

**Universidade de São Paulo**  
**Instituto de Física de São Carlos**

ADRIANO DE FREITAS FERNANDES

Análise da especificidade do tRNA<sup>Sec</sup> entre o fator de  
elongação específico para selenocisteínas (SelB) e Seril-tRNA  
Sintetase (SerRS) de *Escherichia coli*

São Carlos

2017



ADRIANO DE FREITAS FERNANDES

Análise da especificidade do tRNA<sup>Sec</sup> entre o fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB) e Seril-tRNA Sintetase (SerRS) de *Escherichia coli*

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

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

Versão Original

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)

Fernandes, Adriano de Freitas

Análise da especificidade do tRNA<sup>Sec</sup> entre o fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB) e Seril-tRNA Sintetase (SerRS) de *Escherichia coli* / Adriano de Freitas Fernandes; orientador Otavio Henrique Thiemann -- São Carlos, 2017.  
199 p.

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

1. Selenocisteína. 2. Interação proteína-tRNA. 3. Fator de alongação específico. I. Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriano de Freitas Fernandes

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 21/02/2017

Comissão Julgadora

Dr(a). Otavio Henrique Thiemann

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Iran Malavazi

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

Dr(a). Daniela Barretto Barbosa Trivella

Instituição: (CNPEN/Campinas)



À minha família e amigos.





## AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann pela orientação, conselhos, discussões e ajudas para a realização deste projeto.

Ao B-2 e a Jéssica pelos ensinamentos, amizade e conselhos desde os primeiros passos no laboratório e pela companhia até a conclusão deste trabalho. Em especial à Rê pela amizade e pelos diversos almoços.

Aos colegas de laboratório: Ana Laura, Camila, Ivan, Jéssica B., Laure, Marco Túlio, Natália, Renata e Thomás.

Aos técnicos de laboratórios de Biologia Estrutural (LBEst) e Biofísica Molecular: Susana, Bianca, Humberto, Bel, Andressa e Fernando.

Aos colaboradores: Profa. Dra. Marina Rodnina, Dra. Ana Carolina Figueiredo, Dra. Fernanda Batista, Dra. Livia Faim, Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto, Prof. Dr. Mário Sérgio Palma, Prof. Dr. Júlio César Borges, Dr. Luiz Mansor Basso e Dr. Edson Crusca que em muito auxiliaram no planejamento, execução e interpretação de experimentos.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pelas instalações e contribuição para a formação.

Aos laboratórios Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pela infraestrutura oferecida para os experimentos de SAXS e Laboratório de Espectrometria e Calorimetria (LEC) onde foram coletados os dados de ultracentrifugação analítica e toda a infraestrutura disponibilizada pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Ao Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa/UFSCar) onde foram realizados os experimentos de Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (NS-EM).

Aos meus amigos Abel, Bruno, Mario Junio, Rafael e Negão.

À CNPq pelo apoio financeiro fornecido (134013/2015-8).



## RESUMO

FERNANDES, A. F.; **Análise da especificidade do tRNA<sup>Sec</sup> entre o fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB) e Seril-tRNA Sintetase (SerRS) de *Escherichia coli*.** 2017. 199 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A selenocisteína (Sec, U) é o aminoácido que representa a principal forma biológica do elemento selênio e sua incorporação é um processo co-traducional em selenoproteínas como resposta ao códon UGA em fase e requer uma complexa maquinaria molecular. O repertório completo de genes envolvidos nessa via de síntese em procariotos é conhecido, porém algumas das interações moleculares ainda não foram totalmente esclarecidas. Este projeto visa à caracterização molecular nas interações entre o Fator de Elongação específico para incorporação de Sec (SelB) e Seril-tRNA sintetase (SerRS) com distintas construções do tRNA<sup>Sec</sup> de *Escherichia coli* afim de compreender a sua especificidade, seletividade e ordem de eventos. Para isso, medidas de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência (FAS), Ultracentrifugação Analítica (AUC) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC) foram utilizadas para determinação das constantes de interação desses complexos proteína-tRNA. Além disto, experimentos de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) e Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (NS-EM) foram realizados para elucidação estrutural destes complexos. Os estudos propostos irão auxiliar no entendimento do mecanismo de incorporação e de especificidade do tRNA para este aminoácido em bactérias bem como nos demais domínios da vida além de possibilitar um aumento na compreensão de complexos do tipo proteína-tRNA bem como salientar a importância dos elementos estruturais do tRNA para sua especificidade no processo de síntese de novas proteínas.

Palavras-chave: Selenocisteína. Interação proteína-tRNA. Fator de alongação específico.



## ABSTRACT

FERNANDES, A. F. **The tRNA<sup>Sec</sup> specific interaction of *Escherichia coli* Selenocysteine Elongation Factor (SelB) and Seryl-tRNA Synthetase (SerRS).** 2017. 199 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Selenocysteine (Sec, U) is an amino acid that represents the main biological form of the selenium element and its incorporation is a co-translational process in selenoproteins in response to the in-phase UGA codon and requires complex molecular machinery. The complete repertoire of genes involved in this pathway of synthesis in prokaryotes is known, although some of the molecular interactions have not yet been fully elucidated. This project aims at the molecular characterization in the interactions between the specific elongation factor for the incorporation of Sec (SelB) and Seryl-tRNA synthase (SerRS) with different constructions of tRNA<sup>Sec</sup> from *Escherichia coli* in order to their specificity, selectivity and order of events. For this, measurements using Fluorescence Anisotropy Spectroscopy (FAS), Analytical Ultracentrifugation (AUC) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) were employed to determine the interaction constants of the protein-tRNA complexes. In addition, Small Angle X-Ray Scattering (SAXS) experiments and negative stain transmission electron microscopy (NS-EM) were performed for structural elucidation of these complexes. The proposed studies will help to understand the mechanism of tRNA incorporation and specificity for this amino acid in bacteria as well as other domains of life. In addition, it allows an increase in the understanding of protein-tRNA-like complexes as well as emphasizing the importance of structural elements of tRNA for its specificity in the process of synthesis of new proteins.

Keywords: Selenocysteine. Protein-tRNA interaction. Specific elongation factor.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mecanismo de biossíntese de selenocisteínas, em Bactérias, em fase com um códon UGA. A figura exemplifica o RNA mensageiro contendo um códon UGA em fase. O elemento SECIS corresponde à estrutura secundária presente no RNA mensageiro e ao qual é codificado para a incorporação de Sec. 28
- Figura 2 - Alguns exemplos de tRNAs. a) tRNA<sup>Sec</sup> de *Escherichia coli*; b) tRNA<sup>Ser</sup> de *Escherichia coli*; c) tRNA<sup>Sec</sup> de *Trypanosoma brucei*; d) tRNA<sup>Sec</sup> de mamíferos. 29
- Figura 3 - Interfaces de reconhecimento a nucleotídeos e ao tRNA<sup>Sec</sup> : a) Estrutura cristalográfica de SelB de *M. maripaludis* em complexo com GDP a 3,0 Å de resolução. b) Possíveis regiões de contatos entre o tRNA<sup>Sec</sup> com SelB de *M. maripaludis*. 29
- Figura 4 - Reconhecimento ao SECIS: a) Definição do elemento SECIS e da construção utilizada para a expressão do domínio SelB de interação a esse fragmento. b) Estrutura resolvida a 2,0 Å de resolução do domínio de interação ao SECIS ligado a uma dupla de fragmentos pelo excesso estequiométrico utilizado para as condições de cristalização, portanto, não sendo possível determinar qual das duas interfaces é a fidedigna. 30
- Figura 5 - Estruturas comparativas de tRNA<sup>Sec</sup> de (a) e (e) Bactérias (*Escherichia coli*), (b) e (f) Eucariotos (*Homo sapiens*) e (c) e (g) *Archaea* (*Methanococcus kandleri*). Em (a) e (c) é mostrado a representação esquemática da estrutura do tRNA<sup>Sec</sup>. Em (e) a (g) o modelo estrutural do tRNA<sup>Sec</sup> correspondente. d) domínios representativos da estrutura de tRNA<sup>Sec</sup>. 31
- Figura 6 - Estruturas das aaRS. São apresentadas as aminoacil tRNA-sintetases classificadas em ambas as classes. As aaRSs em cada classe são exibidas com o seu domínio catalítico na mesma orientação. A segunda subunidade de dímero (R2) é mostrada em verde. No caso do PheRS tetramérico (R2), um heterodímero (R) é mostrado em azul e o outro é mostrado em verde. 35
- Figura 7 - Estruturas de fatores de Elongação já resolvidos. 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 criomicroscopia (PDB ID: 5LZD). GDPNP foi utilizado como análogo não hidrolisável de GTP. c) Estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* (PDB ID: 4ZU9); d) Estrutura cristalográfica de SelB de *M. maripaludis* (PDB ID: 4ACB); d) 31

	Estrutura cristalográfica de EF-TU de <i>T. aquaticus</i> (PDB ID: 1EFT).	<b>39</b>
Figura 8 -	A via de biossíntese de Selenocisteínas em Bactéria.	<b>40</b>
Figura 9 -	Representação esquemática das sequências dos tRNAs mutantes. Modelos gerados com o auxílio do programa ModeRNA server (Genesilico).	<b>47</b>
Figura 10 -	Esquema da reação de marcação de tRNAs com fluoreceína maleimida através do kit comercial (Sigma).	<b>50</b>
Figura 11 -	Esquema representativo das diferentes populações presentes ao final do processo de digestão da cauda Tiorredoxina.	<b>61</b>
Figura 12 -	Modelo esquemático para a polarização da luz e os efeitos causados devido à revolução das partículas.	<b>65</b>
Figura 13 -	Conjunto de configurações experimentais em que estão dispostos os polarizadores durante as medidas de anisotropia de fluorescência.	<b>65</b>
Figura 14 -	Aparato experimental para o experimento de ultracentrifugação analítica.	<b>69</b>
Figura 15 -	Esquema de transição de fase pelo monitoramento da variação da capacidade térmica por Calorimetria de Varredura Diferencial.	<b>72</b>
Figura 16 -	Representação esquemática do princípio da microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (NS-EM). A imagem é obtida pela região ocupada pela proteína na camada de acetato de uranila.	<b>76</b>
Figura 17 -	Representação Esquemática das principais técnicas de crescimento de cristais por difusão de vapor. a) gota pendurada ( <i>hanging drop</i> ); b) gota sentada ( <i>sitting drop</i> ).	<b>77</b>
Figura 18 -	Obtenção <i>in vitro</i> do gene <i>selC</i> : a) Amplificação e produtos da reação de transcrição. (A) Resultado da amplificação do gene <i>selC</i> . 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) gene <i>selC</i> de <i>E. coli</i> (121 pb); b) Produtos da reação de transcrição <i>in vitro</i> após procedimento de purificação. 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) tRNA <sup>Sec</sup> (SelC) de <i>E. coli</i> (95 bases). As caixas pretas indicam as bandas desejadas para cada experimento.	<b>79</b>
Figura 19 -	Amplificação de genes para tRNAs mutantes: a) 1,2: mutante do braço acceptor; 3,4: mutante do braço T $\psi$ C; b) 1,2: mutante do braço variável deletado (Var1); 3,4: mutante do braço variável (Var2); c) tRNA <sup>Ala</sup> ; d) 1,2: mutante do anticódon; 3,4 mutante do braço D-loop.	<b>80</b>
Figura 20 -	Espectros de dicroísmo circular devido às mudanças	



- conformacionais ocorridas em função da variação de temperatura para tRNA<sup>sec</sup> de *E. coli* sintetizado *in vitro*. As diferentes cores representam as mudanças na elipsidade em função da temperatura de 90 °C (inicial) a 15°C (final). **81**
- Figura 21 - Espectros de dicroísmo circular obtidos em função da variação de temperatura para os tRNAs mutantes: a) tRNA<sup>Sec</sup>; b) tRNA<sup>Acceptor</sup>; c) tRNA<sup>Ala</sup>; d) tRNA<sup>Anti</sup>; e) tRNA<sup>D-loop</sup>; f) tRNA<sup>TψC</sup>; g) tRNA<sup>Var1</sup>; h) tRNA<sup>Var1</sup>. **82**
- Figura 22 - Monitoramento do valor de dicroísmo circular no comprimento de onda de 268 nm em função da temperatura por meio do ajuste de *Boltzmann*. **83**
- Figura 23 - Obtenção de modelo estrutural para SelB: a) Modelo estrutural de SelB de *E. coli* gerado pelo programa I-TASSER (Zhang Lab). b) Gráfico de Ramachandram validando a qualidade do modelo gerado pela disposição de 97,4% dos resíduos do modelo em regiões favoráveis. **85**
- Figura 24 - Amplificação do gene *selB* em pT7-6 SelBH6 de *Escherichia coli*. À esquerda: Através de PCR, o fragmento correspondente ao gene de interesse (1850 pb). 1) Marcador de massa molecular Gene Ruler 1Kb Plus; 4) e 6) Amplificação de *selB* no tamanho esperado de ~1850 pb (*E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460, respectivamente); 3) e 5) Controle - plasmídeo pT7-6 (3075 pb) contendo o inserto. À direita: padrão de marcador de massa molecular utilizado para todos os géis de agarose. **87**
- Figura 25 - Purificação de SelB: a) Obtenção após cromatografia por exclusão molecular: 1) Marcador molecular; 2) SelB expressa em sistema *E. coli* BL21; 3) SelB expressa em sistema *E. coli* WL81460. b) cromatograma relativo à purificação por exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/30* (GE). *Inset*: curva de calibração a partir de pesos moleculares conhecidos. Os cromatogramas da purificação em ambas as cepas se apresentaram semelhantes **88**
- Figura 26 - Ensaio de *Western Blot* para o monitoramento da purificação de SelB: 1) Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2) Sobrenadante injetado na coluna de cromatografia de afinidade; 3) Fração eluída diretamente da coluna sem adição de imidazol; 4) Lavagem da coluna com 10 mM de imidazol; 5) Eluição da amostra com 100 mM de imidazol; 6) Após cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/300* acoplada ao sistema ÅKTA (GE). **88**
- Figura 27 - Verificação do arranjo de estruturas secundárias por meio de ensaios de CD: a) Espectro de dicroísmo circular apresentando o padrão de estruturas secundárias indicando o enovelamento obtido para a proteína SelB obtida a partir das cepas *E. coli* BL21 (λDE3) e *E.*

	<i>coli</i> WL81460. b) Monitoramento dos máximos de CD no comprimento de onda de 222 nm pelo ajuste de <i>Boltzmann</i> .	<b>91</b>
Figura 28 -	Quantificação de GTP em solução por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC): a) Determinação da ausência de GTP ou GDP endógenos que eventualmente poderiam ser copurificados; b) Análise do não consumo de GTP ao longo do tempo na temperatura de 25 °C por HPLC.	<b>92</b>
Figura 29 -	Monitoramento da oclusão de resíduos aromáticos por Fluorescência Intrínseca: a) Espectro de emissão de resíduos aromáticos. É possível observar que a intensidade de emissão decai com a adição de tRNA <sup>Sec</sup> ; b) Ajuste de <i>Hill</i> por meio do monitoramento dos máximos de emissão.	<b>93</b>
Figura 30 -	Curvas de anisotropia de fluorescência. a) Titulação de SelB em tRNA <sup>Sec</sup> ; b) Titulação de SelB em SelA.tRNA <sup>Sec</sup> . Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.	<b>94</b>
Figura 31 -	Curva de anisotropia resultantes da titulação de SelB em tRNAs na presença de GTP indicando a formação de complexos.	<b>95</b>
Figura 32 -	Picos correspondentes à proteína SelB e complexos para o experimento de velocidade de sedimentação a 25 °C na rotação de 40.000 rpm.	<b>98</b>
Figura 33 -	Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética. 1) SelB e 2) tRNA <sup>Sec</sup> , utilizados como controles na concentração de 1 μM. Diferentes estequiometrias: 3) 1 tRNA <sup>Sec</sup> : 0,5 SelB.GTP; 4) 1 tRNA <sup>Sec</sup> : 1 SelB.GTP; 5) 1 tRNA <sup>Sec</sup> : 2 SelB.GTP.	<b>102</b>
Figura 34 -	Deslocamento dos valores de T <sub>m</sub> na presença de tRNAs. a) Ligantes que promovem a estabilização térmica de SelB: GTP, tRNA <sup>Sec</sup> , tRNA <sup>TψC</sup> , tRNA <sup>Anti</sup> ; b) Ligantes que causam a desestabilização térmica de SelB: tRNA <sup>Acceptor</sup> , tRNA <sup>D-loop</sup> , tRNA <sup>Var1</sup> , tRNA <sup>Var2</sup> , tRNA <sup>Ala</sup> .	<b>103</b>
Figura 35 -	Comparação das curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo experimental e calculada para os complexos SelB.GTP e SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> . As curvas teóricas foram obtidas utilizando o modelo gerado pelo programa I-TASSER (Zhang Lab) para SelB proposto por este trabalho.	<b>105</b>
Figura 36 -	Gráfico de <i>Guinier</i> para os primeiros pontos das curvas de espalhamento experimentais resultando em R <sub>g</sub> = 4,37 nm para SelB.GTP e R <sub>g</sub> = 4,82 nm para SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .	<b>106</b>
Figura 37 -	Comparação das curvas <i>p(r)</i> para a proteína SelB e para o complexo SelB.tRNA <sup>Sec</sup> , ambos em condições saturantes de GTP. É possível verificar um aumento na distância máxima devido a interação com	

