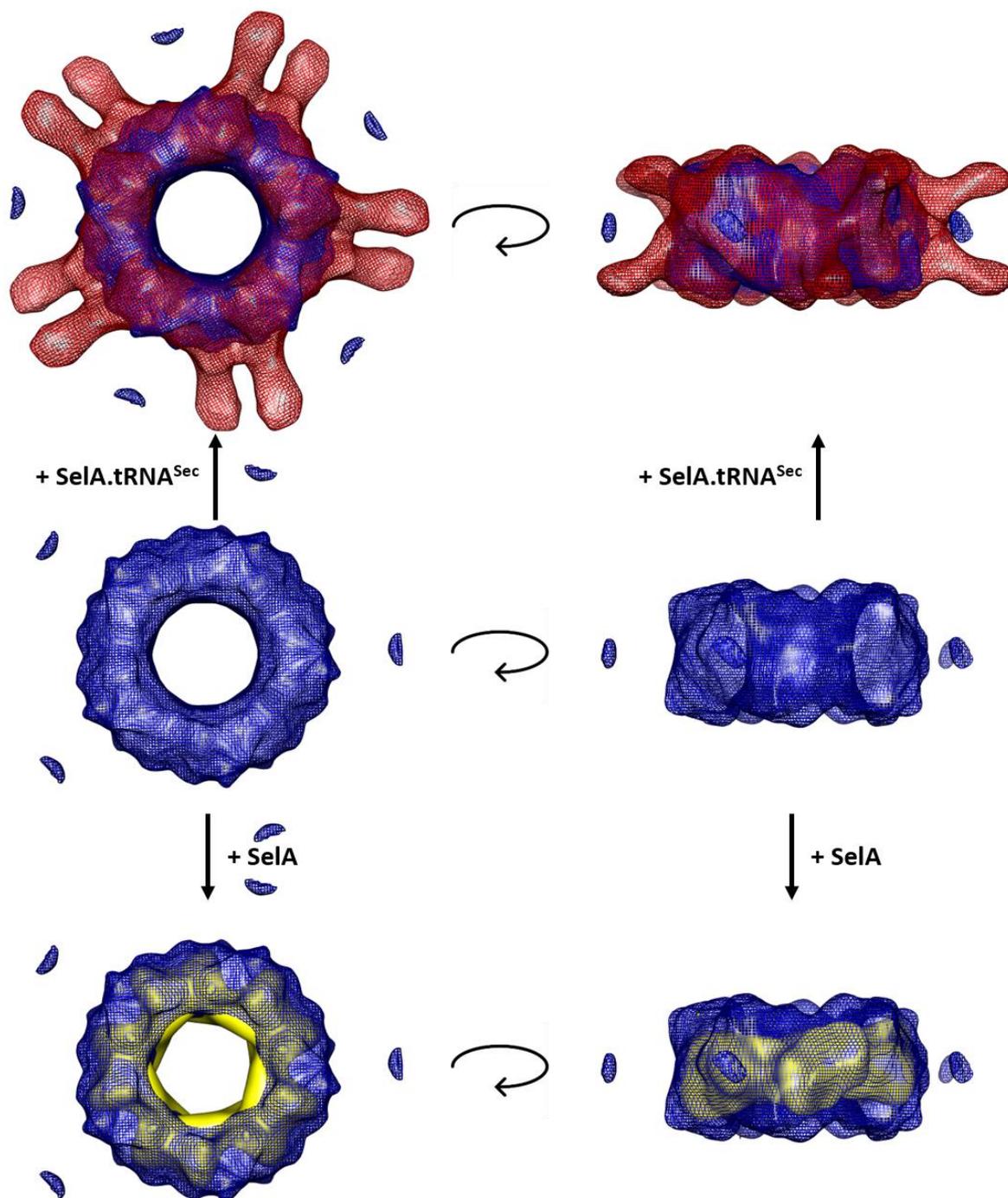


Figura 81 – Reconstrução tridimensional do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD de *E. coli* após etapas de limpeza do conjunto de dados. O complexo é representado pela densidade azul, SelA é representada em superfície amarela e o complexo binário em densidade vermelha.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ficam evidentes as diferenças nos tamanhos das partículas, principalmente na orientação em vista lateral (à direita da figura 83). Contudo, a simetria e densidades extras são

observadas. As reprojeções desse modelo estrutural foram utilizadas para um novo ciclo de *particle picking* e o processo iterativo foi iniciado, procedendo-se de maneira como já descrita.

#### 4.9.3.2.3 Processo iterativo de melhoria dos modelos estruturais

O processamento iterativo foi empregado seguindo metodologia proposta recentemente pelo Dr. Pavel Afanasyev,<sup>152</sup> resultando no modelo mostrado abaixo (Figura 82).

Nessa abordagem, as reprojeções do modelo tridimensional foram projetadas não randômicamente, como a metodologia classicamente utilizada, mas nas orientações das *classums* que geraram aquela projeção. Deste modo, os valores dos ângulos ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) foram atribuídos às *classums* e por sua vez às partículas constituintes a essas classes. Com isso, as partículas passaram a ter valores angulares atrelados a cada uma delas individualmente e não às classes. Assim, cada partícula passa a contribuir para a reconstrução tridimensional com alinhamentos com maior acurácia e precisão nos valores.

Comparando os modelos estruturais, fica evidente a presença de densidades extras na porção central na partícula, o que sugere a presença de SeID nessas posições. Além disso, os tamanhos relativos entre os complexos, comparando com o binário e somente com SeLA, ainda possibilitam identificar os braços que representam o anticódon do tRNA<sup>Sec</sup>, mesmo observando o aumento da partícula em comparativo com esses complexos. O complexo ternário apresenta cinco densidades extras para cima e cinco para baixo que indicam o posicionamento dos braços anticódons dos tRNAs<sup>Sec</sup>, porém, ainda precisando ser aprimorados.

A densidade extra presente na parte central da partícula do complexo ternário, apesar de pequena, indica a presença de SeID e, por simetriação, faz-se presente no modelo estrutural obtido à 12 Å de resolução. A necessidade de otimização do alinhamento das partículas e determinação de possíveis ocupações incompletas que estejam interferindo no processamento desse conjunto de dados são previstas como perspectivas futuras na continuidade desse projeto.