	tRNA <sup>Sec</sup> .	106
Figura 38 -	Superposição do modelo proposto pelo programa I-TASSER (Zhang Lab) ao envelope gerado pelo DAMMIF: a) e b) Modelo para SelB.GTP; c) e d) Modelo para SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> . Os envelopes resultantes foram alinhados às estruturas modelo por meio do programa SUPCOMB.	108
Figura 39 -	Cristais obtidos nas condições descritas pela Tabela 12. A numeração das imagens corresponde à numeração da tabela.	110
Figura 40 -	Modelagem computacional por homologia para SerRS. a) Estrutura cristalográfica tomada como referência: SerRS de <i>A. aeolicus</i> (PDB ID: 2DQ3), b) Modelo de dímero gerado pelo I-TASSER (Zhang Lab) para SerRS, c) Visualização da superfície eletrostática do modelo gerado; d) Gráfico de Ramachandram indicando 85,0% dos resíduos do modelo em regiões favoráveis.	111
Figura 41 -	Processo de obtenção de <i>serRS</i> em cepa de expressão: a) Amplificação a partir de DNA genômico de <i>E. coli</i> ; b) Confirmação da ligação de <i>serRS</i> no vetor de propagação pJET1.2/blunt por meio da digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Fermentas); c) Confirmação da ligação de <i>serRS</i> no vetor de expressão pET32(a) por meio da digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Fermentas).	113
Figura 42 -	Purificação de SerRS: 1) Marcador Molecular. Indução por 3 h: 2) Vazio; 3) Precipitado; 4) Sobrenadante; 5) Extrato Bruto; 6) Fração não interagente com a coluna; 7) Lavagem da coluna com 10 mM de imidazol; 8) Eluição com 100 mM de imidazol; 9) Vazio. Indução por 18 h: 10) Precipitado; 11) Sobrenadante; 12) Extrato Bruto; 13) Fração não interagente com a coluna; 14) Lavagem com 10 mM de imidazol; 15) Eluição com 100 mM de imidazol.	113
Figura 43 -	Purificação de SerRS após digestão da cauda de tiorredoxina: a) 1) Marcador molecular; 2) Resultado da digestão: proteína digerida e proteína não-digerida. b) Cromatograma de exclusão molecular em coluna <i>Superdex 75 10/300</i> (GE) acoplada ao sistema <i>ÅKTA</i> (GE) para a purificação de SerRS após a digestão, mas sem o segundo passo de cromatografia de afinidade c) Cromatograma de exclusão molecular para obtenção de SerRS após a digestão e após o segundo passo de cromatografia de afinidade.	115
Figura 44 -	Ensaio de <i>Western Blot</i> para o monitoramento da digestão da cauda de tiorredoxina: 1) Marcador molecular; 2) Vazio; 3) Sobrenadante; 4) Precipitado; 5) Fração não interagente com a coluna; 6) Lavagem com 10 mM de imidazol; 7) Eluição com 100 mM de imidazol; 8) Resultado da digestão; 9) Fração não interagente com a coluna; 10) Lavagem com 10 mM de imidazol; 11) Eluição com 100 mM de imidazol; 12) Após cromatografia de exclusão molecular em coluna	

	<i>Superdex 75 10/300 (GE) acoplada ao sistema ÅKTA (GE).</i>	<b>116</b>
Figura 45 -	Monitoramento da estabilidade térmica de SerRS por CD: a) espectros de CD para experimento de variação térmica (VT-CD) de SerRS. b) monitoramento dos mínimos de CD em 222 nm e 208 nm indicando valores de temperatura de <i>melting</i> calculados de $(54,4 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$ e $(54,3 \pm 0,6) ^\circ\text{C}$ , respectivamente.	<b>117</b>
Figura 46 -	Experimento de fluorescência intrínseca dos resíduos aromáticos de SerRS em função da adição de ligantes. Pode-se verificar a diminuição dos espectros de emissão devido à interação com ATP.	<b>118</b>
Figura 47 -	Ensaio de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência para a formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA <sup>Sec</sup> em função da adição de ligantes.	<b>119</b>
Figura 48 -	Imagens de contraste de negativo para SelA e SelA.tRNA <sup>Sec</sup> previamente publicados. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo para SelA. b) (esquerda) Classe do estado não ligado de SelA, (direita) Complexo binário SelA.tRNA <sup>Sec</sup> .	<b>121</b>
Figura 49 -	Imagens do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA <sup>Sec</sup> por microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo. a) e b) Visualização do complexo ternário onde é possível observar que o interior da proteína SelA é preenchida pelos parceiros de interação SerRS e tRNA <sup>Sec</sup> .	<b>121</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -	Condições da reação de amplificação para o gene <i>selC</i> de <i>Escherichia coli</i> .	<b>48</b>
<b>Tabela 2</b> -	Condições da reação de transcrição <i>in vitro</i> para o tRNA <sup>Sec</sup> de <i>E. coli</i> .	<b>49</b>
<b>Tabela 3</b> -	Reação de amplificação do gene <i>serRS</i> de <i>E. coli</i> .	<b>58</b>
<b>Tabela 4</b> -	Reação de ligação ao pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific).	<b>59</b>
<b>Tabela 5</b> -	Valores de temperatura de <i>melting</i> calculados pelo ajuste de <i>Boltzmann</i> a partir do monitoramento de CD <sub>268nm</sub> .	<b>84</b>
<b>Tabela 6</b> -	Quantidades de RNAs presentes após o processo de purificação quantificados por Qubit..	<b>88</b>
<b>Tabela 7</b> -	Constantes de interação para a formação de complexos do tipo SelB.tRNAs mutantes	<b>96</b>
<b>Tabela 8</b> -	Valores de constantes biofísicas calculadas para as soluções das Equações de <i>Lamm</i> pelo programa SEDFIT.	<b>98</b>
<b>Tabela 9</b> -	Valores de constantes de dissociação para formação de complexos obtidos pelo SEDPHAT.	<b>100</b>
<b>Tabela 10</b> -	Constantes biofísicas obtidas para a proteína SelB e formação de complexos com tRNAs.	<b>104</b>
<b>Tabela 11</b> -	Parâmetros estruturais obtidos para as análises de SAXS.	<b>107</b>
<b>Tabela 12</b> -	Principais condições na obtenção do crescimento de cristais.	<b>109</b>

**Tabela 13** - Experimento de anisotropia de fluorescência em função da adição de ligantes.

**115**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Ângstron
ACN	Acetonitrila
AMP	Adenosina Monofosfato
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CD	Dicroísmo Circular
CsdB	Selenocisteína Liase
CTP	Citidina Trifosfato
Cys	Cisteína
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
EDTA	Ácido Tilenodiamino Tetra-Acético
EF	Fator de Elongação
FAS	Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência
GTP	Guanosina Trifosfato
GDP	Guanosina Difosfato
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IFS	Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Broth
MS	Espectrometria de Massa
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PBST	Tampão fosfato-salino com Tween-20
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
Sec	Selenocisteína
SEC	Comatografia por Exclusão Molecular
SECIS	Sequência Específica de Incorporação de Selenocisteínas

SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de Sódio de Poliacrilamida
SelA	Selenocisteína Sintase
SelC	Selenocisteína-tRNA <sup>Sec</sup>
SelD	Selenofosfato Sintetase
Ser	Serina
SerRS	Seril-tRNA Sintetase
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
PPi	Pirofosfato Inorgânico
tRNA	RNA Transportador
tRNA <sup>Sec</sup>	tRNA de Inserção de Selenocisteínas
VT	Varição Térmica
UTP	Uridina Trifosfato



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO À VIA DE INCORPORAÇÃO DE SELENOCISTEÍNAS EM BACTERIA</b>	
1.1	Selenoproteínas.....	27
1.2	Selenocisteínas: Biossíntese e incorporação em selenoproteínas.....	27
1.3	O tRNA específico (tRNA <sup>Sec</sup> ) .....	30
1.4	Importância de Seril tRNA-Sintetase na aminoacilação do tRNA <sup>Sec</sup> .....	32
1.5	Formação do Sec-tRNA <sup>Sec</sup> maduro pela ação da Selenocisteína Sintase (SelA)....	35
1.6	Fator de alongação específico para selenocisteínas.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
2.1	Objetivos gerais.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
<b>3</b>	<b>TÉCNICAS E METODOLOGIA</b>	
3.1	Análises bioinformáticas.....	43
3.1.1	Análise Bioinformática para o Fator de Elongação Específico (SelB).....	43
3.1.2	Análise Bioinformática para Seril-tRNA Sintetase (SerRS).....	44
3.2	Obtenção de tRNAs.....	44
3.2.1	Amplificação do gene do tRNA específico ( <i>selC</i> ) e das diferentes construções do tRNA <sup>Sec</sup> .....	44
3.2.2	Transcrição do gene do tRNA específico ( <i>selC</i> ) e tRNAs mutantes.....	48
3.2.3	Marcação covalente dos tRNAs com reagentes fluorescentes.....	49
3.3	Monitoramento do enovelamento dos tRNAs por Dicroísmo Circular (CD).....	49
3.4	Obtenção da Proteína SelA.....	52
3.5	Expressão e purificação do Fator de Elongação específico SelB.....	53
3.5.1	Determinação da presença de RNAs endógenos.....	55
3.5.2	Quantificação de GTP endógenos.....	56
3.6	Obtenção de SerRS.....	56

3.6.1	Amplificação e clonagem de <i>serRS</i> .....	57
3.6.2	Expressão e purificação de SerRS.....	59
3.6.3	Confirmação por <i>Western Blot</i> .....	62
3.7	Análise de Dicroísmo Circular para as proteínas SelB e SerRS.....	62
3.8	Fluorescência Intrínseca dos resíduos aromáticos.....	63
3.9	Ensaio de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência.....	63
3.10	Experimentos de Ultracentrifugação Analítica para a formação do complexo SelB.GTP.tRNA.....	67
3.10.1	Experimento de Velocidade de Sedimentação.....	69
3.10.2	Experimento de Equilíbrio de Sedimentação.....	70
3.11	Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética qualitativa em condições nativas.....	71
3.12	Ensaio de estabilidade térmica de SelB por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	72
3.13	Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) de SelB e complexos.....	73
3.14	Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (NS-EM) para a formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA <sup>Sec</sup> .....	75
3.15	Ensaio de Cristalização da proteína SelB.....	76
<b>4</b>	<b>ANÁLISE DO tRNA<sup>Sec</sup></b>	
4.1	Obtenção do tRNA específico (tRNA <sup>Sec</sup> ) e seus mutantes.....	79
4.1.1	Amplificação e transcrição do tRNA específico, tRNA <sup>Sec</sup> .....	79
4.1.2	Amplificação e transcrição dos tRNAs mutantes.....	79
4.2	Análise do enovelamento de tRNAs por Dicroísmo Circular.....	80
<b>5</b>	<b>ANÁLISE BIOFÍSICA DE SelB E SEUS COMPLEXOS</b>	
5.1	Análise Bioinformática – SelB.....	84
5.2	Obtenção do Fator de Elongação Específico (SelB) .....	86
5.2.1	Expressão e purificação do Fator de Elongação SelB.....	89
5.2.2	Quantificação da presença de nucleotídeos endógenos.....	88
5.2.3	<i>Western Blot</i> para SelB.....	89
5.2.4	Comparação das cepas de expressão de SelB por Dicroísmo Circular (CD).....	90
5.2.5	Determinação de nucleotídeos endógenos e quantificação do consumo de GTP por HPLC.....	92
5.3	Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca para SelB.....	93

5.4	Interação por Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência.....	93
5.5	Análise de Ultracentrifugação Analítica.....	97
5.5.1	Análise de Velocidade de Sedimentação.....	97
5.5.2	Análise de Equilíbrio de Sedimentação.....	99
5.6	Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética qualitativa em condições nativas.....	101
5.7	Análise da estabilidade térmica de SelB por DSC.....	103
5.8	Análises de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo.....	105
5.9	Testes de Cristalização da proteína SelB.....	108
<b>6</b>	<b>ANÁLISE DA PROTEÍNA SerRS DE <i>Escherichia coli</i></b>	
6.1	Análise Bioinformática da proteína SerRS.....	111
6.2	Obtenção de SerRS.....	112
6.2.1	Amplificação e clonagem de <i>serRS</i> .....	112
6.2.2	Expressão e purificação de SerRS.....	113
6.2.3	Monitoramento da purificação de SerRS por <i>Western Blot</i> .....	115
6.3	Análises de Dicroísmo Circular para SerRS.....	116
6.4	Monitoramento da emissão de fluorescência de resíduos aromáticos de SerRS por Fluorescência Intrínseca.....	117
6.5	Ensaio de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência para interação de SerRS com ligantes.....	118
6.6	Visualização de complexos por Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo.....	120
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	
7.1	Conclusões.....	123
7.2	Perspectivas.....	125
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>127</b>
	<b>ANEXO 1 CURVAS EXPERIMENTAIS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA.....</b>	<b>135</b>
	<b>ANEXO 2 <i>The specific elongation factor to selenocysteine incorporation in Escherichia coli: unique tRNA<sup>Sec</sup> recognition and its interactions</i>.....</b>	<b>139</b>
	<b>ANEXO 3 <i>The selenocysteine incorporation pathway in Escherichia</i></b>	

*coli*..... 179

# 1 INTRODUÇÃO À VIA DE INCORPORAÇÃO DE SELENOCISTEÍNAS EM BACTERIA

## 1.1 Selenoproteínas

O Selênio (Se) é um micronutriente essencial para diversas formas de vida, de bactérias a mamíferos. A inserção de Selênio em proteínas pode ocorrer de forma pós-traducional como um cofator dissociável, esta forma rara de selênio associado a proteínas é encontrada apenas em proteínas bacterianas que também podem conter molibdênio (Mo).(1) Entretanto, a principal forma biológica de selênio é como o aminoácido selenocisteína.(2-3) As selenoproteínas, como são conhecidas as proteínas que possuem este aminoácido, estão envolvidas em processos metabólicos muito diversos e apresentam características únicas, possivelmente vantajosas em relação às cisteínas devido a diferenças significativas de pKa e reatividade quando comparadas ao enxofre, por exemplo.(4)

Selenoproteínas bacterianas geralmente estão envolvidas em processos catabólicos que utilizam o selênio como catalisador de reações de redução-oxidação (redox), enquanto que em eucariotos, estas proteínas participam de processos anabólicos e antioxidantes, o que sugere origem independente dos selenoproteomas procarióticos e eucarióticos.(4-5)

Finalmente, pode-se verificar a presença de compostos que possuem selênio e que são isólogos de compostos sulfurados, uma vez que determinadas enzimas do metabolismo de enxofre não diferenciam esses elementos. A incorporação de selênio pode ocorrer em aminoácidos formando selenometionina e selenocisteína, sendo incorporados, não especificamente, em proteínas no lugar de metioninas e cisteínas, embora a taxa de incorporação destes isólogos seja proporcional à quantidade ingerida do elemento durante a alimentação e também pode estar relacionada à toxidez por selênio verificada em regiões com solo rico neste composto.(6-7)

## 1.2 Selenocisteínas: Biossíntese e incorporação em selenoproteínas

A selenocisteína (Sec, U), também denominada como o vigésimo primeiro aminoácido, é a principal forma ativa do selênio e participa do sítio catalítico de várias enzimas. Uma complexa maquinaria molecular é necessária para sua biossíntese e posterior incorporação em um códon interno UGA em fase no RNA mensageiro (mRNA).(5)

Para a incorporação deste aminoácido raro em proteínas são necessárias várias

macromoléculas (Figura 1): um elemento estrutural em forma de grampo no RNA mensageiro denominado como Sequência Específica de Incorporação de Selenocisteínas (SECIS), um tRNA específico para incorporação de selenocisteínas (SelC, tRNA<sup>Sec</sup>), proteínas relacionadas à aminoacilação do tRNA tais como Seril-tRNA Sintetase (SerRS) e Selenocisteína Sintase (SelA). Além destas, também são necessárias proteínas auxiliares denominadas de proteínas de interação ao elemento SECIS (SelB e SBP2, a última presente somente no metabolismo de eucariotos e ainda não identificada em *Archaea*).<sup>(8)</sup>

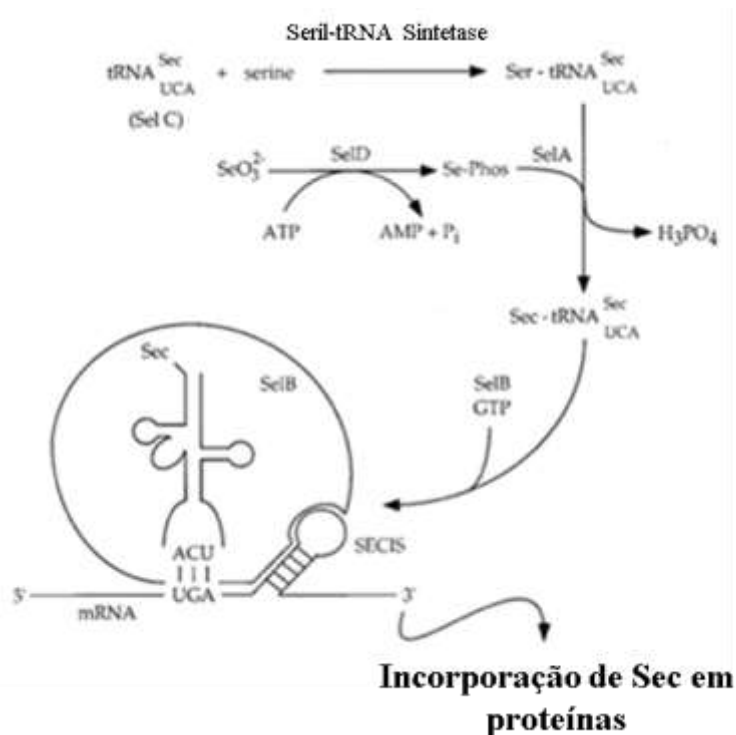


Figura 1 – Mecanismo de incorporação de selenocisteínas, em Bactérias, em fase com um códon UGA, localizado no interior do gene. A figura exemplifica o RNA mensageiro contendo um códon UGA em fase. O elemento SECIS corresponde à estrutura secundária adquirida pelo RNA mensageiro e ao qual a maquinaria de incorporação de Sec se liga.

Fonte: Adaptada de FORCHHAMMER; BÖCK.<sup>(9)</sup>

O mRNA de selenoproteínas possui características únicas, a primeira delas é a presença do códon UGA, geralmente um códon de parada, interno à região codificante e em fase de leitura. A estrutura em forma de alça na região 3' deste mRNA corresponde ao SECIS, que atua no reconhecimento deste códon como um sinal de inserção de Sec (Figura 1).<sup>(9-10)</sup>

O RNA transportador específico para a incorporação de Sec denominado tRNA<sup>Sec</sup> (SelC), possui o anticódon UCA decodificando o códon UGA no mRNA e é aminoacilado inicialmente com serina pela Seril-tRNA sintetase (SerRS). Os demais tRNAs apresentam características estruturais distintas comparado ao tRNA<sup>Sec</sup> (Figura 2) como o tamanho da extensão do braço variável e o número de ribonucleotídeos pertencentes ao dobramento entre

o braço aceptor e T $\psi$ C. Recentemente, foi verificado por criomicroscopia que o braço variável também serve como ponto de reconhecimento de SelB.(11) Portanto, este tRNA não é reconhecido pela maquinaria convencionalmente utilizada que adiciona tRNAs aminoacilados ao peptídeo nascente pela via ribossomal.(9)

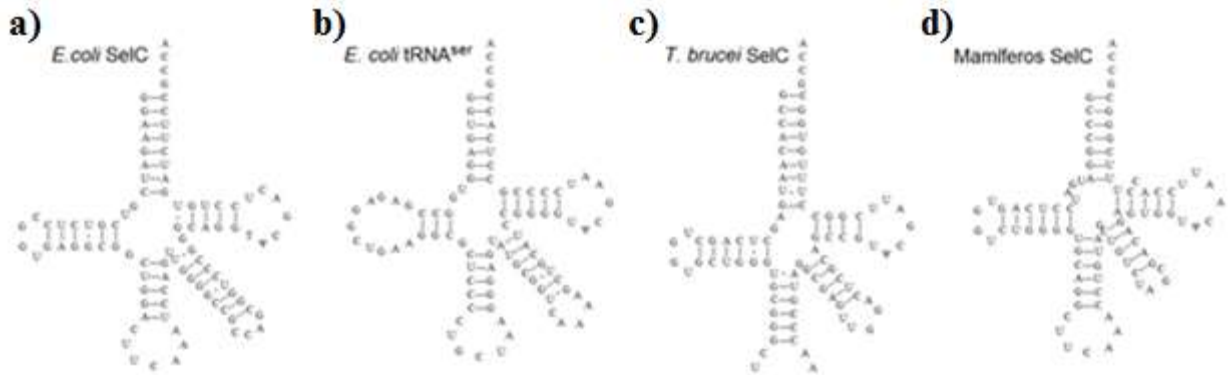


Figura 2 – Alguns exemplos de tRNAs. a) SelC de *Escherichia coli*; b) Trna<sup>Ser</sup> de *Escherichia coli*; c) tRNA<sup>Sec</sup> de *Trypanosoma brucei*; d) tRNA<sup>Sec</sup> de Mamíferos.

Fonte: Adaptada de ZHANG et al.(5)

As estruturas do domínio de interação ao SECIS dos organismos *M. maripaludis* (12) e *Moorella thermoacetica* (13) foram determinadas por cristalografia de raio-X (Figura 3 e 4, respectivamente), sendo construções truncadas que apresentam 30% de identidade com o domínio C-terminal de SelB de *E. coli*.

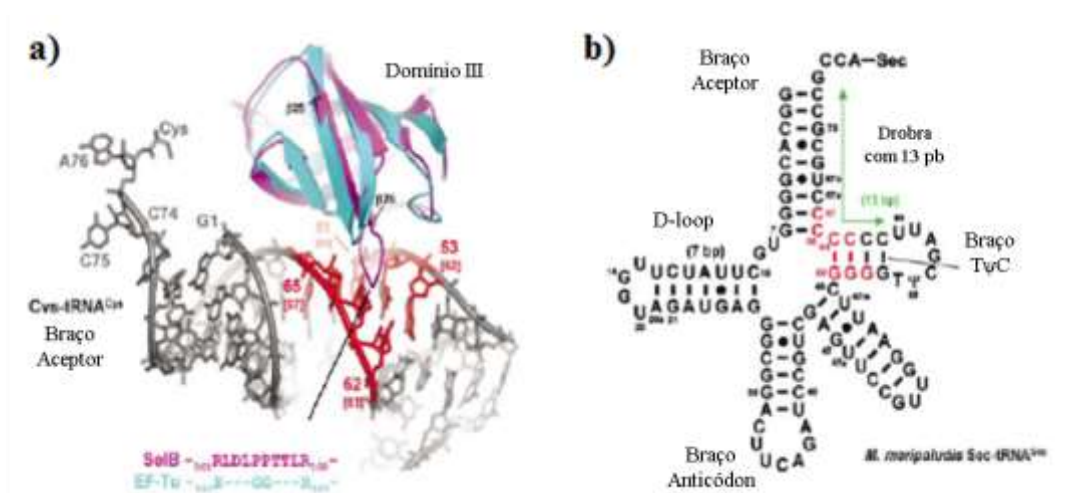


Figura 3 – Interfaces de de reconhecimento a nucleotídeos e ao tRNA<sup>Sec</sup> : a) Estrutura cristalográfica de SelB de *M. maripaludis* em complexo com GDP a 3,0 Å de resolução. b) Possíveis regiões de contatos entre o tRNA<sup>Sec</sup> com SelB de *M. maripaludis*.

Fonte: Adaptada de LEIBUNDGUT et al.(12)

A compreensão do domínio de interação ao fragmento SECIS permitiu a especulação sobre o posicionamento correto desse fator de elongação no ribossomo, durante o processo de

transcrição, de maneira a levantar hipóteses de interações e as variáveis que permitem a montagem desse complexo transiente.(11)

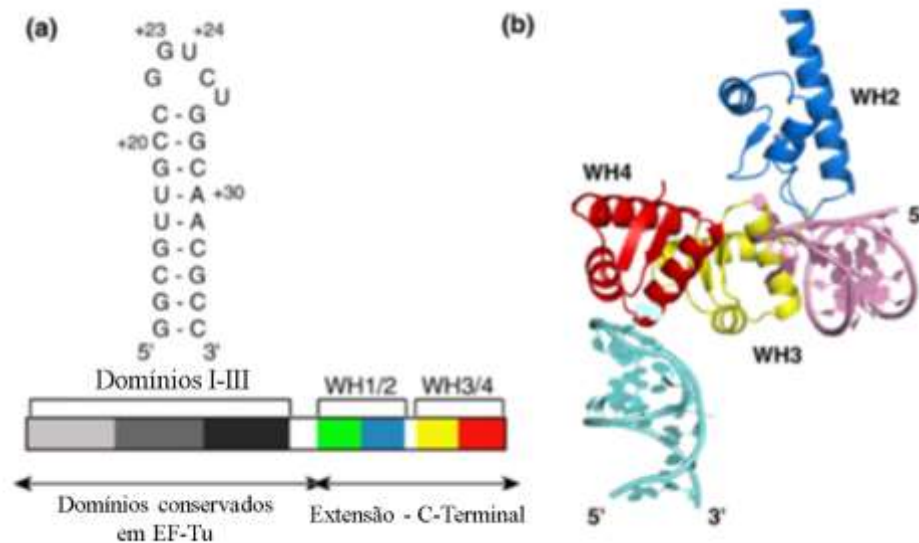


Figura 4 – Reconhecimento ao SECIS: a) Definição do elemento SECIS e da construção utilizada para a expressão do domínio SelB de interação a esse fragmento. b) Estrutura resolvida a 2,0 Å de resolução do domínio de interação ao SECIS ligado a uma dupla de fragmentos pelo excesso estequiométrico utilizado para as condições de cristalização, portanto, não sendo possível determinar qual das duas interfaces é a fidedigna.

Fonte: Adaptada de SOLER; FOURMY; YOSHIZAWA.(13)

Como o tRNA<sup>Sec</sup> específico não é abundante na célula,(9) os mecanismos de entrega e recepção desse tRNA aminoacilado com o resíduo de selenocisteína nos ribossomos devem ser sincronizados, e não simplesmente eventos aleatórios. Dessa maneira, no decorrer da via de incorporação deverá ocorrer a interação entre SelA e SelB para a entrega de tRNA<sup>Sec</sup> carregado com Sec (primeira etapa) e, posteriormente, a interação entre SelB-tRNA<sup>Sec</sup> com o ribossomo (segunda etapa) para a incorporação do aminoácido no polipeptídeo nascente. Esses eventos são dependentes de interações com GTP, na primeira etapa, e com o elemento SECIS na segunda etapa, já parcialmente caracterizados na literatura. (9,12-13).

### 1.3 O tRNA específico (tRNA<sup>Sec</sup>)

O tRNA específico para inserção de selenocisteínas, tRNA<sup>Sec</sup> é o produto gênico do gene *selC*. O tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli* possui 95 ribonucleotídeos (14) e sua estrutura secundária possui diversas diferenças se comparada à estruturas de tRNAs canônicos. As posições de 8-14 do tRNA<sup>Sec</sup> permanece conservada entre tRNA<sup>Sec</sup> e os demais tRNAs canônicos de *E. coli*, mas em tRNA<sup>Sec</sup> são ocupados por ribonucleotídeos distintos. Enquanto em tRNAs



canônicos de *E. coli* possuem 7 pares de bases no braço acceptor e 3 ou 4 pares de bases no braço D dos quais de 8 a 10 ribonucleotídeos são desapareados, o tRNA<sup>Sec</sup> possui o braço acceptor estendido em 1 par de base e o D-loop possui 6 bases pareadas resultando na redução do número de bases desapareadas para 4. (14)

Além disso, tRNA<sup>Sec</sup> é o tRNA mais longo em *E. coli*,(9) em especial devido ao braço variável extra. O tamanho da extensão do braço variável é utilizado como ferramenta de classificação dos tRNAs em dois tipos, os de classe I e os de classe II. Os tRNAs de classe I possuem 4 ou 5 ribonucleotídeos compondo o braço variável, já os de classe II possuem entre 10 a 24 ribonucleotídeos. Os tRNAs de Tipo II, tais como tRNA<sup>Ser</sup> e tRNA<sup>Leu</sup>, possuem um braço variável longo, no entanto a sua estrutura de folhas de trevo conservada '7 + 5' difere da estrutura secundária '8 + 5' do tRNA<sup>Sec</sup>.(14-15) Além disso, o braço de dihidrouridina de *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> (braço D) é composto por uma haste de 6 pb e uma alça de 4 nucleotídeos, em contraste com os 3-4 pb pertencente à alça e dos 7-12 nucleotídeos pertencentes ao loop da estrutura do braço D de tRNAs canônicos. A análise da sua estrutura primária e secundária também revela uma guanina na posição 8 e um adenosina na posição 14, um par de bases pirimidina-purina nas posições 10-25 e um par de bases purina-pirimidina nas posições 11-24. Todas as outras moléculas de tRNA de *E. coli* apresentam uma interação terciária G15:C48 ou A15:U48 conhecida como os pares de bases de Levitt que estabilizam a interação de empilhamento das hastes D e TΨC, por isso ausentes no *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup>.(9,14-15)

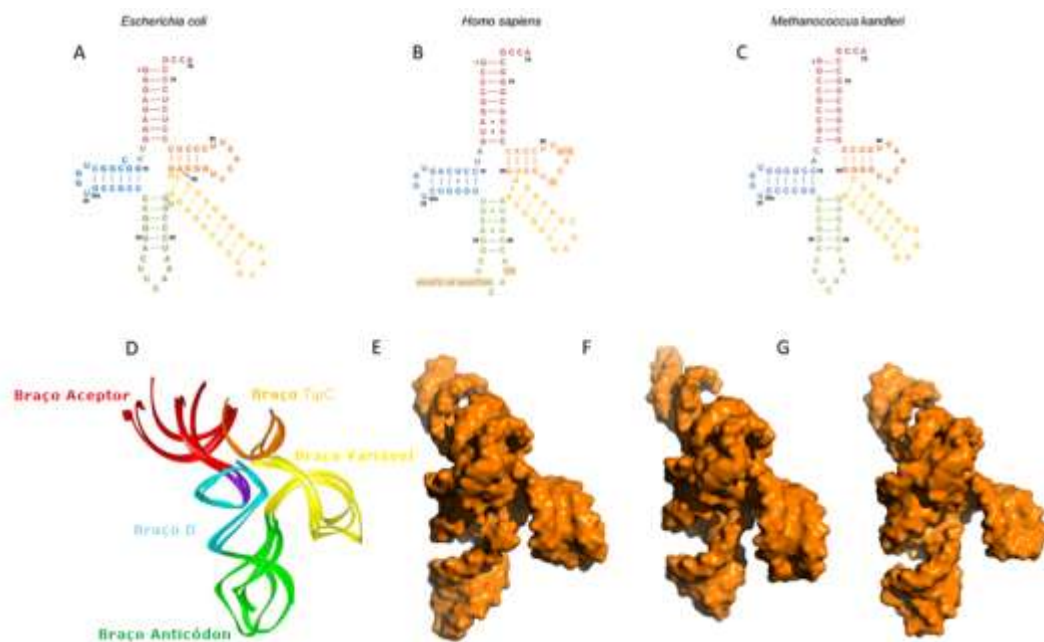


Figura 5 – Estruturas comparativas de tRNA<sup>Sec</sup> de (a) e (e) Bactérias (*Escherichia coli*), (b) e (f) Eucariotos (*Homo sapiens*) e (c) e (g) *Archaea* (*Methanococcus kandleri*). Em (a) e (c) é mostrado a representação esquemática da estrutura do tRNA<sup>Sec</sup>. Em (e) a (g) o modelo estrutural do tRNA<sup>Sec</sup> correspondente. d) domínios representativos da estrutura de tRNA<sup>Sec</sup>.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As moléculas de tRNA canônicas contêm 75 nucleotídeos em média e formam um núcleo terciário de pares de bases U8:A14, purina 15: pirimidina 48 conservados e triplas de base de haste D adicionais entre as posições 45:10:25, 12:23:9 e 13: 22:46 (ou 12: 23: 9 para um tRNA com o braço extra longo).(16) Por outro lado, o núcleo terciário tRNA<sup>Sec</sup> de bactérias é composto pelos pares de bases tríplexes G14:C21:U8 e C15:G20a:G48 que contribuem para manter sua estrutura geral.(16) Dados bioquímicos recentes mostraram que esses pares de bases adicionais na braço D não são necessários para a função tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*, exceto em altas temperaturas.(17) No entanto, Ishii e colaboradores argumentaram que a flexibilidade da estrutura tRNA<sup>Sec</sup> terciária é essencial para a sua função e seria útil para a acomodação simultânea do anel anticódon e do CCA terminal em locais adequados na superfície do ribossomo,(17) o que posteriormente foi confirmado por estruturas de criomicroscopia eletrônica de transmissão por Fischer e colaboradores.(11)

A estrutura das moléculas tRNA<sup>Sec</sup> eucarióticas de humanos e camundongos,(18-20) além do tRNA<sup>Sec</sup> de arqueias como *Methanococcus maripaludis* foram resolvidas.(21) A principal diferença entre o tRNA<sup>Sec</sup> eucariótico e o de arqueia comparado ao tRNA<sup>Sec</sup> de bactéria (Figura 5) é o dobramento entre o braço acceptor e o braço TψC. No caso de eucariotos, o tRNA<sup>Sec</sup> possui o dobramento do tipo '9 + 4' entre o braço acceptor e o TψC em bactérias o dobramento é do tipo '8 + 5', e como já mencionado, os tRNAs canônicos de *E. coli* possuem o dobramento entre o braço acceptor e o TψC do tipo '7 + 5' (Figura 5).(9,18, 21) É surpreendente que a estrutura geral dessas moléculas tRNA<sup>Sec</sup> sejam semelhantes, uma vez que suas estruturas primária e secundária são divergentes.(20) A conservação da conformação do braço D, a interação dos laços D-TψC, o comprimento total do braço aceitador-TψC e a orientação do braço extra longo contribuem para essa similaridade.(16,20)

#### **1.4 Importância de Seril tRNA-Sintetase na aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup>**

O primeiro passo da incorporação de Sec é a aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup>. Diferentemente de outros aminoácidos canônicos, Sec não possui uma enzima aminoacil-tRNA sintetase (aaRS) específica. Apesar de as aaRS apresentarem função e enovelamento extremamente conservados quando comparado a vários organismos, o que auxilia a compreensão de mecanismos de reação e bioquímica destas enzima nos diferentes domínios, elas possuem características de reconhecimento únicos em cada domínio estudados.