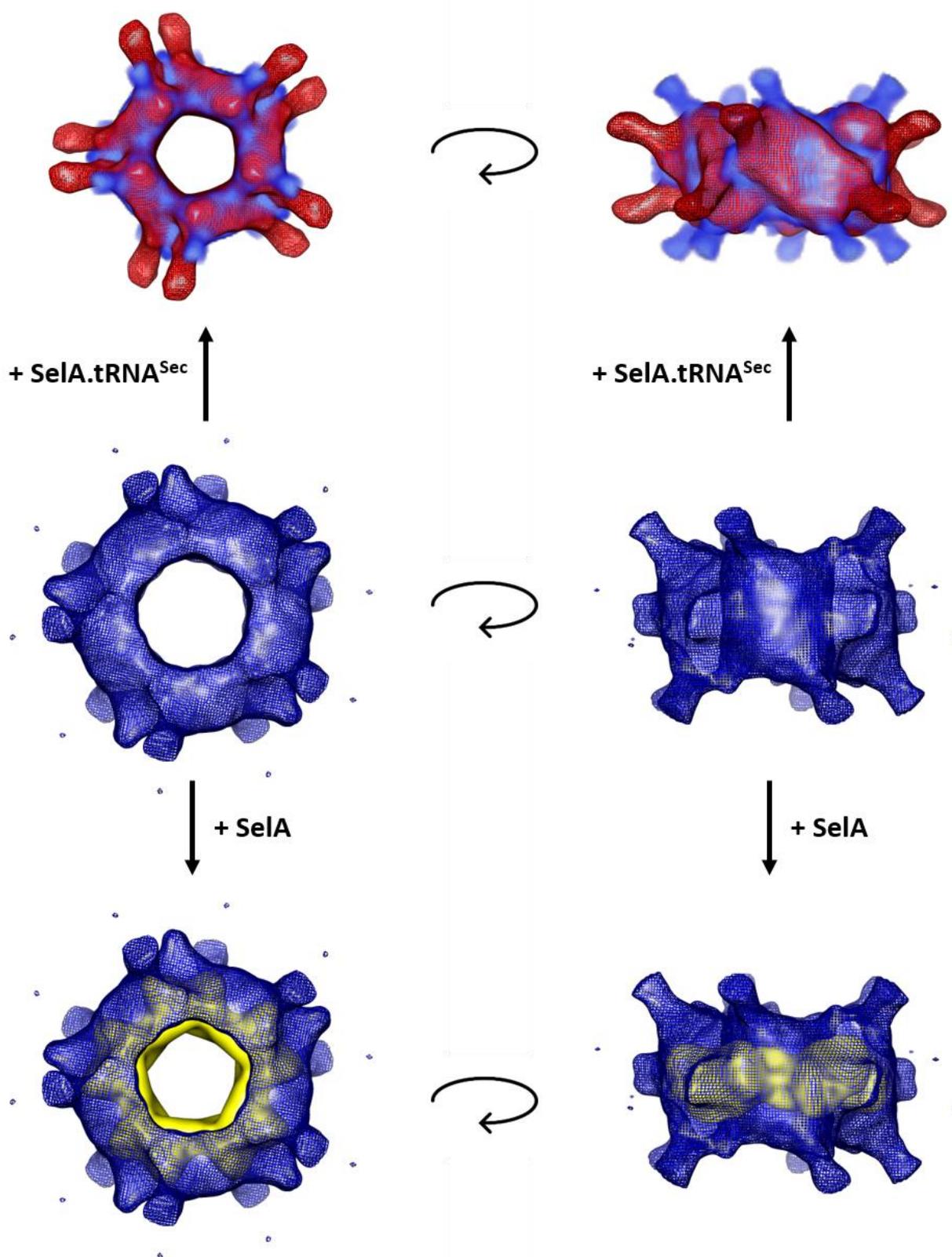


Figura 82 – Reconstrução tridimensional do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD de *E. coli* após etapas de alinhamentos das partículas. O complexo é representado pela densidade azul, SelA é representada em superfície amarela e o complexo binário em densidade vermelha.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Novas etapas de alinhamento mesclando ambas as metodologias (MRA e *move by aligned classsums*) estão sendo realizadas para a finalização desse projeto, bem como o aumento da resolução desse modelo pela diminuição do valor agressivo dos parâmetros de filtragem utilizados. Contudo, o modelo atual apresenta um desafio para o processamento dado o tamanho do conjunto de dados não ser o ideal para alta resolução (poucas imagens coletadas), a heterogeneidade do conjunto de dados (presença de partículas de SelA, SelA.tRNA<sup>Sec</sup> e ocupação incompleta de SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD) e a presença de glicerol no tampão, prejudicando o contraste entre as partículas e o gelo vítreo.

A otimização desse modelo tridimensional é prevista no capítulo de perspectivas futuras desse projeto, com o intuito de evidenciar os possíveis domínios e peptídeos específicos para a formação desse complexo da via de biossíntese de Sec em *E. coli*, sendo a primeira estrutura de um complexo ternário dessa via bioquímica.

#### **4.10 Análises das interações *in vivo***

Por fim, alguns experimentos *in vivo* foram propostos anteriormente na continuidade desse projeto. Dentre eles está a validação e análise da importância do domínio N-terminal de SelA, único em bactérias, e das interações das proteínas constituintes da via de biossíntese de Sec por meio da técnica de Duplo-Híbrido dirigida.

##### **4.10.1 Construção de truncamentos de *selA* – amplificação e clonagem. Ensaio de complementação funcional e estado oligomérico**

Em 2013, quando esse projeto foi iniciado, a importância do domínio N-terminal de SelA era proposto, principalmente pelo fato desse domínio ser único em bactérias. Em organismos superiores, o gene *selA* foi silenciado paulatinamente com a exclusão da região codificante para o domínio N-terminal em arqueias e, posteriormente, o gene completo nos demais organismos.<sup>99,104</sup>

Para analisar a importância desse domínio, uma construção truncada foi preparada através da utilização de oligonucleotídeos que truncaram esse domínio (Figura 83, destacados em vermelho) gerando uma construção denominada  $\Delta 1-28$  *selA*.

Após a amplificação (Figura 83-B), a construção foi clonada no vetor comercial pET29a(+) e posteriormente transformada nas cepas de expressão (*E. coli* WL81460) e de complementação funcional (*E. coli* JS1).



Figura 83 – Construção do truncamento  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli*. (A) Modelo esquemático do truncamento no domínio N-terminal da enzima SelA de *Escherichia coli*. Os oligonucleotídeos estão representados em vermelho. (B) Resultado da amplificação do gene  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli* em gel de agarose 1% 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) gene  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli* (1492 pb),  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

A construção  $\Delta 1-28$  *selA*-pET29a(+) transformada na cepa *E. coli* WL81460 foi expressa e purificada segundo os protocolos previamente estabelecidos (seção 4.2.1). Os resultados das etapas de purificação foram monitorados por SDS-PAGE 15% (Figura 84-A) e a conformação oligomérica em solução foi confirmada por eletroforese nativa em gel de poliacrilamida do sistema comercial PhastSystem (GE) 8-25% (Figura 84-B). O gel nativo evidenciou a conformação decaamérica dessa construção, com massa molecular de ~600 kDa como o esperado e observado para a amostra nativa. A amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex* 200 16/600 (GE), porém o cromatograma foi idêntico ao observado para a purificação de SelA de *E. coli* (Figura 32-B).

Posteriormente, as construções *selA*-pET29a(+) (controle positivo), pET29a(+) fechado (controle negativo) e o truncamento  $\Delta 1-28$  *selA*-pET29a(+) foram transformadas em cepa *E. coli* JS1 para ensaios de complementação funcional *in vivo*. Após esta etapa, seguiu-se com o protocolo estabelecido em nosso grupo de pesquisa para a ativação da selenoenzima formato desidrogenase (FDH H), através da adição de 1 mM de benzil-viologênio em Soft-LB ágar e plaqueado sobre as colônias à 28 °C sob estresse anaeróbico.

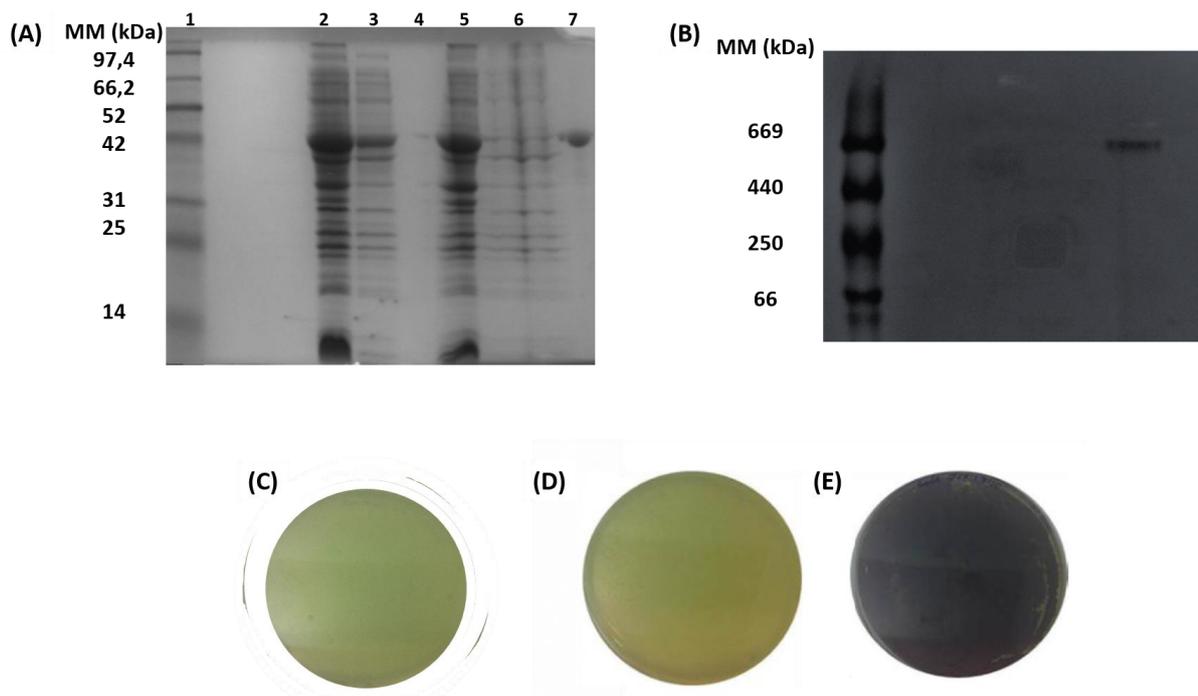


Figura 84 – Resultados da conformação oligomérica e atividade da construção  $\Delta 1-28$  *selA* de *E. coli*. (A) SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna *HiTrap Desalting*; 4) sobrenadante da amostra precipitada com sulfato de amônio; 5) amostra com Nycodenz® concentrada a 2 mL; 6) amostra eluída do concentrador de corte de 100 kDa; 7) amostra eluída concentrada após a cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 16/600*. (B) Eletroforese nativa em gel 8-25: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra purificada após a cromatografia de exclusão molecular. (C) Controle negativo to teste do benzil-viologênio com a cepa *E. coli* JS1 transformada com pET29(+) fechado. (D) Ensaio de complementação funcional de  $\Delta 1-28$  *selA*-pET29(+). (E) Controle positivo com a cepa *E. coli* JS1 transformada com *selA*-pET29a(+).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esse ensaio de atividade da FDH produz uma alteração na coloração do Soft ágar pela clivagem do benzil-viologênio. Os controles negativo e positivo (Figura 84-D e E, respectivamente) que foram adotados mostraram a alteração visível de amarelada para púrpura. A construção truncada, no entanto, não apresenta complementação o que indica a não atividade de FDH. Por se tratar de uma selenoenzima, isso indica que a via de biossíntese de Sec está deficiente e, portanto, não ativa.