As aminoacil-tRNA sintetases compõem uma família de proteínas essenciais para o processamento de tRNAs durante o processo de tradução proteica.(22) Estas aminoacil

catalizam a esterificação de um específico aminoácido ao seu tRNA correspondente, formando um aminoacil-tRNA. Esta reação é mediada por meio da ligação de uma molécula de ATP e o correspondente aminoácido, formando aminoacil-adenilato. Em sequência, o complexo adenilato-aaRS interage à molécula de tRNA correspondente, e o aminoácido é então transferido do aa-AMP para a extremidade 2'-OH ou 3'-OH do tRNA receptor. Algumas aminoacil-tRNA sintetases também realizam a reação de *proofreading*, que consiste na revisão do tRNA ligado à enzima por meio de alterações conformacionais às custas de ATP, assegurando assim o correto carregamento do tRNA.(22)

As aminoacil-tRNA sintetases podem ser classificadas em dois grupos (Classe I e Classe II) devido ao domínio central catalítico, o que acarreta em diferenças na reação de aminoacilação. As aaRS de classe I possuem o domínio central catalítico do tipo *Rossmann fold*, comum em domínios relacionados com ligação a nucleotídeos (23-24) e tem como característica a aminoacilação da extremidade 2'-OH da ribose do tRNA. Os aminoácios dependentes de enzimas aminoacil de classe I são: Arg, Cys, Gln, Glu, Ile, Leu, Met, Trp, Tyr e Val. Já as aaRS de Classe II possuem o domínio central catalítico altamente conservado formado por folhas betas antiparalelas conectadas por alfa-hélices,(23) e aminoacilam a porção 3'-OH do tRNA. As aaRS de Classe II são responsáveis por carregarem tRNAs com: Ala, Asn, Asp, Gly, His, Lys, Pro, Phe, Ser e Thr.(23)

A enzima dimérica Seril-tRNA sintetase (SerRS, EC 6.1.1.11) é responsável pelo reconhecimento específico de tRNA<sup>Sec</sup>. A Seril-tRNA sintetase de *E.coli* é uma enzima de Classe II que possui 430 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 48 kDa. Esta enzima realiza o processo de aminoacilação do tRNA<sup>Ser</sup>, e além disto, também participa integralmente na via de incorporação de selenocisteínas por ser responsável pela aminoacilação de tRNA<sup>Sec</sup> com serina, formando Ser-tRNA<sup>Sec</sup>.

A aminoacilação de tRNA<sup>Sec</sup> ocorre em dois passos: ativação por adenilação e transferência do grupo aminoacil para o tRNA específico. O primeiro passo desta aminoacilação do tRNA é realizado pela formação do intermediário L-seril-adenilato que é um anidrido misto no qual o grupo carboxil do aminoácido está ligado ao grupo fosforilo de AMP, também sendo liberando pirofosfato inorgânico (PPi), reação esta catalizado pela SerRS na presença de ATP e Mg<sup>2+</sup>.(25-26) O segundo passo é a transferência do grupo L-seril para a extremidade 3'-OH do tRNA<sup>Ser</sup> ou tRNA<sup>Sec</sup> para formar L-seril-tRNA<sup>Ser</sup> ou L-seril-tRNA<sup>Sec</sup>.(11, 16,23-26)

Em geral, a interação de um tRNA canônico por sua aaRS específica se utiliza de dois pontos determinantes para o reconhecimento: o braço acceptor e o braço variável.(27) Desta

forma, o reconhecimento da enzima SerRS pelo seu correspondente tRNA independe da sequência do anticódon, o que torna possível com que SerRS tenha capacidade de interagir tanto com tRNA<sup>Ser</sup> como com tRNA<sup>Sec</sup>.(26-27)

Recentemente, a estrutura de SerRS humana foi determinada por difração de raios-X.(28) Wang e colaboradores determinaram que a interação específica de *H. sapiens* SerRS-tRNA<sup>Sec</sup> ocorre na porção N-terminal da proteína e nas regiões dos braços variáveis, acceptor, D-loop e o TΨC de tRNA<sup>Sec</sup>, diferentemente do que ocorre no reconhecimento de tRNAs canônicos. As duas  $\alpha$ -hélices longas constituídas por *coiled-coil* presentes na porção N-terminal são responsáveis pela ligação ao tRNA e fornecem um sítio catalítico flexível para o reconhecimento do tRNA e a sua aminoacilação. SerRS apresenta esta porção N-terminal conservada em todos os organismos com exceção de metanogênicos.(28) Observou-se que a interação de SerRS-tRNA<sup>Sec</sup> coexiste em solução a nas proporções de 2:1 e 2:2. Isso ocorre porque a proteína dimérica SerRS faz a maioria dos contatos com o braços variável e TΨC do tRNA<sup>Sec</sup> com um de seus monômeros, enquanto o braço acceptor interage com o outro monômero.(28)

A partir das determinações recentes das estruturas cristalográficas desta aminoacil-tRNA sintetase, é possível inferir a conservação do sítio de reconhecimento e do mecanismo de aminoacilação pela conservação de enovelamento de tRNA<sup>Sec</sup> e SerRS, incluindo as regiões de reconhecimento específico como o braço variável mais longo domínio N-Terminal, respectivamente.(26-28)

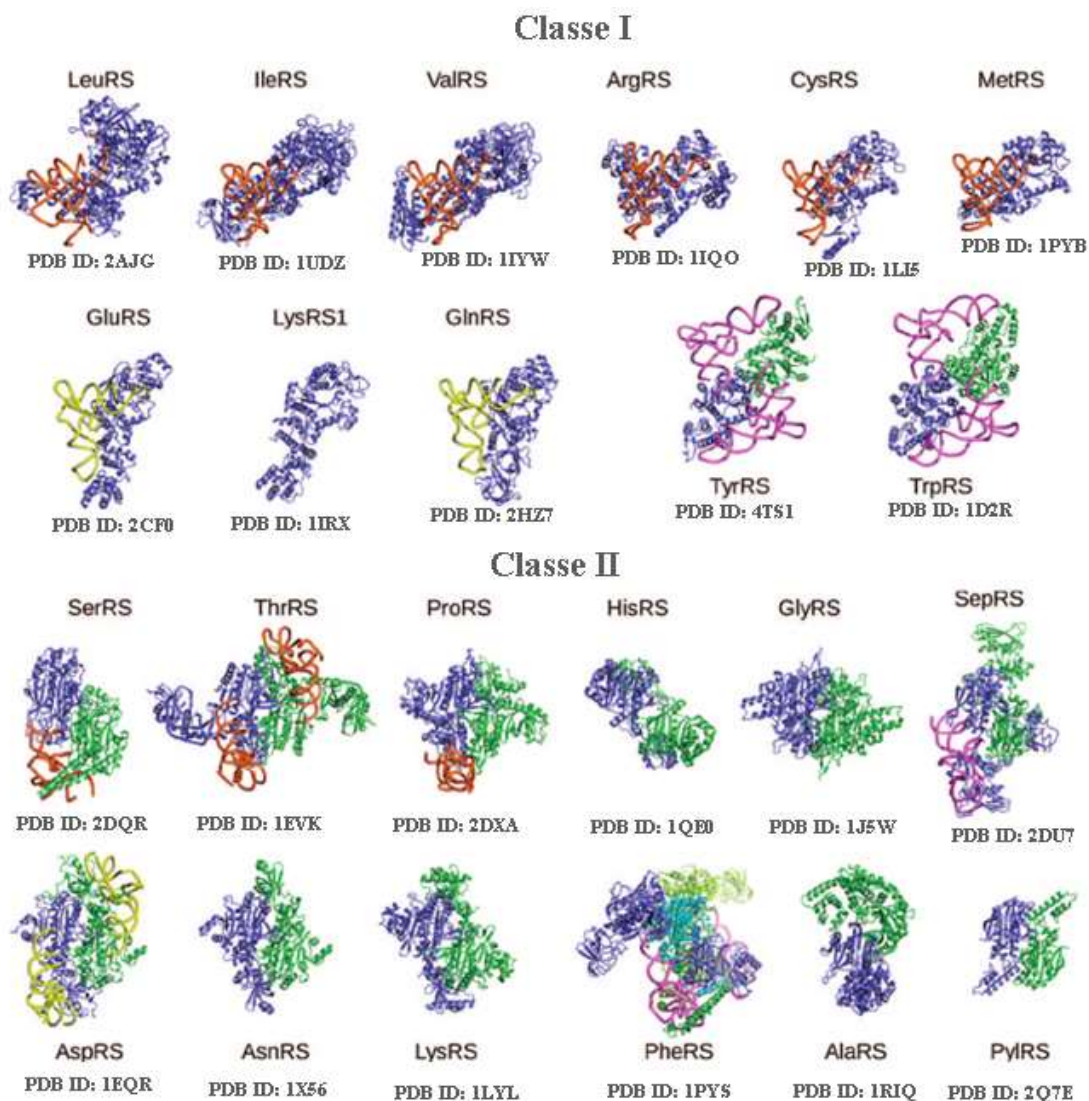


Figura 6 – Estrutura de aaRS. São apresentados as aminoacil tRNA-sintetases classificadas em ambas as classes. As aaRSs em cada classe são exibidas com o seu domínio catalítico na mesma orientação. A segunda subunidade de dímero (R2) é mostrada em verde. No caso do PheRS tetramérico (R2), um heterodímero (R) é mostrado em azul e o outro é mostrado em verde.

Fonte: Adaptada de TOUZÉ et al.(29)

### 1.5 Formação do Sec-tRNA<sup>Sec</sup> maduro pela ação da Selenocisteína Sintase (SelA)

A conversão do produto da SerRS L-seril em L-selenocistetil tRNA<sup>Sec</sup> na via de incorporação de selênio diverge nos diferentes domínios da vida.(30) Em bactérias, esta reação é catalizada pela proteína Selenocisteine Sintase (SelA, E.C. 4.2.1), uma enzima homodecamérica com ~ 500 kDa e dependente de piridoxal-5' fosfato (PLP).(30-31) Esta enzima foi previamente descrita na década de 1990 em *E. coli* (30,32) e participa da reação de conversão de Ser-Sec em duas etapas por meio do reconhecimento dos braços acceptor e D-loop do tRNA<sup>Sec</sup>. (31-32) O primeiro passo é a formação da base de Schiff entre o

grupo  $\alpha$ -amino da L-serina com o grupo formil de uma PLP ligada covalentemente no resíduo de lisina catalítica de SelA. Esta reação resulta na desidratação de Ser e na formação do estado intermediário denominado aminoacrilil-tRNA<sup>Sec</sup> covalentemente ligado a SelA (20,32) no braço acceptor. O segundo passo é a transferência de selênio por substituição nucleofílica, resultando na formação de selenocistetil-tRNA<sup>Sec</sup> ou Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, onde o selênio utilizado é liberado pela selenofosfato sintetase (SelD em procariotos ou SPS em eu cariotos, EC 2.7.9.3) na forma selenofosfato.(32-33) Em 2013 foi demonstrado por análises de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo que o heterocomplexo binário SelA-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> se dá na proporção de 1 SelA : 10 tRNA<sup>Sec</sup>.(32, 34)

### 1.6 Fator de alongação específico para selenocisteínas

O passo seguinte na via da selenocisteína após a síntese de Sec-tRNA<sup>Sec</sup> é a sua incorporação na cadeia polipeptídica nascente durante a tradução com o auxílio do fator de alongação específico.(35)

A entrega do tRNA aminoacilado ao sítio A do ribossomo depende de uma classe de proteínas GTPase chamada Fatores de Elongação.(36-38) O reconhecimento destas proteínas por tRNAs é extremamente eficiente e a entrega ao ribossomo é realizada numa taxa de 15 a 20 aminoácidos por segundo em procariotos e 2 aminoácidos por segundo em eucariotos.(38)

Em procariontes são conhecidos três fatores de alongação da tradução: EF-Tu, EF-Ts e EF-G. (39) O fator de alongação EF-Tu é responsável por mediar a entrada do tRNA aminoacilado no sítio A livre do ribossomo. O fator EF-Ts é responsável pela liberação dos EF-Tus do sítio A do ribossomo e realizam a reciclagem do GDP em GTP fornecendo o fator de troca de nucleotídeos de guanina para EF-Tu por meio da formação do complexo intermediário EF-Tu.GDP.EF-Ts.(40) Já o fator EF-G é responsável pelo passo de translocação da cadeia polipeptídica ao movimentar o ribossomo sobre o mRNA na direção 5'-3' quando o tRNA carregado é transferido para o sítio A do ribossomo.(39)

O fator de Elongação Específico para incorporação de Selenocisteínas em bactérias (SelB) é descrito pela literatura desde a década de 90.(41) Sua sequência contém 614 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 68,9 kDa. Sua estrutura pode ser dividida em três regiões de interação: a porção N-terminal que é altamente conservado como domínio com função GTPase em outros EFTu canônicos (denominada por Domínio I); região de reconhecimento ao Sec-tRNA<sup>Sec</sup> específico (constituída pelos Domínios II e III) e uma porção adicional que constitui a extremidade C-terminal responsável pelo reconhecimento do

elemento SECIS (denominada Domínio IV).(42)

A porção N-terminal de SelB compartilha semelhança de sequência com outros EF-Tu.(43) A porção N-terminal de SelB é composta por quatro  $\alpha$ -hélices: WHD1, WHD2, WHD3 e WHD4.(42) Esta região possui topologia  $\alpha/\beta$  e sofrem modificação conformacional durante a hidrólise de GTP na presença de magnésio.(44)

A região de interação SelB com o tRNA é a interface dos Domínios II e III. Esses domínios são responsáveis por interagir com os braços acceptor e T $\Psi$ C do tRNA específico, e apesar de sua especificidade, o dobramento é bem conservado em relação a outros EF-Tus com dois barris  $\beta$ .(45) Mukai e colaboradores demonstraram por meio da síntese de tRNAs mutantes que o reconhecimento de SelB depende apenas da sequência de ribonucleotídeos que consistem o braço acceptor e T $\Psi$ C do tRNA<sup>Sec</sup> quando na presença do elemento SECIS.(46)

Recentemente, a estrutura de SelB para o organismo *A. aeolicus* foi resolvida por Itoh e colaboradores por meio de cristalografia de raios-X (PDB ID: 4ZU9). De acordo com esta estrutura, é observado que o resíduo Arg198 (*Ec*Thr192) e Arg241 (*Ec*Arg235) no Domínio II interagem com o grupo tiol dos resíduos Cys e L-His229 (*Ec*His223) interagem com o grupo amino e tornam o Domínio II essencial para o reconhecimento do braço acceptor tRNA<sup>Sec</sup> enquanto o braço T $\Psi$ C é reconhecido pelo Domínio III (Figura 7). No entanto, existem exceções, como no reconhecimento das mitocôndrias EFs-tRNAs.(47-48)

Em solução, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> e SelB podem coexistir em diferentes conformações como recentemente elucidado por criomicroscopia por Fischer e colaboradores.(11) Foi demonstrado que a região flexível entre domínios III e IV de SelB gera uma alteração conformacional na porção de braço variável do Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, acomodando-o dentro de SelB. Deste modo, além do dobramento de '8+5' entre os braços acceptor e T $\Psi$ C, o braço variável também se apresentou essencial para a interação com SelB e assim a sua distinção entre outros tRNAs canônicos.(11,41,47) Além disso, a região de interação com tRNA é carregada positivamente, o que favorece a interação com o grupo selenol, ao contrário do que ocorre com Ser-tRNA<sup>Sec</sup>.(43, 47)

O domínio C-terminal de SelB possui um domínio extra (domínio IV), que reconhece o elemento estrutural SECIS no mRNA.(49-50) A estrutura deste único domínio bacteriano IV foi resolvida por cristalografia através da obtenção do complexo com o elemento SECIS (PDB ID: 2PLY). (13,53) Este domínio consiste em quatro motivos de alfa-hélices em tandem que são responsáveis pela interação ao SECIS.(41) O domínio IV é extremamente flexível e quando o domínio de ligação a GTP é ativado, o elemento SECIS é responsável pelo

reconhecimento do complexo ternário SelB-Sec-tRNA<sup>Sec</sup>-SECIS na subunidade 30S do ribossomo.