Isso corrobora com os resultados preliminares da importância desse domínio único em bactérias, uma vez que arqueias, como *Methanococcus jannaschii*, possuem o gene *MjseIA* com a ausência desse domínio e consequente produção de uma enzima não funcional e com conformação dimérica em solução.<sup>99</sup> Estudos recentes mostraram também o mesmo resultado para construções truncada de todo o domínio N-terminal em bactérias por meio de estruturas cristalográficas resolvidas.<sup>60,98</sup> Os dímeros em solução não funcionais não interagem com o tRNA<sup>Sec</sup> e, portanto, a via de biossíntese fica inativa no passo crucial de conversão Ser-Sec.

Contudo, esses dados mostram que um truncamento menos no domínio N-terminal (1-28) não afeta a conformação oligomérica (decâmero), no entanto, altera a função bioquímica. Esse fato relevante indica que, mesmo que não conservada, a sequência inicial de *selA* é fundamental em bactérias, não para a conformação oligomérica mas para sua função, mostrando pela primeira vez que SelA<sub>decâmero</sub> pode não ser biologicamente ativa. Ensaios futuros da interação dessa construção com o tRNA<sup>Sec</sup> e com a enzima SelD serão realizados, a fim de corroborar com os dados e determinar se esses resíduos afetam a interação ou a atividade catalítica.

#### **4.10.2 Ensaios de interação das proteínas da via de incorporação de Sec de *E. coli* por meio de análises de Duplo-Híbrido dirigido em *S. cerevisiae***

Os ensaios de DH dirigido 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*. Outro fator considerado é que o organismo no qual os ensaios foram realizados, *S. cerevisiae*, possui um tRNA<sup>Sec</sup> 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.<sup>156</sup> Inicialmente, foram desenhados oligonucleotídeos para a amplificação dos genes codificantes para todas as proteínas participantes da via de biossíntese de Sec em *E. coli*, para posterior clonagem nos vetores pLEXA-C (vetor isca) e o vetor pGAD-424 (vetor presa).

Após a amplificação, todas as construções foram então clonadas em vetor de propagação comercial pJET1.2/*blunt* (Thermo Fisher Scientific) e posterior transformação em células de propagação competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Após confirmação por sequenciamento, os genes foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição e clonados nos vetores para os ensaios de interação no sistema eucariótico. As construções foram novamente transformadas em *E. coli* DH5- $\alpha$  para propagação e armazenamento dos plasmídeos.

Após a confirmação da clonagem por meio de digestão com as enzimas específicas e por sequenciamento, iniciaram-se os ensaios de autoativação em triplicata do sistema como controles, onde somente um dos vetores contendo o inserto de interesse foi transformado e a quantificação se deu utilizando os plasmídeos controles pLexA-p53 e pACT-largeT (DualSystems Biotech) (Figura 85).

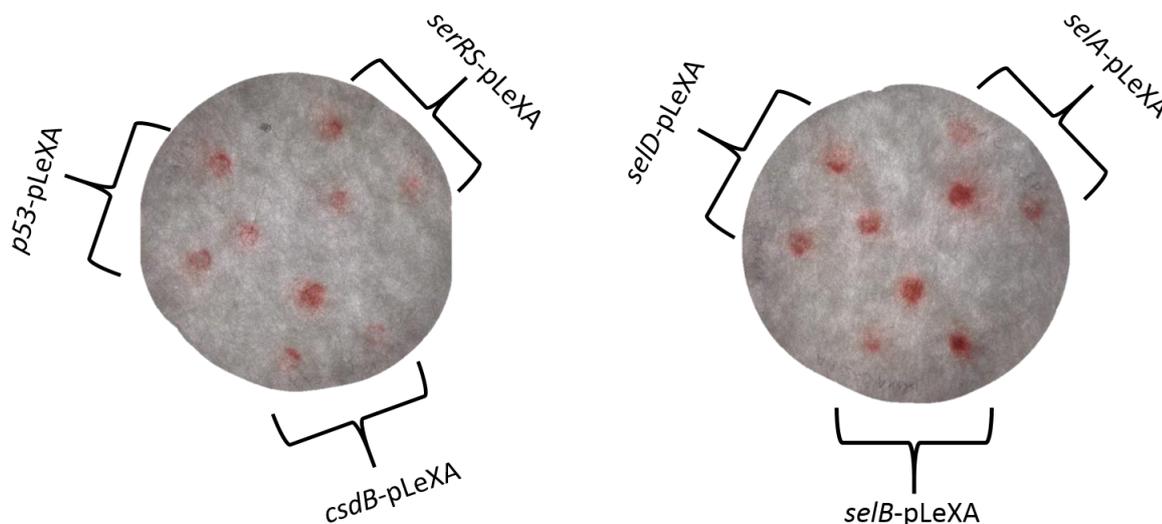


Figura 85 – Ensaio de autoativação do sistema de DH em *S. cerevisiae* dos genes clonados no vetor isca pLexA-C.  
 Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ensaios de autoativação das construções clonadas no vetor pLEXA-C (vetor isca) mostraram que o sistema não é autoativado, o que permite a continuidade dos ensaios por essa metodologia. Contudo, os ensaios de autoativação das construções no vetor pGAD-424 (vetor presa) estão sendo realizadas em colaboração com as alunas Jéssica Fernandes Scortecci, Raíssa Gutierrez e Heloísa Ciol, e necessitam de uma continuidade no andamento do projeto para a finalização dessa etapa confirmatória. Posteriormente, serão realizados os ensaios de interação, os quais ocorrerão em dupla confirmação das triplicatas através da utilização de 25 ensaios (todas as construções contra todas clonadas em ambos os vetores), onde todas as combinações de interação da via de biossíntese de Sec foram consideradas. Por isso, a finalização desses experimentos está proposta no capítulo de perspectivas futuras da continuidade desse projeto.

Vale ressaltar que esse ensaio de interação será a primeira tentativa de experimentos de Duplo-Híbrido dirigido de uma via bioquímica inteira em sistema inerte a presença do tRNA<sup>Sec</sup>, o que indicará a influência dessa macromolécula na formação desses complexos macromoleculares. Além disso, esse ensaio visa mostrar em sistema *in vivo* o que vem sendo determinado *in vitro* por medidas e ensaios biofísicos em nosso grupo de pesquisa há vários anos.

*Capítulo V*  
**CONCLUSÕES**

*“Só evite fazer algo hoje se você quiser morrer e deixar assuntos inacabados.”*

**Pablo Picasso**

25 de Outubro de 1881 – 08 de Abril de 1973

Pintor espanhol



O projeto de doutoramento iniciado em 2013 teve como objetivo a caracterização das interações da via de biossíntese de Sec em *E. coli*, isto é, análises das interações proteína-proteína e proteína-RNA dessa via bioquímica.

Até a data de início do projeto não havia informações estruturais relevantes sobre SelB e seus complexos.<sup>69</sup> Deste modo, fez-se necessário os estudos *in silico* para a obtenção de um modelo estrutural de SelB de *E. coli*. Para isso, duas metodologias foram adotadas: a construção de um modelo utilizando como molde estruturas homólogas de cada domínio separadamente e, posteriormente, utilizando uma estrutura homóloga (SelB de *A. aeolicus*).<sup>70</sup> O enovelamento canônico de EFs observado na WHD1 e conservado para a WHD4 indicaram a semelhança estrutural do modelo proposto com as estruturas homólogas previamente conhecidas, bem como a análise dos parâmetros de validação. Ambos os modelos se mostraram satisfatórios e permitiram as análises subsequentes dos complexos macromoleculares das quais SelB é participante.

Com o passar dos anos, estruturas de SelBs homólogas e outros EFs para incorporação de Sec de diferentes organismos foram resolvidas por diferentes metodologias, permitindo a avaliação e comparação entre essas macromoléculas.<sup>70-73</sup> Interessantemente, a elevada conservação de WHD1 (esperada) mostra um posicionamento das WHDs 2 e 3, além da ausência da WHD4, única em bactérias. A diferença no posicionamento desses domínios se dá pela presença de uma outra proteína responsável pelo reconhecimento de SECIS para esses outros organismos (SBP2s).<sup>33</sup> Além disso, os modelos teóricos construídos através das superposições das estruturas conhecidas previamente mostraram a possível interação da WHD3 pelo braço variável do tRNA<sup>Sec</sup>, extremamente grande para esse tRNA específico. Esse resultado foi confirmado posteriormente pelos dados estruturais dos complexos macromoleculares resolvidos por crio-microscopia eletrônica e pelos resultados em solução do aluno de mestrado Adriano de Freitas Fernandes.<sup>72,110</sup> Além disso, foi mostrado a distância de 11 nucleotídeos entre o *loop*-apical e a posição *wobble* do tRNA<sup>Sec</sup>, sendo condizente com o previamente estabelecido para o tamanho do elemento SECIS.<sup>33,115-116</sup>

Com relação ao preparo das amostras, Sela foi purificada como descrito anteriormente e os RNAs mostraram-se enovelados da maneira esperada em função da temperatura.<sup>60,100-104</sup> O novo protocolo de expressão e purificação de SelB permitiu um incremento no valor de concentração de 13 vezes. Somado a isso, foi possível determinar a presença de RNAs e ausência de nucleotídeos endógenos. Assim, estudos comparando as duas cepas de expressão (*E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460) foram realizados por dicroísmo circular e fluorescência intrínseca dos resíduos aromáticos, evidenciando sutis diferenças entre ambas as cepas

utilizadas. Contudo, a adição da etapa de tratamento com RNase propiciou que ambas as cepas produzissem amostras com características estruturais e biofísicas similares, o que permitiu que o projeto fosse continuado com amostras expressas em *E. coli* BL21.

Os ensaios de interação com os nucleotídeos de guanina por dicroísmo circular mostraram um aumento dos valores de temperatura de *melting* dos complexos formados, sendo compatível com o esperado. De acordo com seu papel na via de biossíntese de Sec, SelB deve ter maior afinidade por GTP ( $\Delta T_m^{GTP} = 2,1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) em comparação ao GDP ( $\Delta T_m^{GDP} = 0,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Somado a isso, experimentos de calorimetria de titulação isotérmica mostraram um valor de constante de dissociação 17 vezes menor para concentrações biológicas mesmo que esses nucleotídeos possuam elevada concentração em ambiente celular, ou seja,  $(468 \pm 224) \mu\text{M}$  para GTP em sistemas biológicos.<sup>157</sup>

A interação com o tRNA<sup>Sec</sup> por medidas de supressão da emissão dos resíduos de triptofanos mostrou uma interação específica com  $K_D = (248 \pm 59) \text{ nM}$  e  $n = (1,7 \pm 0,7)$  indicando valores de interação que ainda não refletem a especificidade necessária para essa interação crucial no estágio de incorporação de Sec. Além disso, essas medidas indicam a supressão da emissão correspondente a 6 resíduos aromáticos nessa interação, bem como predito para a quantidade de resíduos de triptofanos presentes nas WHDs 2 e 3.

Interações por espectroscopia de anisotropia de fluorescência realizadas com os RNAs covalentemente marcados na extremidade 5' possibilitaram a determinação dos valores de  $K_D$  ( $283 \pm 53) \text{ nM}$ ) e  $n$  ( $1,4 \pm 0,6$ ) obtidos para o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. Esses dados contribuem com os dados previamente obtidos por IFS, porém ainda não indicando a especificidade esperada para a formação desse complexo.

Já a interação SelB.GTP.SECIS  $K_D = (53 \pm 13) \text{ nM}$  e  $n = (2,5 \pm 1,5)$  apresentou valores de  $K_D$  cuja especificidade foi notória pelo baixo valor de  $K_D$  observado, o que indicaria uma preferência da interação SelB.GTP.SECIS ao se comparar com SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (valor de  $K_D \sim 5$  vezes menor, portanto maior afinidade). No entanto, ao se observar a formação dos complexos quaternários pela montagem sequencial fica claro que a ordem de eventos na montagem é baseada na formação inicial do complexo. O valor de  $K_D$  ( $895 \pm 57) \text{ nM}$  e  $n$  ( $1,8 \pm 0,8$ ) para SelB.GTP.SECIS.tRNA<sup>Sec\*</sup> indica que a formação do complexo SelB.GTP.SECIS.tRNA<sup>Sec</sup> partindo do complexo ternário SelB.GTP.SECIS não é a maneira biologicamente mais favorável ao se comparar com os valores de  $K_D$  ( $77 \pm 3) \text{ nM}$  e  $n$  ( $2,4 \pm 0,9$ ) do complexo ternário, permitindo sugerir a ordem de eventos para a formação do complexo quaternário partindo do complexo ternário. SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> é previamente formado e interage com SECIS com maior afinidade, resultando no complexo

SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Os valores de  $K_{DS}$  foram confirmados por experimentos de ultracentrifugação analítica, utilizando-se como controle negativo o tRNA<sup>Ala</sup> que possui um enovelamento diferenciado ao se comparar com o tRNA<sup>Sec</sup>.<sup>110</sup> E experimentos de mobilidade eletroforética em gel nativo indicam a estequiometria de interação de 1(SelB.GTP):1tRNA<sup>Sec</sup> além da necessidade de interação SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> para o favorecimento da interação com SECIS e formação do complexo quaternário.

Conclui-se também que SelB não deve reconhecer o tRNA<sup>Sec</sup> isolado no ambiente celular, mas sim interagindo com o complexo homodecamérico Sela ( $K_D = (76 \pm 5)$  nM) e posteriormente, o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> interage com o elemento SECIS para a entrega do tRNA<sup>Sec</sup> ao ribossomo. A entrega de Sec ao complexo ribossomal ocorre após o complexo ternário formado (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>) interagir com o elemento estrutural presente no mRNA, o elemento SECIS. Essa ordem de eventos pode ser observada pela diferença substancial dos valores de  $K_D$  na formação do complexo quaternário (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS), revelando a sequência e necessidade de SelB interagir com o tRNA específico antes de reconhecer SECIS. Essas análises também permitiram a determinação dos parâmetros termodinâmicos desse sistema por meio de experimentos de calorimetria de titulação isotérmica, mostrando um sistema entálpico e entrópico favorável a essas interações. A formação dos complexos foi confirmada por medidas de calorimetria de varredura diferencial e observação do deslocamento dos valores de  $T_m$ s.

Os experimentos de cinética GTPásica *in vitro* mostraram que a formação dos complexos são cineticamente estáveis, ou seja, não houve o consumo de GTP em tempos experimentais curtos (até 60 minutos), indicando que o ribossomo se manteve ligado aos complexos durante os experimentos.

As análises de mapeamento da superfície acessível ao solvente mostraram que as regiões Q280-L284, H292-R296, D310-T311 e R447-L450 apresentaram decréscimo na taxa de incorporação de deutério para o complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> comparado com o mesmo tempo de marcação para SelB.GTP. Logo, estavam menos acessíveis ao solvente indicando a região na qual o tRNA<sup>Sec</sup> interage de maneira crucial com o braço variável corroborando com os trabalhos recentemente publicados e com os resultados provindos do projeto do aluno Adriano de Freitas Fernandes.<sup>72,110</sup> Ademais, os peptídeos R510-E520, G534-Y544 e N555-E562 apresentaram decréscimo significativo na incorporação de deutério, indicando assim serem os responsáveis pelo reconhecimento de SECIS corroborando com os dados estruturais prévios.<sup>108-109</sup>

A análise da formação de complexos também mostrou através de espectros de infra-

vermelho que existem mudanças estruturais sensíveis em SelB nas interações com tRNA<sup>Sec</sup> e SECIS. Dessa forma, indicando que a conexão entre as WHDs 3 e 4, não estruturada, deve se enovelar em contribuições de fitas- $\beta$  quando o complexo quaternário é montado.<sup>72,87</sup>

Do aspecto estrutural, experimentos de espalhamento de raios-X a baixo ângulo permitiram a determinação de parâmetros estruturais em solução e contribuem com os dados prévios da formação dos complexos, além de tornar possível a construção de envelopes moleculares condizentes com os modelos preditos inicialmente.<sup>69,72,87,110</sup> Ensaios de cristalização mostraram-se favoráveis. Apesar disso, os cristais ainda devem ser testados a fim de obter estrutura em alta resolução dos complexos ternário e quaternário de SelB.

Estudos por TEM mostraram-se favoráveis para as análises dos complexos de interação com o ribossomo, bem como na determinação dos modelos estruturais a baixa resolução. Destee modo, foi possível compará-los com a estrutura resolvida recentemente por Cryo-EM através de mapas de diferença de densidades.<sup>72</sup>

Os estudos estruturais dos complexos transientes envolvendo SelA e SelD por Cryo-EM evoluíram e permitiram a determinação de modelos estruturais com resolução em baixo nanometro. Assim, faz-se necessária a melhoria e avanço no processamento desses dados de TEM para um ganho em resolução.<sup>96,104</sup>

Além disso, o domínio N-terminal de SelA foi mostrado ser crucial para sua função catalítica, o que reforça resultados anteriores que indicam a importância evolutiva desse domínio.<sup>98,99</sup> Por fim, ensaios de interação *in vivo* estão sendo empregados para corroborar com os dados biofísicos e bioquímicos obtidos *in vitro* ao longo desse projeto, tendo como perspectiva futura sua conclusão em breve.