A interação SelB-GTP é estimulada pela presença do complexo ribossômico 70S e do elemento SECIS.(51) Experimentos termodinâmicas demonstraram que SelB tem maior afinidade ao GTP do que GDP, com um  $K_d$  de 0,7  $\mu\text{M}$  e 13  $\mu\text{M}$ , respectivamente.(52-53) A cinética de interação de SelB com guanosina, SECIS e Sec-tRNA<sup>Sec</sup> foram estudados, elucidando o mecanismo de ação da SelB em comparação com EF-Tu.

A estrutura de eEFSec de humanos foi elucidada por cristalografia de raios-X (PDB ID: 5IZK), em que também possui uma estrutura semelhante ao formato de cálice.(53) A partir deste estudo foi proposto que o mecanismo de interação para os fatores de alongação específicos para Sec-tRNA<sup>Sec</sup> ocorre por uma maneira diferente como ocorre para EF-Tu canônico. Ao contrário do que ocorre com outros EF-Tu, SelB intrigantemente tem constantes de afinidade semelhantes tanto à ligação a GTP quanto ao GDP. Através da estrutura por complexos de raios-X de eEFSec humana, observa-se que a porção D4 do eEFSec de mamífero é a porção que sofre alteração conformacional principal na presença de nucleotídeos de guanina. Este resultado surpreendente vai ao contrário do que se esperava, uma vez que não é este domínio responsável para a interação com nucleotídeos de guanina. Esta característica pode estar relacionada ao fato de que apenas no estado GTP ativado, a reação da hidrólise de GTP em GDP serve como regulação alostérica para que o Domínio IV possa reconhecer o SECIS.(53)



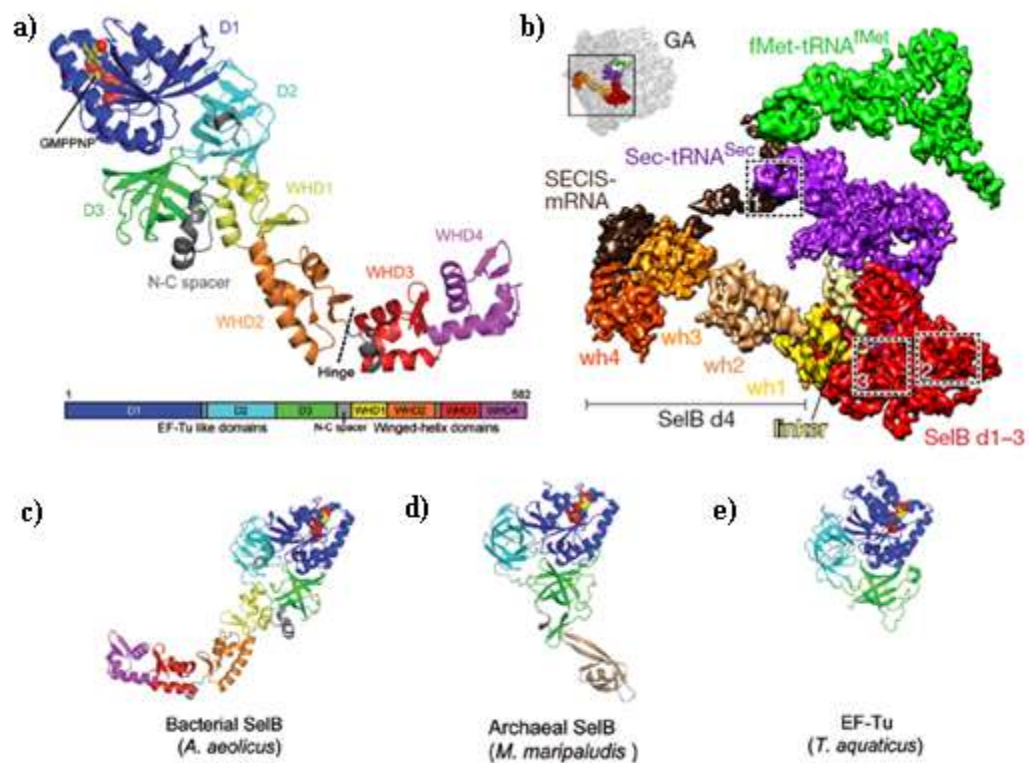


Figura 7 – Estruturas de fatores de Elongação já resolvidos. a) Representação da estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* indicando seus 3 domínios de ligação canônicos de EF-TUs e apresentando o domínio adicional presente apenas em bactérias; b) Estrutura do complexo SelB.GDPNP-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> na presença do elemento SECIS resolvida por criomicroscopia (PDB ID: 5LZD). GDPNP foi utilizado como análogo não hidrolisável de GTP. c) Estrutura cristalográfica de SelB de *A. aeolicus* (PDB ID: 4ZU9); d) Estrutura cristalográfica de SelB de *M. maripaludis* (PDB ID: 4ACB); e) Estrutura cristalográfica de EF-TU de *T. aquaticus* (PDB ID: 1EFT).

Fonte: Adaptada de FISCHER et al.(11)

Há 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.(11,47)

Inicialmente, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> forma o complexo ternário com SelB-GTP e só então com este complexo GTP ativado, é formado o complexo quaternário SelB.GTP.Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.(49-50) Desta maneira se completa a via de incorporação de selenocisteínas em Bacteria (Figura 6).

Nos domínios *Eukarya* e *Archaea*, o elemento SECIS ocorre na região não codificante do mRNA chamado 3'-UTR.(54) O fator de elongação Sec em *Eukarya* e *Archaea* não possuem esta extensão C terminal para o reconhecimento de SECIS como o domínio SelB

bacteriano IV, único com este domínio. Por este motivo, os eucariotos têm o reconhecimento do elemento SECIS mediado por uma proteína isolada, a SECIS binding protein 2 (SBP2).(54-55) Em *Archaea*, não foi identificado um ortólogo da SBP2, o homólogo mais próximo é a proteína ribossomal S30, embora não haja evidência conclusiva até agora.(56-57)

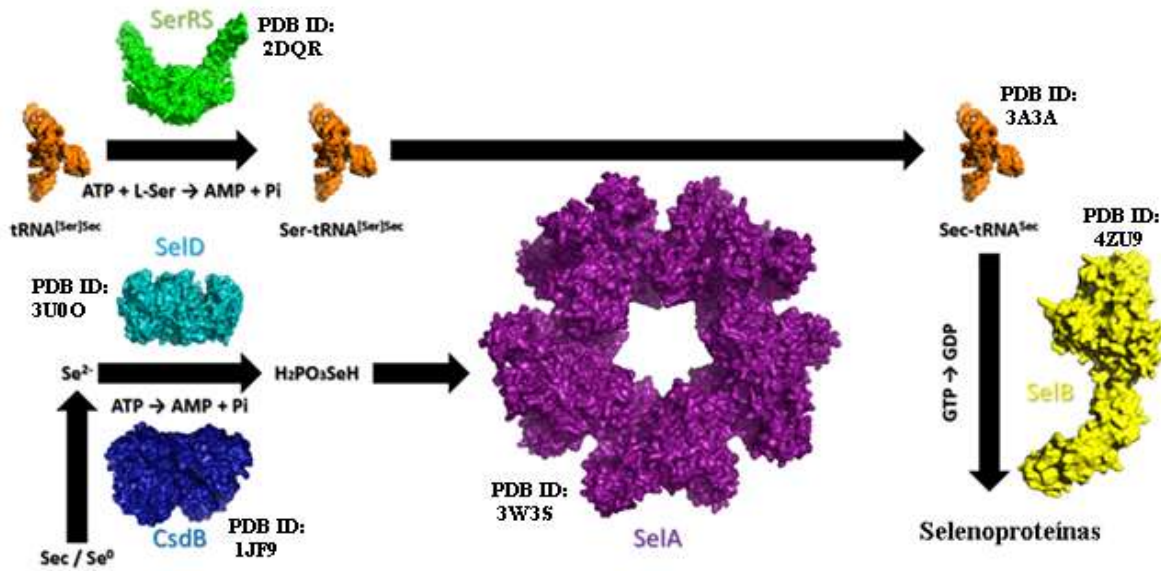


Figura 8 – A via de incorporação de Selenocisteínas em Bactéria.  
Fonte: Elaborada pelo autor.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Este projeto tem por objetivos principais a clonagem, expressão e purificação da Seril-tRNA Sintetase (SerRS), expressão e purificação do Fator de Elongação Específico para incorporação de selenocisteínas de *Escherichia coli* (SelB) bem como a amplificação, transcrição e purificação do RNA transportador específico para inserção de selenocisteína, o tRNA<sup>Sec</sup> (ou SelC), e de diferentes construções do tRNA<sup>Sec</sup>. Foram realizados experimentos de caracterização biofísica da amostra tais como Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência (FAS), Ultracentrifugação Analítica (AUC), Dicroísmo Circular (CD) e Calorimetria de Varredura Diferencial (DSC), corroborando com os estudos em solução de conformação oligomérica que foram realizados por cromatografia de exclusão molecular (SEC) além de determinar parâmetros de estabilidade da amostra.

Posteriormente, experimentos de espectroscopia de anisotropia de fluorescência com distintos mutantes do tRNA<sup>Sec</sup> previamente marcados com fluoresceína permitirão determinar quais elementos estruturais são fundamentais para tal reconhecimento. Além disso, experimentos de microcalorimetria foram utilizados para verificar a interação na formação do complexo proteína-tRNA.

Por meio destas técnicas, será possível analisar as especificidades das interações do tipo proteína-tRNA<sup>Sec</sup> e proteína-tRNAs mutantes, e através de um comparativo entre as interações SelB tRNA<sup>Sec</sup> e SerRS.tRNA<sup>Sec</sup>, será possível inferir quais regiões do RNA são essenciais para cada interação. Além disso, este estudo é importante para inferir interações de entregas específicas entre outros integrantes da via de incorporação da selenocisteína, e assim elucidar a ordem de eventos biológicos, como por exemplo, a formação do complexo ternário na presença da proteína Selenocisteína Sintase (SelA): SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.

Dessa maneira, esse projeto visa a compreensão do mecanismo de reconhecimento desse tRNA, um passo crucial para a compreensão plena dessa via metabólica essencial ao organismo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Examinar as regiões do tRNA<sup>Sec</sup> essenciais para a interação com as proteínas SelB, SerRS e SelA. Em especial, a importância de três regiões do tRNA<sup>Sec</sup> foi investigado e se

mostraram essenciais para a interação do tipo SelB-tRNA: braço acceptor, braço T $\psi$ C e braço variável;

- Obter constantes de dissociação das interações do tipo proteína-tRNA por meio da anisotropia de fluorescência (FAS), sendo que o tRNA marcado com fluoresceína será utilizado como sonda fluorescente para a interação;

- Monitorar a formação dos complexos do tipo proteína-tRNA e inferir suas constantes de sedimentação por meio de experimentos de velocidade de sedimentação (SV);

- Realizar experimentos de equilíbrio de sedimentação (SE) como um método adicional para a determinação de constantes de dissociação para os complexos.

- Realização de ensaios de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética para a verificação da formação do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> em forma nativa;

- Avaliar a estabilidade térmica de SelB em função da interação com tRNAs por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) por meio do monitoramento da capacidade térmica em função da temperatura, o que torna possível inferir a temperatura de *melting*;

- Realizar análises de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) para a obtenção de modelos de envelope estrutural a baixa resolução da proteína SelB e do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>;

- Realizar medidas de microscopia eletrônica de transmissão em contraste negativo (NS-EM) para a obtenção de imagens relativas à formação do complexo SelA.SerRS.

- Realizar experimentos através de outras técnicas biofísicas tais como Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência Intrínscas (IFS), Espectrometria de Massas (MS) e *Western Blot* (WB) para a caracterização biofísica das amostras.

### 3 TÉCNICAS E METODOLOGIA

#### 3.1 Análises bioinformáticas

##### 3.1.1 Análise Bioinformática para o Fator de Elongação Específico (SelB)

Na ausência de estrutura em alta resolução até o momento de início desse projeto de mestrado para o Fator de Elongação específico para selenocisteína de *Escherichia coli*, SelB, foram realizadas análises iniciais *in silico* para a modelagem molecular por meio da sequência de aminoácidos disponível pelo banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI). A sequência (GI# 388479650 / YP# 491844.1) codificante para SelB da cepa *E. coli* K-12 (W3110) possui 614 aminoácidos e massa molecular predita de 68.867,4 Da.

Inicialmente, a busca por proteínas foi realizada para encontrarestruturas homólogas através da ferramenta Protein BLAST (NCBI). Para esta busca, a sequência da proteína SelB foi utilizada como referência para a busca contra o banco de dados de proteínas com estruturas já depositadas no banco de dados do PDB. Ao utilizarmos a sequência inteira de SelB, nenhum dos resultados obtidos puderam ser utilizados como molde, uma vez que esta proteína possui diferentes domínios. Desta forma, a sequência de SelB foi fragmentada em três diferentes porções, uma porção contendo o domínio N-terminal, outra o domínio GTPase e por fim o domínio C-terminal. A partir disto, estes três diferentes fragmentos serviram como referência para as buscas por estruturas homólogas.

A modelagem para a proteína SelB foi realizada por meio do servidor I-TASSER (Zhang Lab) (58) utilizando como molde o fator de elongação específico de *A. aeolicus* determinado em 2015 por Itoh e colaboradores (PDB ID 4ZU9:A).(47) Desta maneira, a estrutura cristalográfica depositada no banco de dados PDB foi utilizada como ferramenta de restrição para a criação do modelo de SelB pelo I-TASSER (Zhang Lab). Além disto, a estrutura do modelo resultante para SelB foi submetida ao programa MolProbity (Duke Biochemistry) (59) para a determinação do gráfico de Ramachandram a fim de avaliar a qualidade do modelo gerado.

As demais construções para os modelos de interação com o tRNA<sup>Sec</sup> foram realizadas através do programa CHIMERA 1.5.3 (60) e as análises das estruturas foram visualizadas pelo programa PYMOL.(61)

### 3.1.2 Análise Bioinformática para Seril-tRNA Sintetase (SerRS)

Assim como para proteína SelB, até o atual momento não há estrutura em alta resolução para a proteína SerRS de *E. coli*. Desta forma recorreu-se à modelagem computacional para a construção de um modelo de estrutura para servir como referência para as discussões deste projeto. A proteína Seril tRNA-Sintetase possui estrutura resolvida para 22 organismos pertencente aos três domínios da vida, sendo que todas estruturas elucidadas foram determinadas por cristalografia por raios-X.

Para a construção do modelo foi realizado a busca por sequências de aminoácidos idênticas à sequência da proteína SerRS de *E. coli*, a qual foi utilizada como molde para a procura. A busca foi realizada utilizando a ferramenta Protein BLAST (NCBI) contra o banco de dados das proteínas cujas estruturas já foram depositadas no banco de dados Protein Data Bank (PDB).

O resultado de melhor qualidade em termos de identidade foi a proteína SerRS de *Aquifex aeolicus* (PDB ID: 2DQR;.A) recentemente resolvida e depositada no PDB por Itoh, Y. e colaboradores (trabalho a ser publicado). O alinhamento por meio da ferramenta *Protein BLAST* apresentou identidade de 55% e cobertura de 98% da sequência proteica de SerRS em relação à sequência da mesma proteína de *Aquifex aeolicus*.

A modelagem por homologia juntamente com a modelagem por ambiente químico foi realizado pelo método *ab initio* utilizando o servidor I-TASSER (Zhang Lab). A qualidade do modelo foi investigada pelo uso do programa MolProbity (Duke Biochemistry) para a determinação do gráfico de Ramachandram para o modelo estrutural teórico de SerRS gerado pelo programa I-TASSER (Zhang Lab).

## 3.2 Obtenção de tRNAs

### 3.2.1 Amplificação do gene do tRNA específico (*selC*) e das diferentes construções do tRNA<sup>Sec</sup>

Para analisar a participação do tRNA<sup>Sec</sup> específico na via de incorporação de selenocisteínas bem como investigar a afinidade deste por seus parceiros de interação, foi inicialmente necessário proceder com a obtenção *in vitro* de tRNA<sup>Sec</sup> bem como alguns de seus mutantes.

O gene do tRNA Específico de Inserção de Selenocisteína (*selC*) de *Escherichia coli*

foi amplificado através da técnica de PCR a partir dos oligonucleotídios, comercialmente sintetizados (Sigma), representados abaixo:

***selC-Forward***

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATCCAGTTG  
3'

***selC-Reverse***

5'TGGCGGAAGATCACAGGAGTCGAACCTGCCCGGGACCGCTGGCGGCCCAACTGGATTGAAGTCCAG 3'

Para a construção dos mutantes de tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*, foram desenhados oligonucleotídeos com mutações pontuais, sendo que cada região modificada foi substituída por regiões correspondentes de uma isoforma do tRNA transportador de serina (tRNA<sup>Ser</sup>) de *E. coli*. Os *primers* referentes às construções do DNA molde com as defidas modificações desejadas para a síntese de tRNAs mutantes foram desenhados e cedidos pelas Dra. Livia Manzine e Dra. Jaqueline Evangelista.