*Capítulo VI*  
*PERSPECTIVAS*

*"Eu não sei o que quero ser, mas sei muito bem o que não quero me tornar."*

**Friedrich Nietzsche**

15 de Outubro de 1844 – 25 de Agosto de 1900

Filósofo alemão



Ao longo desse projeto foram propostos experimentos e ensaios que serão empregados como perspectivas futuras. Dentre elas, podem-se destacar as listadas abaixo.

A finalização dos estudos termodinâmicos da compensação entálpica-entrópica do sistema de interação SelB.GTP.RNAs para a completa compreensão termodinâmica da formação desses complexos. Além disso, a inclusão dos demais complexos estudados na biossíntese de Sec em *E. coli*.

Realização da cinética de consumo de GTP e, conseqüente produção de GDP, na formação dos complexos na presença do ribossomo.

Otimização do envelope molecular gerado para o tRNA<sup>Sec</sup> através de novas medidas de SAXS através do incremento da concentração dessa macromolécula.

Coleta de dados dos cristais obtidos na linha de luz síncrotron MX-2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-CNPEN) e em SOLEIL (França).

Finalização do processamento de dados dos complexos ribossomais por NS-EM e determinação dos mapas de diferença de densidades para a localização das macromoléculas de interesse.

Confirmação dos resultados de FTIR por meio dos modelos estruturais obtidos dos complexos de SelB e RNAs.

Preparação de grades e coleta de imagens de NS-EM e, posteriormente, Cryo-EM do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelB.

Experimentos para quantificação da conversão Ser-Sec *in vitro* utilizando SelA, tRNA<sup>Sec</sup> e SelD na presença de Se<sup>2+</sup> e ATP.

Melhoria da resolução dos complexos coletados por Cryo-EM, tanto a otimização para o complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup> como ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.SelD.

Construção de uma quimera entre o domínio N-terminal de *E. coli* com a enzima putativa dimérica SelA de *M. jannaschii* com o intuito de análises dos resultados de oligomerização e interação com o tRNA específico.

Finalização dos experimentos de interação *in vivo* por Duplo-Híbrido dirigido.



*REFERÊNCIAS*

" *Quanto mais sei que sei, menos sei que sei.*"

**Abraham Lincoln**

469 a.C. – 399 a.C.

Filósofo ateniense



- 1 WAKL, M. C. et al. Macromolecular complex. *Research Perspectives of the Max Planck Society*, v.1, n. 1, p. 30-31, 2010.
- 2 ALBERTS, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell*, v. 92, n. 3, p. 291-294, 1998.
- 3 BONETTA, L. Protein–protein interactions: interactome under construction. *Nature*, v. 468, p. 851-854, 2010. doi:10.1038/468851a.
- 4 MARSH, J. A.; TEICHMANN, S. A. Structure, dynamics, assembly, and evolution of protein complexes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 84, p. 1-967, 2015. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034142.
- 5 YAN, C. et al. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science*, v. 349, n. 6253, p. 1182-1191, 2015. doi: 10.1126/science.aac7629.
- 6 FISCHER, N. et al. Structure of the *E. coli* ribosome–EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, v. 520, p. 567-570, 2015. doi:10.1038/nature14275.
- 7 JONES, S.; THORNTON, J. M. Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 93, n. 1, p. 13-20, 1996.
- 8 KHAYAT, R. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2. *Journal of Virology*, v. 85, n. 15, p. 7856-7862, 2011. doi: 10.1128/JVI.00737-11.
- 9 SERRÃO, V. H. B. et al. Promiscuous interactions of human septins: the GTP-binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. *FEBS Letters*, v. 585, n. 24, p. 3868-3873, 2011.
- 10 APPEN, A. et al. In situ structural analysis of the human nuclear pore complex. *Nature*, v. 526, p. 140-143, 2015. doi:10.1038/nature15381.
- 11 SIRAJUDDIN, M. et al. Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature*, v. 449, p. 311-315, 2007. doi: 10.1038/nature06052.
- 12 KIM, J. Y.; KWAK, P. B.; WEITZ, C. J. Specificity in circadian clock feedback from targeted reconstitution of the NuRD corepressor. *Molecular Cell*, v. 56, n. 6, p. 738-748, 2014. doi: 10.1016/j.molcel.2014.10.017.
- 13 KIM, J. Y. et al. Purification and analysis of PERIOD protein complexes of the mammalian circadian clock. *Methods in Enzymology*, v. 551, p. 197-210, 2015. doi: 10.1016/bs.mie.2014.10.013.
- 14 LANDE-DINER, L. et al. Single-cell analysis of circadian dynamics in tissue explants. *Molecular Biology of the Cell*, v. 26, n. 22, p. 3940-3945, 2015. doi: 10.1091/mbc.E15-06-0403.
- 15 ZHAO, J.; RUBINSTEIN, J. L. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature*, v. 521, p. 241-245, 2015. doi:10.1038/nature14365.

- 16 TAMAYO, A. G. et al. Histone monoubiquitination by Clock-Bmal1 complex marks *Per1* and *Per2* genes for circadian feedback. *Nature Structural & Molecular*, v. 22, n. 10, p. 759-766, 2015. doi: 10.1038/nsmb.3076.
- 17 JONES, S. et al. Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 4, p. 943-954, 2001.
- 18 TUSCHL, T. Functional genomics: RNA sets the standard. *Nature*, v. 421, n. 6920, p. 220-221, 2003.
- 19 KHALIL, A. M.; RINN, J. L. RNA-protein interactions in human health and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 22, n. 4, p. 359, 2011. doi: 10.1016/j.semcd.2011.02.016.
- 20 RE, A. et al. RNA-protein interactions: an overview. *Methods in Molecular Biology*, v. 1097, p. 491-521, 2014. doi: 10.1007/978-1-62703-709-9\_23.
- 21 MORAS, D. et al. Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion Structure Biology*, v. 2, p. 138-142, 1992.
- 22 REITER, N. J. et al. Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*, v. 468, p.784-789, 2010. doi:10.1038/nature09516.
- 23 KAZANTSEV, A. V. et al. Solution structure of RNase P RNA. *RNA*, v. 17, n. 6, p. 1159-1171, 2011. doi: 10.1261/rna.2563511.
- 24 VARANI, L. et al. The NMR structure of the 38 kDa U1A protein – PIE RNA complex reveals the basis of cooperativity in regulation of polyadenylation by human U1A protein. *Nature Structural Biology*, v. 7, p. 329–335, 2000. doi:10.1038/74101.
- 25 BERNECKY, C. et al. Structure of transcribing mammalian RNA polymerase II. *Nature*, v. 529, n. 7587, p. 551-554, 2016. doi: 10.1038/nature16482
- 26 PEDERSEN, P. L.; AMZEL, L. M. ATP synthases. structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. *Biological Chemistry*, v. 268, n. 14, p. 9937-9940, 1993.
- 27 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.
- 28 SHERMAN, F.; STEWART, J. W.; TSUNASAWA, S. Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays*, v. 3, n. 1, p. 27–31, 1985. doi:10.1002/bies.950030108.
- 29 SRINIVASAN, G.; JAMES, C. M.; KRZYCKI, J. A. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science*, v. 296, n. 5572, p. 1459–1462, 2002. doi:10.1126/science.1069588. PMID 12029131.
- 30 ROTHER, M.; KRZYCKI, J. A. Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea. *Archaea*, p. 1–14, 2010. doi:10.1155/2010/453642.

- 31 QUITTERER, F. et al. Crystal structure of methylornithine synthase (PylB): insights into the pyrrolysine biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 51, n. 6, p. 1339-1342, 2012. doi: 10.1002/anie.201106765.
- 32 BÖCK, A. Selenium metabolism in bacteria. In: HATFIELD, D. L. (Ed). *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Norwood, MA: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 7-22
- 33 HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N. *Selenium: its molecular biology and role in human health*. 4th ed. New York:Springer-Verlag, 2016, 411 p.
- 34 MOXON, A. L.; RHIAN, M. Selenium poisoning. *Physiological Reviews*, v. 23, n. 4, p. 305-337, 1943.
- 35 STADTMAN, T. C. Selenium biochemistry. *Science*, v. 183, n. 128, p. 915-922, 1974.
- 36 RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.
- 37 STADTMAN, T. C. Selenoproteins-tracing the role of a trace element in protein function. *PLoS Biology*, v. 3, n. 12, p. e421, 2005.
- 38 WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*, v. 91, n. 1, p. 11-28, 2004.
- 39 LEVANDER, O. A.; BECK, M. A. Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. *Biological Trace Element Research*, v. 56, n. 1, p. 5-21, 1997.
- 40 WESSJOHANN, L. A. et al. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. *Biological Chemistry*, v. 388, n. 10, p. 997-1006, 2007.
- 41 TURNER, R. J.; WEINER, J. H.; TAYLOR, D. E. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Biometals*. v. 11, n. 3, p. 223-227, 1998.
- 42 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.
- 43 BOCK, A.; STADTMAN, T. C. Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism. *Biofactors*, v. 1, n. 3, p. 245-250, 1988.
- 44 STADTMAN, T. C. Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, p. 83-100, 1996. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.000503.
- 45 JOHANSSON, L.; GAFVELIN, G.; ARNER, E. S. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1726, n. 1, p. 1-13, 2005.