Em todos os oligonucleotídeos utilizados como moldes para amplificação de tRNA<sup>Sec</sup> e seus mutantes foram adicionados a sequência promotora para ligação da enzima T7 RNA polimerase (Thermo Fisher).

As sequências dos genes de cada mutante são mostradas abaixo, sendo destacada nos mutantes as regiões que foram substituídas pelas regiões de uma isoforma do tRNA carregador de serina. A isoforma de tRNA<sup>Ser</sup> (carregador de serina) de *E. coli* utilizada contém a trinca GGA como bases do anticódon. Sua sequência está indicada abaixo, bem como as regiões substituídas para os tRNAs mutantes. Entretanto, esta sequência não foi amplificada e utilizada neste trabalho.

**Gene de tRNA<sup>Ser</sup> de *E. coli* utilizado como referência para as mutações:**

5'**GTGAGG**TG**TCCGAGTGGCTGAAGG**AGCACGCCTGGAAAGTGTGT**ATACGGCAACGTATCGGGGGT**  
**TCGAATCCCCCCTCACCGCCA** 3'

\*\*\* região substituída no mutante do braço acceptor (14 bases)

\*\*\* região substituída no mutante do braço D (17 bases)

\*\*\* região substituída no mutante do braço anticódon (17 bases)

\*\*\* região substituída no mutante ou deletada do braço variável (14 bases)

\*\*\* região substituída no mutante do braço T $\Psi$ C (17 bases)

Com base nestas análises, os oligonucleotídeos para cada tRNA mutante após as devidas substituições podem ser verificados abaixo:

### Mutante do braço acceptor

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGTGAGGGTTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATCC  
AGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTTCGACTCCTGTCTCACCGCCA3'

### Mutante do braço D

5'ACGAATTCTAATACGAACTCACTATAGGGAAGATCGTTCGAGTGGCTGAAGGAGCTGGACTTCAA  
ATCCAGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTTCGACTCCTGTGATCTTCCGCCA3'

### Mutante do braço anticódon

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCTCCGGTGAGGCGGCACGCCTGGAAA  
GTGTGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGCAGGTTTCGACTCCTGTGATCTTCCGCCA3'

### Mutante do braço variável através de deleção total do braço variável (Var1)

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAAT  
CCAGTGGCAGGTTTCGACTCCTGTGATCTTCCGCCA3'

### Mutante do braço variável através de substituição total do braço (Var2)

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAAT  
CCAGTATACGGCAACGTATGGCAGGTTTCGACTCCTGTGACTTCCGCCA3'

### Mutante do braço T $\Psi$ C

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAAT  
CCAGTTGGGGCCGCCAGCGGTCCCGGGGGGTTTCGAATCCCCGATCTTCCGCCA3'

Em azul: região substituída no mutante do braço variável (17 bases); em vermelho: região substituída no mutante do braço acceptor (14 bases); em amarelo: região substituída no mutante do braço T $\Psi$ C (17 bases).

Além destes, foi desenhado oligonucleotídeos para o tRNA carreador de alanina



(tRNA<sup>Ala</sup>) de *E. coli* com a trinca TGC como anticódon (gene com 76 pares de bases), pois esta é a isoforma mais abundante neste organismo 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> e seus mutantes durante este trabalho.

### Gene de tRNA<sup>Ala</sup> de *E. coli* utilizado como controle negativo:

5'GGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCCTGCTTTGCACGCAGGAGGtCTGCGGTTTCGATC 3'

Com base nestas modificações pontuais realizadas pelo desenho dos oligonucleotídeos, os tRNAs mutantes devem possuir estruturas secundárias específicas como pode ser observado pela Figura 9 a seguir.

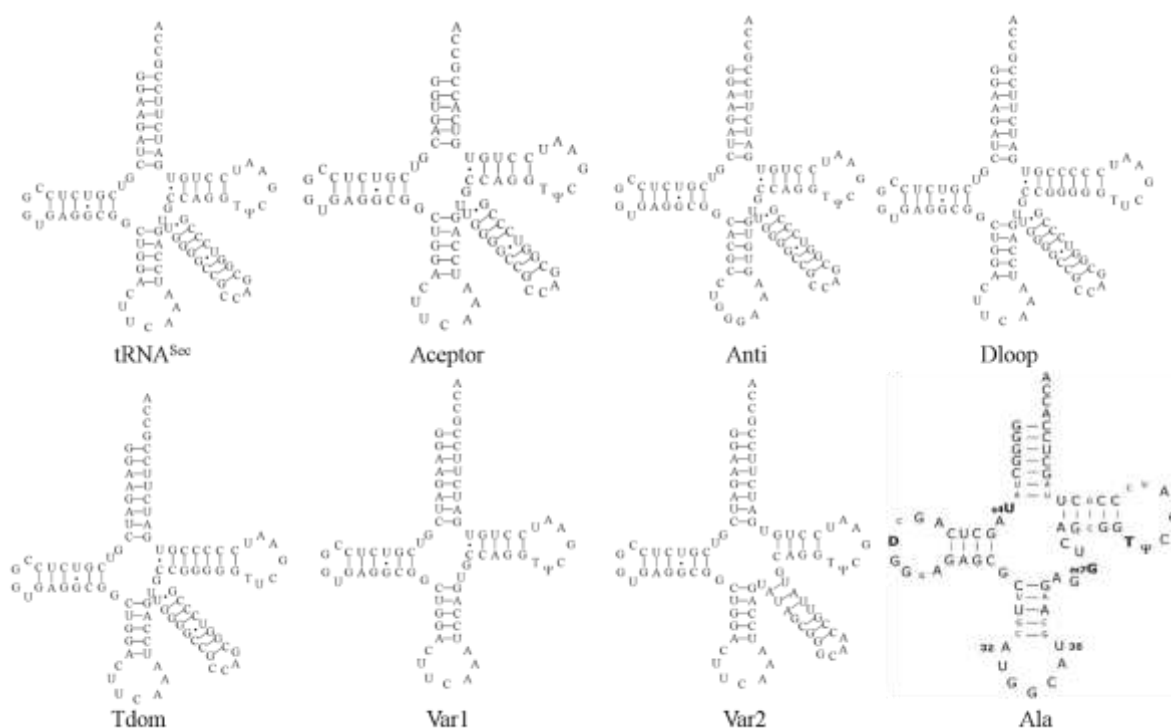


Figura 9 – Representação esquemática das seqüências dos tRNAs mutantes. Modelos gerados com o auxílio do programa ModeRNA server (Genesilico).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A amplificação do DNA molde de cada tRNA foi realizada pelo protocolo apresentado na Tabela 1. Iniciou-se 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 segundos seguidos pelo passo de anelamento a 40 °C por 30

segundos e por fim um passo de alongação a 72 °C por 30 segundos. Repetido esse ciclo por 35 outras vezes, a amostra foi então incubada a 4 °C para preservação e posterior utilização.

Tabela 1 – Condições da reação de amplificação para o gene *selC* de *Escherichia coli*.

Reagentes	Volume (µL)
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/µL]	1
Oligo nucleotídeo 3' do gene [100 pmol/µL]	1
<i>Taq</i> DNA polimerase Platinum [5 U/µL]	1
Água deionizada q.s.p.	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

O resultado da reação foi submetido à purificação através de eletroforese em gel de agarose 2% contendo SYBR® Safe a 100 V, 400 mA por aproximadamente 40 minutos. O gel foi observado em transluminador a 420 nm e o fragmento de interesse foi recuperado utilizando o kit Perfect Gel Cleanup (Eppendorf), obtendo-se cerca de 100 ng/µL de concentração ao final da purificação. A quantificação do rendimento foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no modo DNA50 utilizando, como referência da medida, água deionizada.

### 3.2.2 Transcrição do gene do tRNA específico (*selC*) e tRNAs mutantes

Com o resultado da reação de amplificação do gene *selC*, deu-se continuidade à obtenção do tRNA<sup>sec</sup> com a utilização do kit comercial MEGAscript® T7 (Ambion).

O volume de DNA molde foi determinado como sendo a quantidade, em µL, necessária para obter 250 ng de DNA. 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* para o tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli*.

Reagentes	Volume (μL)
Tampão [10 X]	2
ATP	2
CTP	2
GTP	2
UTP	2
DNA molde (250 ng)	X
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.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a transcrição, a amostra foi submetida ao processo de purificação. Para isto, adicionou-se à amostra ao final do processo de transcrição 1  $\mu\text{L}$  de DNase Turbo (Ambion), para degradação do DNA molde utilizado, incubando-se por 15 minutos à 37 °C. Procedeu-se com a extração utilizando fenol e clorofórmio, adicionando-se 200  $\mu\text{L}$  de fenol e homogeneização utilizando um vórtex por 30 segundos, seguida por posterior centrifugação à 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento análogo com o clorofórmio.

Para precipitação do RNA produzido, adicionou-se 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>, e incubou-se o material por 16 h a -20 °C para otimizar a precipitação do tRNA.

Posteriormente, centrifugou-se a 13.200 rpm por 45 minutos à 4 °C e adicionou-se etanol RNase<sub>free</sub> 70% previamente gelado. O produto foi centrifugado e o sedimento seco foi ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase seguido por mais uma incubação a 40 °C até completa dissolução.

Após a purificação dos tRNAs, é necessário obtê-los em seu correto enovelamento. O enovelamento dos tRNAs se deu em banho térmico a 80 °C com decréscimo contínuo da temperatura até 35 °C quando então é necessário adicionar à amostra cloreto de magnésio livre de RNases em concentração final de 20 mM e então deixar que a amostra atinja a temperatura ambiente. A quantificação do rendimento foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no modo RNA40 utilizando, como

referência da medida, água livre de RNases.

### 3.2.3 Marcação covalente dos tRNAs com reagentes fluorescentes

Com o objetivo de realizar experimentos fluorimétricos, procedeu-se com uma marcação dos tRNAs por meio de um agente fluorescente sensível. Para isto, foi utilizado o kit de marcação “5' EndTag Nucleic Acid Labelling System” (Vector Laboratories) que é amplamente utilizado para ligar covalentemente fluoróforos na extremidade 5' de DNAs ou RNAs.

As marcações de todos os tRNAs descrito neste trabalho foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Inicialmente o tiofosfato é transferido a partir do ATP $\gamma$ S para a extremidade 5'-OH do tRNA pela enzima T4 polinucleotídeos quinase. Em seguida, foi utilizado diacetato de fluoresceína 5-maleimida (Sigma) como fluoróforo específico que interage com os grupos tiol e é então covalentemente ligado ao tRNA conforme ilustrado abaixo:

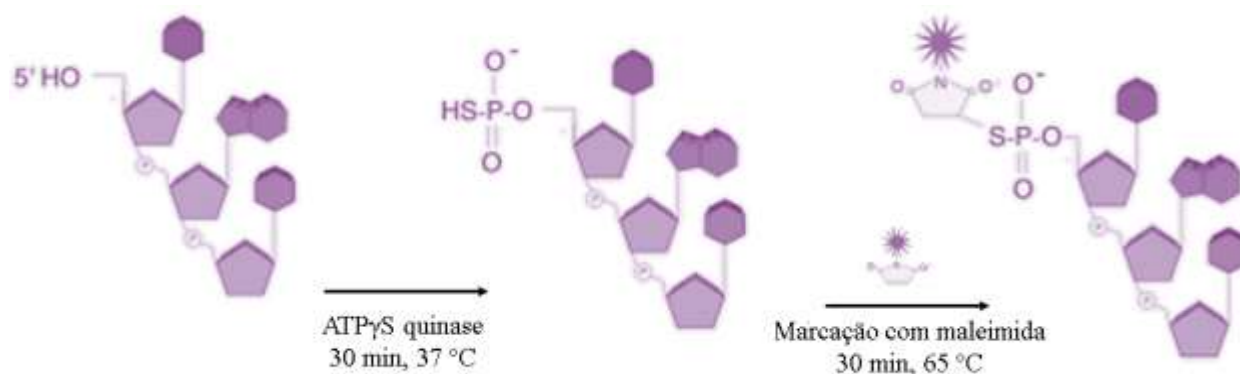


Figura 10 – Esquema da reação de marcação de tRNAs com fluoresceína maleimida através do kit comercial (Sigma).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após realizada a ligação covalente com o fluoróforo, é necessário que o tRNA novamente recupere seu correto estado de enovelamento. Para isto, novamente o tRNA é aquecido a 80 °C e deixado resfriar até a temperatura ambiente, uma vez que esta amostra já contém 20 mM de cloreto de magnésio.

### 3.3 Monitoramento do enovelamento dos tRNAs por Dicroísmo Circular (CD)

Para inferir o estado de enovelamento dos tRNA e posteriormente, das proteínas SelB e SerRS recorreu-se ao uso da Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD). A Espectroscopia

de Dicroísmo Circular (CD) se baseia na interação diferenciada de moléculas assimétricas ao serem submetidas à luz circularmente polarizada à direita e à esquerda.(62-63) Desta forma, o Dicroísmo Circular é definido como a diferença de absorção entre a luz circularmente polarizada à direita e à esquerda e seu valor geralmente é expresso em elipsidade ( $\theta$ ) por meio de um espectro de CD.(63) A técnica é, portanto, intrinsecamente dependente da quiralidade das moléculas em análise que absorvem luz diferentemente à esquerda e à direita (devido aos diferentes coeficientes de extinção da molécula para cada polarização) bem como da conformação e ao solvente em que a amostra apresenta.

Por meio deste princípio, o Dicroísmo Circular é amplamente utilizado para realizar o monitoramento das estruturas secundárias de proteínas, ácidos nucleicos e sacarídeos, bem como inferir alterações nas estruturas secundárias em função da variação de temperatura, solvente ou presença de ligantes.(63)

Com o intuito de caracterizar e comparar a estabilidade térmicas do tRNA<sup>Sec</sup>, mutantes bem como do controle negativo tRNA<sup>Ala</sup>, experimentos de dicroísmo circular com variação térmica foram realizados (VT-CD). As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Corporation, Japão) em cubetas de caminho óptico de 1 mm acoplado ao sistema de variação térmica *Peltier*. Para as medidas de CD, amostras contendo 0,6 mg/mL de tRNA em água livre de RNase e 20 mM de cloreto de magnésio tiveram os espectros de CD registrados. Para as medidas referentes aos espectros de cada tRNAs, uma média de 8 varreduras a taxa de 100 nm/min foi realizada num intervalo de comprimento de onda de 205 nm a 320 nm. As medidas de CD foram obtidas em triplicatas e os resultados foram expressos em milielipticidade (mdeg). De todos os espectros de CD foram devidamente subtraídas as contribuições dos tampões dos seus respectivos espectros.

Para as medidas de variação térmica, foram monitorados os valores de CD no comprimento de onda de 268 nm e a faixa de variação térmica se deu no intervalo de 10 °C a 90 °C, sendo que os espectros foram registrados a cada 10 °C. Por meio da mudança da elipsidade em função da variação da temperatura, é possível analisar o pareamento das bases do tRNA essenciais para a manutenção da estrutura secundária e garantir o correto enovelamento para os posteriores experimentos.(64)

Os espectros foram registrados pelo programa Spectra Manager (JASCO) e a deconvolução dos espectros foi realizada utilizando o programa CDTools.(65) Os dados obtidos foram tratados e analisados utilizando o *software* Origin 8.6 por meio do ajuste sigmoidal pela função de *Boltzmann*.

### 3.4 Obtenção da Proteína Sela

A proteína Selenofosfato Sintase (Sela, E.C. 4.2.1.-) em solução se apresenta na forma de um homodécâmero, consistindo em um pentâmero de dímeros. Cada subunidade desta proteína possui 463 resíduos e massa molecular aproximada de 50,6 kDa.(66-67)

O protocolo de obtenção da proteína Sela de *Escherichia coli* foi previamente determinado pela Dr. Livia Manzine e pelo aluno de doutorado Vitor Hugo Balasco Serrão. Esta proteína já foi amplamente estudada pelo nosso grupo de pesquisa com trabalhos publicados. (34, 68-70)

Para a obtenção de Sela, inóculos de 10 mL de meio LB contendo canamicina (30 µg/mL) e ampicilina (25 µg/mL) são incubados por 16 h sob agitação de 80 rpm por 37 °C. Então é realizado a ampliação de escala de 1:100 em volume, seguido por crescimento celular a 37 °C, 150 rpm por aproximadamente 3 h até que a densidade óptica atingir D.O.<sub>600nm</sub> 1,0. Ao atingir esta etapa, 0,1 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) é adicionado e a indução é conduzida por mais 2 horas, quando ao fim as células são centrifugadas na rotação de 4.500 rpm por 45 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5 e 10 µM PLP, já que a proteína Sela é uma enzima PLP-dependente.