- 46 HATFIELD, D.; DIAMOND, A.; DUDOCK, B. Opal suppressor serine tRNAs from bovine liver form phosphoseryl-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 79, n. 20, p. 6215-6219, 1982.
- 47 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.
- 48 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.
- 49 WALCZAK, R. et al. A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA*, v. 2, n. 4, p. 367-379, 1996.
- 50 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.
- 51 LEINFELDER, W. et al. Gene for a novel transfer-RNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, v. 331, n. 6158, p. 723-725, 1988.
- 52 SAWERS, G. et al. Expression and operon structure of the sel genes of *Escherichia coli* and identification of a 3rd selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 16, p. 4983-4993, 1991.
- 53 SCHIMMEL, P. R.; SÖLL, D. Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, v. 48, p. 601-648, 1979. doi: 10.1146/annurev.bi.48.070179.003125.
- 54 HÄRTLEIN, M.; CUSACK, S. Structure, function and evolution of seryl-tRNA synthetases: implications for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetases and the genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, v. 40, n. 5, p. 519-530, 1995.
- 55 WANG, C. et al. SerRS-tRNA<sup>Sec</sup> complex structures reveal mechanism of the first step in selenocysteine biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 21, p. 10534-10545, 2015.
- 56 FORCHHAMMER, K. et al. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. nucleotide sequence of the gene (selA) and purification of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 10, p. 6318-6323, 1991.
- 57 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.
- 58 FORCHHAMMER, K.; BOCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. analysis of the reaction sequence. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 10, p. 6324-6328, 1991.
- 59 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.

- 60 SILVA, I., R. et al. Formation of a ternary complex for selenocysteine biosynthesis in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, p. 29178-29188, 2015. doi: 10.1074/jbc.M114.613406.
- 61 MIHARA, H. et al. Cysteine sulfinase desulfurase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 36, p. 22417-24, 1997.
- 62 MIHARA, H.; ESAKI, N. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 60, n. 1-2, p. 12-23, 2002.
- 63 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.
- 64 GRUNDNER-CULEMANN, E. et al. Two distinct SECIS structures capable of directing selenocysteine incorporation in eukaryotes. *RNA*, v. 5, n. 5, p. 625-635, 1999.
- 65 TUJEBAJEVA, R. M. et al. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Reports*, v. 1, n. 2, p. 158-163, 2000.
- 66 FORCHHAMMER, K.; LEINFELDER, W.; BÖCK, A. Identification of a novel translation factor necessary for the incorporation of selenocysteine into protein. *Nature*, v. 342, n. 6248, p. 453-456, 1989.
- 67 BARON, C.; BÖCK, A. The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA(Sec) of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 30, p. 20375-20379, 1991.
- 68 OSE, T. et al. Structural basis for dynamic interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Structure*, v. 15, n. 5, p. 577-586, 2007.
- 69 HILGENFELD, R.; BÖCK, A.; WILTING, R. Structural model for the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Biochimie*, v. 78, n. 11-12, p. 971-978, 1996.
- 70 ITOH, Y., SEKINE, S., YOKOYAMA, S. Crystal structure of the full-length bacterial selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 18, p. 9028-38, 2015.
- 71 GANICHKIN, O.; WAHL, M. C. Conformational switches in winged-helix domains 1 and 2 of bacterial translation elongation factor SelB. *Acta Crystallographica D*, v. 63, n. 10, p.1075-10781, 2007.
- 72 FISCHER, N. et al. The pathway to GTPase activation of elongation factor SelB on the Ribosome. *Nature*, v. 540, n. 7631, p. 80-85, 2016. doi: 10.1038/nature20560.
- 73 BARON, C. et al. Solution structure of selenocysteine-inserting transfer RNA(sec) from *Escherichia coli* - comparison with canonical transfer RNA(Ser). *Journal of Molecular Biology*, v. 231, n. 2, p. 274-292, 1993.

74 TURANOV, A. A. et al. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Advances in Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 122-128, 2011.

75 SHERRER, R. L.; HO, J. M.; SÖLL, D. Divergence of selenocysteine tRNA recognition by archaeal and eukaryotic O-phosphoseryl-tRNA<sup>Sec</sup> kinase. *Nucleic Acids Research*, v. 36, n. 6, p. 1871-1880, 2008.

76 ARAISO, Y. et al. Structure of a tRNA-dependent kinase essential for selenocysteine decoding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 38, p. 16215-16220, 2009.

77 GANICHKIN, O. M. et al. Structure and catalytic mechanism of eukaryotic selenocysteine synthase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 9, p. 5849-5865, 2007.

78 FRENCH, R. L. et al. Structural asymmetry of the terminal catalytic complex in selenocysteine synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 42, p. 28783-28794, 2014.

79 PALIOURA, S. et al. The human SepSecS-tRNA<sup>(Sec)</sup> complex reveals the mechanism of selenocysteine formation. *Science*, v. 325, n. 5938, p. 321-325, 2009.

80 COLLINS, R. et al. Biochemical discrimination between selenium and sulfur 1: a single residue provides selenium specificity to human selenocysteine lyase. *PloS ONE*, v. 7, n. 1, p. e30581:10, 2012.

81 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.

82 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.

83 TAMURA, T. et al. Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: SPS1 for recycling L-selenocysteine and SPS2 for selenite assimilation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 46, p. 16162-16167, 2004.

84 LOBANOV, A. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Selenoproteins animals: Selenophosphate synthetase SPS1 functions in a pathway unrelated to selenocysteine biosynthesis. *Protein Science*, v. 17, n. 176, p. 176-182, 2008.

85 PATTERSON, K. G.; TRIVEDI, N.; STADTMAN, T. C. *Methanococcus vannielii* selenium-binding protein (SeBP): chemical reactivity of recombinant SeBP produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 34, p. 12029-12034, 2005.

86 RODNINA, M. V.; WINTERMEYER, W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 21, n. 3, p. 435-443, 2009.

- 87 DOBOSZ-BARTOSZEK, M. et al. Crystal structures of the human elongation factor eEFSec suggest a non-canonical mechanism for selenocysteine incorporation. *Nature Communications*, v. 6, p. 12941, 2016. doi: 10.1038/ncomms12941.
- 88 SOLER, N.; FOURMY, D.; YOSHIKAWA, S. Structural insight into a molecular switch in tandem winged-helix motifs from elongation factor SelB. *Journal of Molecular Biology*, v. 370, n. 4, p. 728-741, 2007.
- 89 KOSSINOVA, O. et al. The SBP2 protein central to selenoprotein synthesis contacts the human ribosome at expansion segment 7L of the 28S rRNA. *RNA*, v. 20, n. 7, p. 1046-1056, 2014.
- 90 KOSSINOVA, O. et al. A novel insight into the mechanism of mammalian selenoprotein synthesis. *RNA*, v. 19, n. 8, p. 1147-1158, 2013.
- 91 MARIOTTI, M. et al. Lokiarchaeota marks the transition between the archaeal and eukaryotic selenocysteine encoding systems. *Molecular Biology and Evolution*. v. 33, n. 9, p. 2441-2453, 2016.
- 92 FLETCHER, J. 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.
- 93 ITOH, Y. et al. Decameric SelA•tRNA(Sec) ring structure reveals mechanism of bacterial selenocysteine formation. *Science*, v. 340, n. 6128, p. 75-78, 2013.
- 94 MANZINE, L. R. et al. An efficient protocol for the production of tRNA-free recombinant Selenocysteine Synthase (SELA) from *Escherichia coli* and its biophysical characterization. *Protein expression and purification*, v. 88, n. 1, p. 80-84, 2012.
- 95 MANZINE, L. R. et al. Assembly stoichiometry of bacterial selenocysteine synthase and SelC (tRNA<sup>Sec</sup>). *FEBS Letters*, v. 587, n. 7, p. 906-911, 2013.
- 96 SERRÃO, V. H. B. et al. Investigation of *Escherichia coli* Selenocysteine synthase (SelA) complex formation using Cryo Electron Microscopy (Cryo-EM). *Microscopy and Microanalysis*, v. 20, n. S3, p. 1282-1283, 2014.
- 97 FORCHHAMMER, K.; BÖCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 266, n. 10, p. 6324-6328, 1991.
- 98 ITOH, Y. et al. Dimer-dimer interaction of the bacterial selenocysteine synthase SelA promotes functional active-site formation and catalytic specificity. *Journal of Molecular Biology*, v. 426, n. 8, p. 1723-1735, 2014.
- 99 KAISER, J. T. et al. Structural and functional investigation of a putative archaeal selenocysteine synthase. *Biochemistry*, v. 44, n. 40, p. 13315-13327, 2005.
- 100 MANZINE, L. R. **Identificação de elementos estruturais no tRNA<sup>Sec</sup><sub>uca</sub> 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.