Para prosseguir com a lise celular, lisozima na concentração de 10 µg/mL foi adicionado e posteriormente incubado por 30 min para o quebra do peptidoglicano da parede celular bacteriana. A lise foi conduzida por pulsos de ultrassom de 20 s de duração, espaçados por um intervalo de tempo de 45 s por 5 min. Após o processo de lise, as células foram centrifugadas a 13.500 rpm por 45 min a 4 °C.

O extrato proteico foi então colocado em béquer contendo gelo ao redor para garantir baixas temperaturas e mantido a agitação constante à 60 rpm para a realização do processo de purificação por *salting-out* por meio da adição de 25% (m/v) de sulfato de amônio (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 15 min.

O precipitado foi ressuspensado 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 (ÅKTA-GE) para retirar o excesso de sulfato de amônio utilizado para precipitação. Às frações obtidas, foi adicionado 20% (m/v) de Nycodenz® seguido por incubação em gelo por 30 min. A amostra foi então concentrada em concentradores Amicon (corte de 50 kDa) a 3.000 rpm até o volume final de aproximadamente 1 mL. Atingido este volume, a amostra foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 HL* (16/60).

### 3.5 Expressão e purificação do Fator de Elongação específico SelB

A expressão e purificação da do Fator de Elongação em *E. coli* (SelB) já vem sido descrita desde os anos 1990, entretanto até então apresentando um baixo rendimento, cerca de 0,2 mg por litro de cultura. (28,42,71)

Em colaboração com o aluno de doutorado Vitor Hugo Balasco Serrão, um novo protocolo de expressão e purificação de SelB foi realizado como um método alternativo para os protocolos previamente descritos. Este novo método se destaca pelo encurtamento de etapas no processo de purificação além de garantir um aumento significativo no rendimento proteico (cerca de 2 mg por litro de cultura) como descrito a seguir.

O plasmídeo pT7-6 SelBH6 contendo o gene *selB* foi gentilmente cedido pela Profa. Dr. Marina Rodnina (Department of Physical Biochemistry - Max Planck Institute for Biophysical Chemistry). O plasmídeo possui marca de seleção para ampicilina e promotor T7 além da adição de uma cauda de hexa-histidina na porção C-terminal da proteína, construção esta já utilizada em trabalhos prévios.(43,53,71) Este gene foi inicialmente transformado em cepas de *E. coli* DH5- $\alpha$  para a amplificação da quantidade de DNA molde, seguido por confirmação da presença do inserto pela técnica de PCR utilizando *primers* específicos para SelB.

Prosseguiu-se então as etapas de expressão da SelB. Para isto, uma nova transformação foi realizada, agora utilizando como sistemas de expressão as cepas *E. coli* BL21 ( $\lambda$ -DE3) e *E. coli* WL81460 ( $\lambda$ -DE3), 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. 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 selenocisteína.

Uma vez confirmada a presença do gene de interesse ligado ao vetor de expressão, prosseguiu-se às etapas de expressão da proteína SelB. As condições de expressão foram às seguintes: inicialmente, o aumento na escala de 1:100 em volume de cultura celular previamente crescida por 16 h, procedeu-se com crescimento sob agitação em 150 rpm, 37 °C por aproximadamente 6 h em meio LB contendo canamicina (30  $\mu$ g/mL) e ampicilina (25  $\mu$ g/mL) para a cepa *E. coli* WL81460, e por aproximadamente 5 h em meio LB contendo ampicilina (25  $\mu$ g/mL) para a cepa *E. coli* BL21, até que se atingir a densidade óptica (D.O.<sub>600nm</sub>) de 1,0. Nesta etapa, iniciou-se a indução por meio da adição de a 0,1 mM de IPTG por mais 3 h, seguido por centrifugação a 4.000 rpm, 4 °C, por 1 h. As células foram lavadas

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 e descartado a fração sobrenadante. Após esta etapa de lavagem, o precipitado foi novamente ressuspensão agora com tampão B (200 mM ácido bórico; 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM 2-mercaptoetanol; 200 µg/mL PMSF). A lise celular foi realizada por meio da adição de lisozima (10 µg/mL) seguida por lise por pulsos de ultrassom (ciclo: 20 s On, 45 s Off, tempo total de 2 min 20 s), então o extrato lisado foi novamente submetido à centrifugação a 13.500 rpm, 4 °C por 45 min, obtendo-se assim os extratos proteicos brutos.

Como a proteína SelB é expressa com a adição de uma calda hexa-histida fusionada a porção C-terminal, foi possível proceder a purificação explorando a técnica de cromatografia por afinidade por metais. Após um passo de filtração do extrato bruto em filtros de 0,22 µm, a purificação de SelB foi realizada em coluna de afinidade onde havia previamente depositado cerca de 3 mL de resina de cobalto (Co<sup>2+</sup>) (Talon). A lavagem foi realizada com cerca de 30 mL de tampão C (200 mM ácido bórico; 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM 2-mercaptoetanol; 200 µg/mL PMSF; 10 mM imidazol) e a eluição foi obtida em 12 mL de tampão D (200 mM ácido bórico; 1 M NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM 2-mercaptoetanol; 200 µg/mL PMSF; 100 mM imidazol).

Com o objetivo de analisar interações do tipo tRNA-proteína, é necessário que a amostra obtida seja ausente de qualquer RNA endógeno que possivelmente possa ser copurificado. Para isto, a amostra foi submetida a um tratamento adicional por meio da adição de RNase. Para a completa degradação do RNA endógeno que eventualmente era copurificado, adicionou-se RNase A (1 µg/mL) na amostra purificada em ambas as cepas de expressão e incubou-se a 4 °C por 16 h.

Após o processo de degradação do RNA endógeno, a amostra foi concentrada em concentradores Amicon (corte de 50 kDa) e então procedeu-se a diálise para tampão E (100mM 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 ÅKTA onde foi submetida a cromatografia de exclusão molecular com a utilização da 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.

Com o intuito de inferir se as amostras purificadas analisadas eram referentes à proteína de interesse, foram realizados experimentos de Espectrometria de massas (MS) e *Western Blot* (WB). Os ensaios de espectroscopia de massas foram realizados em colaboração



com o Dr. Edson Crusca (Departamento de Físico Química – UNESP/Araraquara) utilizando o espectrômetro micrOTOF-QII (Bruker Daltonics) em coluna - coluna Acclaim PepMap® RSLC, 75 µm x 150 mm, C18, 2 µm, 100 Å (cod. 164534). Para este experimento, a fração contendo a proteína de interesse foi recortada do gel e descorada com 50% metanol e 2,5% ácido acético. Esta solução é retirada do gel e é feita a desidratação com adição de 100% acetonitrila. Após a remoção desta solução, a amostra é evaporada e é adicionado 10 mM de DTT até cobrir o gel, em seguida é realizada a alquilação com a adição de 50 mM iodoacetamida. O gel é então lavado com 100 mM bicarbonato de amônio submetido a digestão pela adição de 1 µg de tripsina (Sigma). Já os ensaios de *Western Blot* foram realizados em colaboração com a aluna de mestrado Jéssica Fernandes Scortecchi e sua metodologia será descrita futuramente na Seção 5.2.3.

### 3.5.1 Determinação da presença de RNAs endógenos

Para a detecção de RNAs endógenos que possivelmente eram copurificados junto à proteína SelB até o passo de cromatografia por afinidade, foi utilizado o espectrofotômetro Qubit (Invitrogen) por meio do ensaio de RNA Quant-iT.<sup>(72)</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 (λDE3) e *E. coli* WL81460.

O processo consiste pela adição de RNase A (1 µg/mL) seguido por incubação a 4 °C em diferentes tempos. Para estes ensaios foram preparados 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 era dializada para o tampão E e submetido 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 reagente em 190 µL de tampão E. Já a amostra de proteína a ser analisada, foi preparada em outro tubo com a adição de 20 µL em 180 µL de solução de trabalho. Todas estas soluções foram preparadas em tubos de PCR específicos fornecidos pelo kit do Qubit. Os tubos foram então agitados em vortex por 30 s e incubados à temperatura ambiente antes das medições.

Para as medidas das concentrações de RNA presentes no produto final de purificação

da proteína SelB, foi primeiramente realizada a curva de concentrações por meio das medidas dos padrões: soluções *Standard 1* e *Standard 2*. Basicamente, a medida destas soluções padrão dão ao *software* dois pontos de calibração, onde se pode estimar uma reta. Em seguida, a amostra contendo a proteína é submetida ao fluorímetro e baseado nas soluções padrão é quantificada a concentração dos RNAs endógenos. Foram coletados os valores de absorbância por métodos fluorimétricos referentes à RNAs imediatamente antes da adição de RNase, e em 1 h e 18 h após o tratamento com RNase A.

### 3.5.2 Quantificação de GTP endógeno

Uma vez que SelB é uma proteína com atividade GTPase assim como todos os fatores de alongação, espera-se que o produto final de purificação possa vir com a presença de nucleotídeos de guanina copurificados. Deste modo, utilizou-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) como uma técnica sensível para a detecção da presença de nucleotídeos endógenos de acordo com ensaios previamente estabelecidos.(73) Para as análises de HPLC, foi utilizado o equipamento Waters 2695/2487 com a coluna de troca iônica DEAE 5 PW, 7,5 mm x 7,5 cm (Waters) acoplada e a absorbância dos nucleotídeos a 253 nm foi monitorada.

Para prosseguir com estas análises, 20  $\mu\text{M}$  de SelB havia sido preparado em adição de 1,5 M  $\text{HClO}_4$  gelado e incubado durante 10 min a 4 °C. As proteínas desnaturadas foram precipitadas por centrifugação a 16.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de 3M KOH, 80  $\mu\text{L}$  de 5 M ácido acético e 100  $\mu\text{L}$  de 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  em 600  $\mu\text{L}$  de sobrenadante recolhido no passo anterior, e então armazenado a -20 °C por 18 h para a precipitação das proteínas. Antes da injeção na HPLC, as amostras foram rapidamente descongeladas e centrifugadas a 13.500 rpm durante 1 h a 4 °C. Desta forma, garante-se que a proteína seja precipitada e é então analisada a fração correspondente ao sobrenadante, a qual possivelmente possui os nucleotídeos de interesse.

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 minutos a 25 °C após a adição de 100 mM 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 são então congeladas em nitrogênio líquido e então são descongeladas em banho térmico a 65 °C (temperatura acima do  $T_m$  de SelB) até à completa desnaturação e inibição da reação. Em seguida as amostras são centrifugadas a 13.500 rpm por 30 min a 4 °C

e então injetadas no HPLC. A coluna foi previamente equilibrada com tampão A de HPLC a 90% (fosfato de potássio 100 mM pH 7,0) e tampão B de HPLC a 10% (100 mM fosfato de potássio pH 7,0 e 1 M cloreto de sódio).

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

A cinética de consumo de GTP na presença de tRNA<sup>Sec</sup> também foi realizada. Para isto, SelB na presença de 100 mM GTP foi previamente incubado nos mesmos tempos analisados (0, 5, 10, 15, 30, 45 e 60 min) com 20  $\mu$ M de tRNA<sup>Sec</sup>. Utilizou-se o mesmo procedimento para preparar a amostra para injetar no HPLC. Os outros complexos foram preparados todos nas mesmas condições experimentais e os cromatogramas foram analisados utilizando programa Origin 8.6 (OriginLab).

### 3.6 Obtenção de SerRS

#### 3.6.1 Amplificação e clonagem de *serRS*

O gene contendo a sequência da proteína SerRS foi amplificado pela técnica de PCR a partir do DNA geômico de *E. coli*. Para isto, foram feitas duas construções de *primers* visando diferentes formas de ligação nos vetores, o que influenciaria futuramente na escolha de técnicas de purificação. O *primer sense* contendo um sítio de clivagem para a enzima NcoI foi utilizado em comum para ambas as construções. Na primeira construção, o *primer reverse* adiciona um códon de parada ao gene amplificado. Já na segunda construção não há esta adição artificial de um *stop codon*, assim neste caso a amplificação só terminaria no códon de parada presente nos possíveis vetores em que o gene amplificado fosse ligado. Em ambas as construções o sítio de clivagem para os *primers reverse* são para a enzima XhoI. Foi utilizado ampicilina como agente restrigente para a seleção das colônias positivas. Os oligos referentes às estas duas construções são indicados a seguir:

SerRS\_For\_NcoI:

5' **CATGCCATGG**CATGCTCGATCCCAATCTGCTGCG 3'

SerRS\_Stop\_Rev\_XhoI:

5' **CCGCTCGAGT**GGATTAGCCAATATATTCCAGTCCGTTTC 3' (com stop códon)

SerRS\_Rev\_XhoI:

5' **CCGCTCGAG**GCCAATATATTCCAGTCCGTTTC 3' (sem stop códon – usar a cauda do vetor)

Desde esta etapa foi planejado o método de purificação e, portanto, em quais vetores de expressão seriam adicionados. Escolheu-se trabalhar com o vetor de expressão pET32(a) pois este tem como característica a propriedade de adicionar uma cauda tioredoxina (Trx) de 109 aminoácidos na porção N-terminal da proteína, o que confere significativo ganho na capacidade de solubilidade a proteínas com enovelamento que possam ser complexos.(74)

A amplificação do gene *serRS* (1.292 pb) foi realizada em termociclador (Bio-Rad Laboratories) de acordo com o protocolo indicado na Tabela 3.

Tabela 3 – Reação de amplificação do gene *serRS* de *E. coli*.

Reagentes	Volume (µL)
Tampão [10 X]	5
dNTP	1
<i>Primer Foward</i>	1
<i>Primer Reverse</i>	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4
DNA genômico	1
Taq DNA polimerase Phusion® High-Fidelity (BioLABs)	1
Água deionizada q.s.p.	50

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o processo de amplificação, a amostra foi submedida ao seguinte ciclo: aquecimento a 94 °C por 5 min iniciais, em seguida o ciclo de repetições se deu por uma etapa a 94 °C por 45 s, resfriamento a 55 °C por 45 s e novo aquecimento a 72 °C por 90 s. Este ciclo foi repetido por 35 vezes, sendo então deixado o sistema a temperatura fixa de 72 °C por 7 min a fim de favorecer o completo anelamento do DNA. Por fim a amostra foi resfriada a 4 °C para armazenamento.

Uma vez amplificado o gene *serRS*, prosseguiu-se com a ligação no vetor de amplificação comercial pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific). O protocolo de ligação foi realizado conforme indicado pelo fornecedor de acordo com a Tabela 4 e então a amostra foi incubada a 37 °C por 16 h.

Tabela 4 – Reação de ligação ao pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific).

Reagentes	Volume (µL)
Tampão de Reação 2X	10 µL
Produto da pcr (gene <i>serRS</i> de 1292 pb)	Γ
pJET1.2/blunt	1 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
Água deionizada	q.s.p. 19 µL
Volume total	20 µL

Onde  $\gamma$  corresponde ao volume em µL necessário para a obtenção de 64,6 ng de DNA proveniente da reação de PCR.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez ligado no vetor de propagação, o plasmídeo contendo o gene de interesse foi submetido à transformação química em cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$  para amplificação do DNA.

Para o processo de transformação, células competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$  foram descongeladas em gelo por 20 min e então foi adicionado 100 ng de DNA proveniente do produto da ligação previamente preparado em tampão de transformação (100 mM KCl, 30 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5% PEG 6000 (m/v) em água Mili-Q autoclavada). Após a adição do plasmídeo exógeno, as células foram incubadas em gelo por mais 30 min, e então foi realizado o choque térmico ao transferir as células para temperatura ambiente por 10 min. Por fim, as células foram colocadas em 1 mL de meio LB para crescimento bacteriano, sendo mandadas em agitação a 80 rpm, 37 °C por 50 min. Após o crescimento, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (25 µg/mL) como agente restrigente.

Após o crescimento e a seleção das colônias em meio sólido, realizou-se a extração do DNA plasmidial para a confirmação da presença do inserto por meio da técnica de PCR e digestão com as enzimas específicas. O DNA plasmidial foi então digerido com as enzimas de restrição *FastDigest* NcoI e XhoI (Fermentas), e ligado no vetor de expressão pET32(a) também digerido com estas mesmas enzimas conforme o protocolo realizado para a ligação ao

vetor de clonagem pJET1.2/blunt (Thermo Fisher). Novamente foi realizada uma transformação na cepa de amplificação *E. coli* DH5- $\alpha$  para a obtenção de um maior número de cópias do plasmídeo contendo o gene de interesse inserido no vetor de expressão. Por fim, o plasmídeo contendo o gene de interesse foi transformado em cepas de expressão *E. coli* BL21 ( $\lambda$ -DE3) para posteriores ensaios de expressão.