- 101 CASSAGO, A. **Estudos moleculares da Selenocisteína sintase (SELA) de *Escherichia coli***. 2005. 87 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- 102 CASSAGO, A. **Determinação estrutural da proteína Selenocisteína sintase de *Escherichia coli***. 2010. 110 p. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- 103 SILVA, I. R. **Estudos biofísicos da Selenofosfato Sintetase de *Escherichia coli* e investigação de seu papel na via de biossíntese de Selenocisteínas**. 2012. 140 p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 104 SERRÃO, V. H. B. **Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio de *Escherichia coli***. 2013. 187 p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 105 PALESKAVA, A.; KONEVEGA, A. L.; RODNINA, M. V. Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 33, p. 27906-27912, 2012.
- 106 PALESKAVA, A.; KONEVEGA, A. L.; RODNINA, M. V. Thermodynamic and kinetic framework of selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> recognition by elongation factor SelB. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 5, p. 3014-3020, 2010.
- 107 THANBICHLER, M.; BÖCK, A. Purification and characterization of hexahistidine-tagged elongation factor SelB. *Protein Expression and Purification*, v. 31, n. 2, p. 265–270, 2003.
- 108 SELMER, M.; SU, X. D. Crystal structure of an mRNA-binding fragment of Moorella thermoacetica elongation factor SelB. *EMBO Journal*, v. 21, n. 15, p. 4145-4153, 2002.
- 109 HARUNA, K. et al. Engineering the elongation factor Tu for efficient selenoprotein synthesis. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 15, p. 9976-83, 2014.
- 110 FERNANDES, A. F. **Análise da especificidade do tRNA<sup>Sec</sup> entre o fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB) e Seril tRNA sintetase de *Escherichia coli***. 2017. 199 p. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 111 ITOH, Y. et al. Tertiary structure of bacterial selenocysteine tRNA. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 13, p. 6729-6738, 2013.
- 112 ISHII, T.M. et al. The long D-stem of the Selenocysteine tRNA Provides Resilience at the Expense of Maximal Function. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 19, p. 13337-13344, 2013.
- 113 ITOH, Y. et al. Crystal structure of human selenocysteine tRNA. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 18, p. 6259-6268, 2009.

- 114 SU, D.; LI, Y.; GLADYSHEV, V. N. Selenocysteine insertion directed by the 3'-UTR SECIS element in *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Research*, v. 33, n. 8, p. 2486-2492, 2005.
- 115 ENGELBERG-KULKA, H. et al. An extended *Escherichia coli* "Selenocysteine Insertion Sequence" (SECIS) as a multifunctional RNA structure. *BioFactors*, v. 14, n. 1-4, p. 61-68, 2001.
- 116 THANBICHLER, M.; BÖCK, A. The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, v. 21, n. 24, p. 6925-6934, 2002.
- 117 WALCZAK, R. et al. A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA*, v. 2, p. 367-379, 1996.
- 118 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.
- 119 FLETCHER, J. 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.
- 120 RODNINA, M. V.; WINTERMEYER, W. The ribosome as a molecular machine: the mechanism of tRNA-mRNA movement in translocation. *Biochemical Society Transactions*, v. 39, n. 2, p. 658-662, 2011.
- 121 ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, v. 5, n. 4, p. 725-38, 2010.
- 122 SANCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling: introduction and practical examples with modeller. In: *Protein structure prediction*. New York: Springer-Verlag, 2000. p. 97-129. (Methods in molecular biology, v.143). doi: 10.1385/1-59259-368-2:97.
- 123 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D*, v. 66, pt. 1, p. 12-21, 2010.
- 124 PETERSEN, E. F. et al. UCSF chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- 125 RICKWOOD, D.; FORD, T.; GRAHAM, J. Nycodenz: a new nonionic iodinated gradient medium. *Analytical Biochemistry*, v. 123, n. 1, p. 23-31, 1982.
- 126 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.
- 127 KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1751, n. 2, p. 119-39, 2005.
- 128 KYPR, J. et al. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 6, p. 1713-25, 2009.

- 129 LEES, J. G. et al. *CDtool* - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis and archiving. *Analytical Biochemistry*, v. 332, n. 2, p. 285-9, 2004.
- 130 LACOWICKZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springes-Verlag, 2006.
- 131 CHAIRES, J. B. et al. Biocalorimetry. *Methods*, v. 76, n. 1-2, 2015. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.02.001.
- 132 JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetic of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999.
- 133 ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY. Disponível em <<http://www.malvern.com/en/products/technology/isothermal-titration-calorimetry/default.aspx>>. Acesso em 18 jan. 2017.
- 134 WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB Journal*, v. 11, n. 11, p. 835-841, 1997.
- 135 JAMESON, D. M.; SAWYER, W. H. Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. *Methods in Enzymology*, v. 246, p. 283-300, 1995. doi: 10.1016/0076-6879(95)46014-4.
- 136 PATEL, T. R. et al. Structural studies of RNA-protein complexes: A hybrid approach involving hydrodynamics, scattering, and computational methods. *Methods*, v. S1046-2023, n. 16, p. 30475-3, 2016. doi: 10.1016/j.ymeth.2016.12.002.
- 137 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.
- 138 ZHAO, H.; PISZCZEK, G.; SCHUCK, P. SEDPHAT – a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions. *Methods*, v. 76, p. 137–148, 2015. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.012.
- 139 HARRISON, R. A.; ENGEN, J. R. Conformational insight into multi-protein signaling assemblies by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 41, p. 187-193, 2016. doi: 10.1016/j.sbi.2016.08.003.
- 140 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.
- 141 BOLDON, L.; LALIBERTE, F.; LIU, L. Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Reviews*, v. 6, 2015. doi: 10.3402/nano.v6.25661.

- 142 HAMMERSLEY, A. P. FIT2D: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program. *Journal of Applied Crystallography*, v. 49, 2016. doi: 10.1107/S1600576716000455.
- 143 PETOUKHOV, M. V. et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, v. 45, pt. 2, p. 342-350, 2012.
- 144 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, p. 101-109, 2010. doi: 10.1107/S0021889809043076.
- 145 KIKHNEV, 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, p. 2570-2577, 2015. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.027.
- 146 McPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. *Methods*, v. 34, n. 3, p. 254-65, 2004
- 147 XIAO-CHEN, B.; McMULLAN, G.; SJORS, H. W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 40, n. 1, p. 49-57, 2015. doi: 10.1016/j.tibs.2014.10.005.
- 148 DeROSIER, D.; KLUG, A. Reconstruction of 3-dimensional structures from electron micrographs. *Nature*, v. 217, p. 130-134, 1968. doi:10.1038/217130a0.
- 149 BROGLIE, L. La nouvelle dynamique des quanta. In: RAPPORTS ET DISCUSSIONS DU CINQUIÈME CONSEIL DE PHYSIQUE, Bruzelles, Octobre 1927. *Électrons et Photons*. Bruzelles: l'Institut International de Physique Solvay, 1928.
- 150 HEEL, M. et al. Single-particle cryo electron microscopy: towards atomic resolution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 33, p. 307-369, 2000.
- 151 HEEL, M. et al. Four-dimensional cryo electron microscopy at quase atomic resolution: IMAGIC 4D. In: INTERNATIONAL TABLES FOR CRYSTALLOGRAPHY: crystallography of biological macromolecules. 2nd ed. London: ITC, 2012. v. F, p. 624-628.
- 152 AFANASYEV, P. et al. A posteriori correction of camera characteristics from large image data sets. *Scientific Reports*, v. 5, 2015. doi:10.1038/srep10317.
- 153 PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiology Molecular Biology Review*, v. 59, n. 1, p. 94-123, 1995.
- 154 BRUCKNER, A. et al. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 6, p. 2763-2788, 2009. doi: 10.3390/ijms10062763.
- 155 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. doi: 10.1016/0006-291x(92)91186-t.

156 RUDINGER-THIRION, J.; GIEGÉ, R. The peculiar architectural framework of tRNA<sup>Sec</sup> is fully recognized by yeast AspRS. *RNA*, v. 5, n. 4, p. 495-502, 1999.

157 TRAUT, T. W. Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 140, n. 1, p. 1-22, 1994.

*ANEXOS*

*" É triste pensar que a natureza fala e que o gênero humano não a ouve. "*

**Victor-Marie Hugo**

26 de Fevereiro de 1802 - 22 de Maio de 1885

Poeta francês



## Anexo A - Artigos publicados durante o doutorado

**Vitor Hugo Balasco Serrão**; Livia Regina Manzine; Ivan Rosa e Silva; Alexandre Cassago; Jefferson Bettini; Rodrigo Villares Portugal; Marin van Heel; Otavio Henrique Thiemann. Investigation of *Escherichia coli* Selenocysteine Synthase (SelA) Complex Formation Using Cryo-Electron Microscopy (Cryo-EM). *Microscopy and Microanalysis*, v. 20, p. 1282, 2014. doi:10.1017/S1431927614008149.

Ivan R. Silva; **Vitor H. B. Serrão**; Livia R. Manzine; Livia M. Faim; Marco T. A. da Silva; Raphaela Makki; Daniel M Saidemberg; Marinônio L Cornélio; Mário S. Palma; Otavio H. Thiemann. Formation of a Ternary Complex for Selenocysteine Biosynthesis in Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, p. 29178-88, 2015. doi: 10.1074/jbc.M114.613406

Antônio Marinho da Silva Neto; Juliana Roberta Torini de Souza; Larissa Romanello; Alexandre Cassago; **Vitor Hugo Balasco Serrão**; Ricardo DeMarco; Jose Brandão-Neto; Richard Charles Garratt; Humberto D'Muniz Pereira. Analysis of two *Schistosoma mansoni* uridine phosphorylase isoforms suggests the emergence of a protein with a non-canonical function. *Biochimie*, v. 125, p. 12-22, 2016. doi:10.1016/j.biochi.2016.02.007.

Natália M. Barbosa; Paulo E. G. Boldrin; Danuza Rossi; Priscila A. Yamamoto; Tatiana F. Watanabe; **Vitor H. Serrão**; John W. B. Hershey; Christopher S. Fraser; Sandro R. Valentini; Cleslei F. Zanelli. Mapping surface residues of eIF5A that are important for binding to the ribosome using alanine scanning mutagenesis. *Amino Acids*, v. 726, n. 1, 2016. doi: 10.1007/s00726-016-2279-z.

**Vitor Hugo Balasco Serrão**; Larissa Romanello; Alexandre Cassago; Juliana Roberta Torini de Souza; Juliana Cheleski; Ricardo DeMarco; José Brandão-Neto; Humberto D'Muniz Pereira. Structure and kinetics assays of *Schistosoma mansoni* Dihydrofolate Reductase. *Submetido: Acta Tropica*, vol. 170, p. 190-196, 2017. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.03.007.

Larissa Romanello; **Vitor Hugo Balasco Serrão**; Juliana Roberta Torini de Souza; Louise Bird; Joanne Nettleship; Yamini Reddivari; Ray Owens; José Brandão-Neto; Humberto D'Muniz Pereira. Structure of *Schistosoma mansoni* Adenylosuccinate Lyase (ADSL) and analysis of its potential chemotherapeutic target. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v.

214, p. 27–35, 2017. [dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2017.03.006).

Ana Eliza Zeraik; **Vitor Hugo B Serrão**; Larissa Romanello; Juliana Roberta Torini; Alexandre Cassago; Ricardo DeMarco; Humberto D'Muniz Pereira. Analysis of adenine phosphoribosyltransferase genes in schistosomes suggests specialization of nucleotide metabolism in parasite sexual reproduction. *Molecular and Biochemical Parasitology* (Abr/2017).

**Anexo B - Artigos submetidos**

Danielle Gava; **Vitor Hugo Balasco Serrão**; Lana Teixeira Fernandes; Mauricio Egídio Cantão; Janice Reis Ciacci-Zanella; Nelson Morés; Rejane Schaefer. Modeling of PCV2 capsid protein from vaccinated pigs with PCV2-SD in Brazil reveals alteration of the capsid recognition caused by a single amino acid mutation. *Submetido: Journal of Brazilian Microbiology (Mar/2017)*.

Jéssica Fernandes Scortecci; **Vitor Hugo Balasco Serrão**; Juliana Cheleski; Juliana Roberta Torini de Souza; Larissa Romanello; Alexandre Cassago; Ricardo DeMarco; Humberto D’Muniz Pereira. Spectroscopic and calorimetric assays reveals dCTP and ( $Zn^{2+} + Mg^{2+}$ ) dependence to enzymatic activity of *Schistosoma mansoni* Deoxycytidylate (dCMP) deaminase. *BBA – protein and proteomics (Mar/2017)*.



### Anexo C - Artigos em preparação e prêmios

**Vitor Hugo Balasco Serrão**; Adriano de Freitas Fernandes; Luis Guilherme Mansor Basso; Edson Crusca Júnior; Jéssica Fernandes Scortecci; Marinônio Lopes Cornélio; Bibiana Monson de Souza; Mário Sérgio Palma; Otavio Henrique Thiemann. The specific elongation factor to selenocysteine incorporation in *Escherichia coli*: unique tRNA<sup>Sec</sup> recognition and its interactions. *Em revisão*.

**Vitor Hugo Balasco Serrão**; Ivan Rosa e Silva; Jéssica Fernandes Scortecci; Adriano de Freitas Fernandes; Marco Tulio Alves da Silva; Otavio Henrique Thiemann. *Review*: the unique tRNA<sup>Sec</sup> and its role in Selenocysteine synthesis. *Em revisão*.

Jéssica Fernandes Scortecci; **Vitor Hugo Balasco Serrão**; Adriano de Freitas Fernandes; Luis Guilherme Mansor Basso; Mario de Oliveira Neto; Otavio Henrique Thiemann. Characterization of macromolecular interaction between Selenocysteine Lyase and Selenophosphate Synthetase at the beginning of selenocysteine pathway in *E. coli*. *Finalização da escrita*.

Juliana Roberta Torini; Larissa Romanello; Fernanda Aparecida Heleno Batista; **Vitor Hugo Balasco Serrão**; Louise Bird; Joanne Nettleship; Yamini Reddivari; Ray Owens; Ricardo de Marco; Júlio Cesar Borges; José Brandão-Neto; Humberto D'Muniz Pereira. Structure and kinetics of unusual cercariae Purine Nucleoside Phosphorylase isoform from *Schistosoma mansoni*, which utilizes efficiently cytidine, adenosine and inosine. Implications for energetic pathway. *Em revisão*.

Os trabalhos em colaboração junto ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira ainda possibilitarão a escrita de outros 2 artigos referentes aos dados cinéticos e estruturais das enzimas Nucleosídeo-difosfato quinase (*SmNDPK*) e um *Review* a convite da revista *Current Pharmaceutical Design* (Bentham) sobre as vias metabólicas de *S. mansoni*.

Os projetos de mestrado da aluna Jéssica Fernandes Scortecci, sobre as interações moleculares da putativa SBP2 de *N. gruberi*, e do aluno Adriano de Freitas Fernandes, sobre a especificidade do tRNA<sup>Sec</sup> na interação com a enzima SerRS de *E. coli*, além dos dados estruturais do complexo ternário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>. SelD por Cryo-EM com dados de interação

na presença de compostos tóxicos renderão a escrita de outros **3** artigos. Por fim, em colaboração com a Dra. Ana Paula Ulian de Araújo e suas alunas, Heloísa Ciol e Raíssa Gutierrez, será redigido um manuscrito da interação da via de biossíntese de Sec em *E. coli* realizada *in vivo* através de experimentos de Duplo-Híbrido e cinética ATPase por HPLC, totalizando **6** artigos a serem escritos, **6** a serem finalizados, **3** a serem aceitos e um total de **7** já publicados até o presente momento (1 IC, 2 mestrado e 4 doutorado).

O projeto foi financiado pelas agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2012/23730-1), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, 140636/2013-7) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Além do Programa “*Ciência sem Fronteiras*” pelo financiamento do período realizado na *Universiteit Leiden* (Holanda) (232251/2014-2) e do Departamento de Física da Universidade Federal de São Carlos (DF/UFSCar) pelo período de trabalho como professor substituto (Ago/2013 – Jan/2015, 23112.002021/2013-21).

Durante o doutorado, o projeto e aluno foram premiados como: (I) Melhor painel de *Life Sciences* da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálises (SBMM, 2013); (II) *Early Career Scholar Award* – IUMAS 6 da *Microscopy Society of America* (MSA) and the *Microanalysis Society* (2014); (III) *Poster Award* – Biological applications da *Microscopy Society of America* (MSA) and the *Microanalysis Society* (2014); (IV) Melhor resumo – *RNA Institute Award* (*RNA Society, tRNA conference* - 2014); (V) *Young researchers fellowships* (*25th tRNA conference*, 2014); (VI) Melhor painel da 44th Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica (SBBq) e 23rd *IUBMB* (2015) e (VII) *EMBO travel grants*’ (Grenoble – EMBO/EMBL, 2016).