### 3.6.2 Expressão e purificação de SerRS

Para a expressão da proteína a partir do gene *serRS*-pET32(a) inicialmente foi preparado inóculo contendo ampicilina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sendo previamente incubado por 16 h sob agitação de 80 rpm a 37 °C. Posteriormente, foi realizado a ampliação de escala para um volume maior na proporção de 1:100 o qual foi submetido a agitação de 150 rpm a 37 °C por cerca de 3 h 30 min, quando a  $\text{OD}_{600\text{ nm}}$  atinge o valor de 0,6. Então o meio celular foi submetido à indução por meio da adição de 0,5 mM de IPTG e foram realizados diferentes testes para se determinar o melhor tempo de indução. O monitoramento da eficiência do tempo de indução foi feito por meio da análise em gel SDS-PAGE 12%, sendo que o melhor resultado para o tempo de indução foi obtido para 18 h de indução, com agitação de 150 rpm a 37 °C.

Uma vez realizado as etapas de expressão e indução, as células foram centrifugadas em rotação de 4.000 rpm a 4 °C e ressuspensas no tampão de lise 50 mM fosfato de potássio pH 7,4; 500 mM NaCl; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM 2-mercaptoetanol; 2% glicerol. Em seguida, procedeu-se a lise celular por meio da adição de lisozima (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) seguida por sonicação (ciclo: 30 s On, 50 s Off, tempo total de 5 min) e o extrato foi submetido à centrifugação a 13.500 rpm, 4 °C por 45 min.

Uma vez que o pET32(a) adiciona uma cauda de hexa-histidina fusionada ao domínio N-terminal, também foi explorada a técnica de cromatografia por afinidade por metais para a purificação de SerRS.

Para a purificação, resina de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (Talon) foi previamente decantada na coluna, por onde foi adicionado o extrato bruto após filtragem em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . A lavagem foi realizada com 30 mL do tampão de lise com acréscimo de 20 mM de imidazol e a eluição foi realizada com a adição de 10 mL do tampão de lise com acréscimo de 100 mM de imidazol.

Após esta primeira etapa de purificação, obtém-se a proteína fusionada à cauda tiorredoxina adicionada pelo pET32(a). Como já é previamente descrito que a porção N-

terminal de SerRS possui o domínio de interação aos tRNAs,(3,25) é desejável que se obtenha SerRS com a extremidade N-terminal livre da cauda de tiorredoxina. Para isso foi necessário um passo adicional da digestão da cauda para obter ao final a proteína com a tiorredoxina removida.

Após eluída de forma pura da coluna de afinidade, a amostra foi concentrada em concentradores Amicon (corte de 30 kDa) para a etapa de clivagem da cauda. A digestão foi realizado por meio da adição da enzima enteroquinase (BioLabs) na concentração de 100 ng por grama de proteína a ser clivada a 37 °C por 16 h.

Como a proteína SerRS em solução está na forma de dímero, há a adição da cauda tiorredoxina em cada um de seus monômeros, desta forma é esperado que ao final da clivagem possam co-existir 3 populações: dímeros que tiveram clivagem da cauda em ambos monômeros, dímeros que tiveram clivagem da cauda em apenas um monômero e dímeros em que a cauda tiorredoxina não foi clivada.

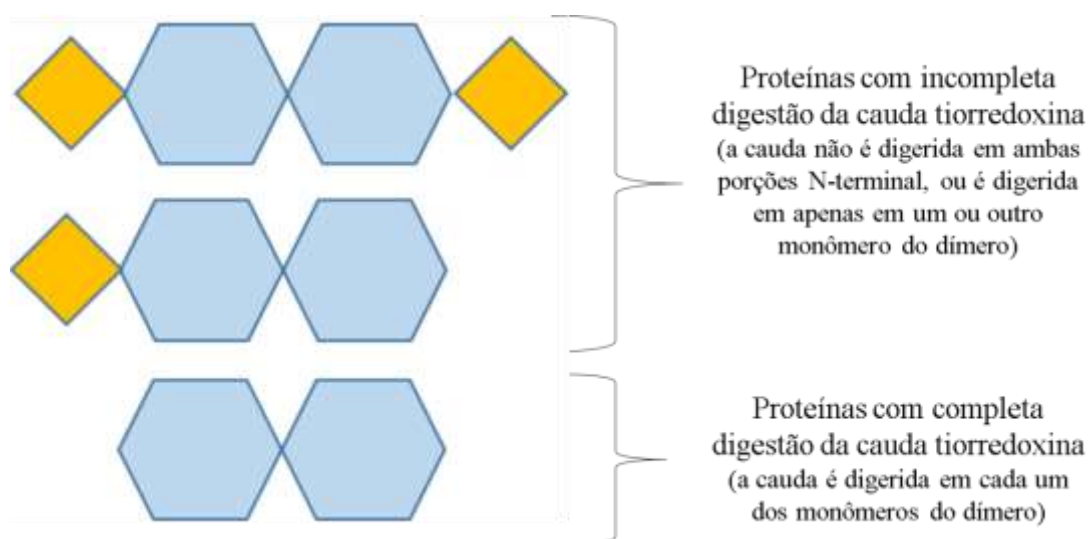


Figura 11 – Esquema representativo das diferentes populações presentes ao final do processo de digestão da cauda Tiorredoxina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, a proteína foi submetida novamente à cromatografia por afinidade utilizando-se níquel como íon metálico. Entretanto, agora a fração lavada pela coluna é a fração de interesse, uma vez que nesta deve ser eluída a proteína com a ausência de tiorredoxina. As proteínas que ainda estão fusionadas à tiorredoxina devem interagir com a coluna e são eluídas com a adição do tampão contendo imidazol. Como nesta etapa desejamos proteínas não fusionadas à tiorredoxina, esta fração não é de interesse para os experimentos descritos neste trabalho.

Foram recolhidas frações de todas as etapas do processo de purificação e submetido à

análise em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE).

### 3.6.3 Confirmação por *Western Blot*

A técnica de *Western Blot* foi utilizada para a confirmação de que as amostras presentes em gel SDS-PAGE 15% correspondiam às amostras de interesse. Ao final da purificação, a proteína SelB é fusionada à cauda de hexa-histidina enquanto que para a proteína SerRS passa por uma etapa adicional de clivagem. Para monitorar a presença da proteína nas etapas de purificação realizadas foi realizado o monitoramento da presença da cauda de hexa-histidina por meio de análises de *Western Blot* com uso de anticorpos contra His-TAG (Sigma). Para o caso da proteína SerRS, os ensaios de *Western Blot* foram relevantes para o monitoramento da clivagem da cauda tiorredoxina.

As amostras presentes no gel SDS-PAGE 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 descorado com água destilada. Uma vez descorada, a membrana foi submetida ao passo de bloqueio utilizando solução salina tamponada com fosfato com Tween-20 (PBST) + 5% de leite em pó à temperatura ambiente sob leve agitação por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra a His-TAG (Sigma) com o título de 1:3000 em PBST com 1% de leite em pó por 2 h. A membrana foi então lavada com PSBT incubada com o anticorpo secundário (Sigma, peroxidase IgG anti-mouse conjugado numa titulação de 1:5000) em PBST durante 1 h 30 min. Após essa incubação, a membrana foi lavada novamente com PBST. O complexo proteína-anticorpo conjugado com peroxidase foi então tratado com uma solução de Luminol (1M Tris, pH 8,5, 0,22 mM ácido p. cumárico, 1,24 mM luminol) contendo 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Antes da adição do peróxido de hidrogênio, marcou-se as bandas do marcador com uma caneta fosforescente (*Glow writer*) para posterior visualização dos padrões moleculares. O sistema foi então mantido sob agitação por 2 min e revelados em um revelador digital *C-DiGit<sup>®</sup> Blot Scanner* (Li-COR) e a visualização das imagens foi realizada através do programa Image Studio<sup>™</sup> (Li-COR, Biosciences).

### 3.7 Análise de Dicroísmo Circular para as proteínas SelB e SerRS

Os espectos de Dicroísmo Circular (CD) foram coletados para as proteínas SelB e SerRS com o uso espectropolarímetro J-715 (JASCO Corporation, Japão), de modo



semelhante ao descrito na Seção 3.3. Nestes casos, a faixa de espectro utilizado foi entre 190 e 280 nm, com resolução de 0,2 nm em cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,1 cm a uma taxa de 50 nm/min. As concentrações de proteína utilizadas foram de 0,2 mg/mL para a proteína SelB e de 0,1 mg/mL para a proteína SerRS. Para investigar a alteração da estrutura secundária em função da temperatura, as amostras de proteínas foram submetidas ao processo de variação térmica variando a temperatura de 10 a 90 °C, de 10 em 10 °C, com o uso do sistema *peltier*.

Antes de cada medida, a amostra foi incubada por 10 min para entrar em equilíbrio com a temperatura experimental e então foi registrado a média de 8 scans nas configurações descritas acima. Os espectros foram registrados pelo programa Spectra Manager (JASCO) e a deconvolução dos espectros foi realizada utilizando o programa CDTools (Birkbeck College), já a predição das estruturas secundárias foram realizadas por meio do programa CDNN (Applied Photophysics).

### **3.8 Fluorescência Intrínseca dos resíduos aromáticos**

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica amplamente utilizada para caracterização de amostras biológicas bem como na formação de complexos macromoleculares. Esta técnica é usualmente recorrida quando se quer analisar os efeitos de modificações na estrutura tridimensional de moléculas em solução, como por exemplo, em processos de desnaturação, supressão e interação com ligantes.

A proteína SelB possui 12 triptofanos, sendo que 11 destes estão distribuídos em domínios de interação aos RNAs. Já a proteína SerRS possui 3 resíduos de triptofano, sendo que 2 são pertencentes ao sítio de ligação a ATP. A existência destes resíduos em determinadas regiões podem ter sofrer oclusão em função da adição de ligantes e esta informação pode ser quantificada pela técnica de Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca.

Os experimentos de Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca (IFS) para as proteínas SelB e SerRS foram realizadas na concentração de 1 mg/mL em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm utilizando espectrofluorímetro ISS-PC (ISS, Champaign, IL, EUA). Os ensaios foram realizados a 25 °C usando 295 nm como comprimento de onda de excitação e um filtro de 295 nm no detector foi utilizado para evitar a interferência de fótons espalhados. A faixa de emissão foi monitorizada no intervalo de 305-510 nm.

À amostra de proteína SelB na cubeta foram adicionadas concentrações crescentes de tRNA<sup>Sec</sup> na faixa de concentração de 10-2000 nM. Foi então monitorado a variação do

máximo de emissão em função da titulação ocasionada devido à oclusão de resíduos de triptofanos pertencentes aos sítios de ligação ao tRNA específico. A partir dos espectros de emissão foram calculados os valores de constante de dissociação aparente por meio monitoramento dos máximos de emissão através do tratamento pelo modelo de *Hill* (Equação 2).

A fluorescência intrínseca de SerRS foi monitorada nas mesmas condições experimentais, entretanto foi adicionado à proteína os ligantes ATP, L-Ser e tRNA<sup>Sec</sup> em concentrações fixas. A variação do máximo de emissão em função da adição de ligantes foi então registrada.

O conjunto de dados obtido em todos os experimentos de fluorescência intrínseca foi processado utilizando o *software* Origin 8.6 (OriginLab).

### 3.9 Ensaios de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência

As interações macromoleculares são as bases essenciais para o conhecimento de interactomas de organismos. As interações físicas entre moléculas são essenciais para o funcionamento de vias metabólicas. Desta forma, estudos das interações entre biomoléculas são fundamentais para o completo entendimento dos mecanismos celulares.(22) Para tanto, o desenvolvimento de técnicas biofísicas que auxiliam na compreensão das interações moleculares está diretamente relacionado com o aumento da compreensão que se tem sobre biologia celular. A fim de determinar a interação entre o tRNA<sup>Sec</sup> e as proteínas SelB e SerRS foram realizados ensaios de espectroscopia de anisotropia de fluorescência (FAS).

A técnica se baseia na dificuldade de partículas em girar em solução (Figura 12). A dificuldade de giro em solução é maior quando a molécula deixa de estar livre e passa a interagir com ligantes adicionados à solução. Para a quantificação desta técnica, um fluoróforo específico (fluoresceína 5 'maleimida) é ligado covalentemente ao 5' end dos tRNAs estudados.

Em uma solução pura e homogênea, os fluoróforos tendem a ter uma orientação arbitrária e aleatória. Portanto, ao serem expostos a luz polarizada, as moléculas que estiveram na mesma orientação de polarização da luz serão excitadas, diferenciando-se dos demais fluoróforos que estiverem em todas as outras possíveis orientações.(76)

O valor de anisotropia indica o deslocamento angular médio do vetor de absorção e de emissão do fóton excitado no fluoróforo. Entretanto, é possível que a emissão seja despolarizada, devido à difusão rotacional que é dependente do tamanho e forma da partícula,

viscosidade da solução bem como do tempo de vida do estado excitado no qual se encontra a molécula fluorescente.

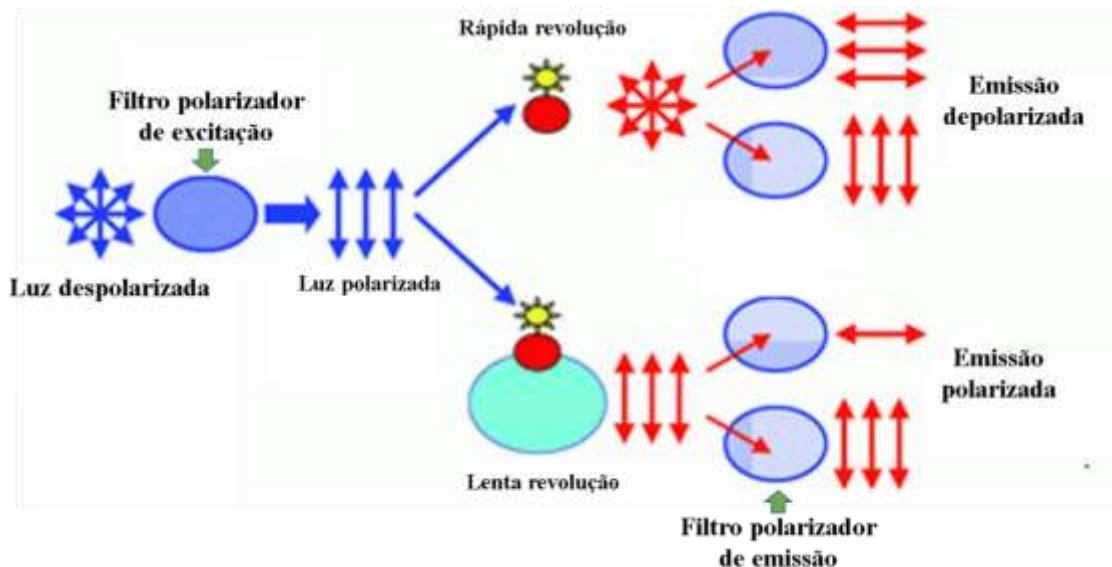


Figura 12 – Modelo esquemático para a polarização da luz e os efeitos causados devido à revolução das partículas .

Fonte: Adaptada de LIMA; LIMA.(76)

Basicamente, o espectropolarímetro ISS-PCI (ISS, Champaign) mede a anisotropia, ou seja, a diferença de polarização em direções perpendiculares entre si. Esta polarização é dada pela molécula utilizada como fluoróforo em solução, a que serve como sonda experimental de interação com outras macromoléculas, como observado pela Figura 12. A medida da intensidade de fluorescência é então realizada pelo espectropolarímetro através das possíveis combinações dos polarizadores de emissão e excitação (Figura 13).



Figura 13 – Conjunto de configurações experimentais em que estão dispostos os polarizadores durante as medidas de anisotropia.

Fonte: Adaptada de SERRÃO.(70)

A anisotropia, definida pela diferença fluorescência em função das posições dos polarizadores pode ser relacionada de acordo com a equação:

$$r = \frac{I_{vv} - G.I_{vh}}{I_{vv} + 2.G.I_{vh}} ; \text{ onde } G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (1)$$

Desta forma, a anisotropia é a medida da razão das diferenças de intensidades detectadas em diferentes configurações pelo espectropolarímetro, onde os índices  $v$  e  $h$  estão relacionados às posições vertical e horizontal em que os polarizadores de excitação e emissão são orientados.

As medidas de polarização são realizadas por meio do aumento dos valores de anisotropia, monitorando a fluoresceína em 492 nm, na interação, permitindo assim a determinação de constantes de dissociação aparente. Para o experimento de Anisotropia de Fluorescência, concentrações mínimas de amostras são requeridas, sendo necessário cerca de 500 nM em 350  $\mu$ L de amostra marcada.

As medidas de anisotropia foram realizadas em espectrofluorômetro ISS-PC (ISS, Champaign, IL) em geometria "L" com monocanal monitorando a emissão em 515 nm. Para este ensaios os tRNAs marcados com diacetato de fluoresceína 5' maleimida foram utilizados como sonda que tem absorção máxima a 492 nm e emissão na faixa de 520-530 nm.

Os experimentos foram conduzidos com a utilização de tRNA não marcado na concentração de 49 nM e tRNA marcado com floresceína na concentração de 1 nM, incubados em cubeta de quartzo com trajeto de 1 cm a 25 °C por 10 minutos antes das realizações das medidas. Para todas as medidas de anisotropia relacionadas à proteína SelB, 100 mM de GTP foram previamente incubados em conjunto com o tRNA.

Para as medidas com a proteína SerRS o correspondente nucleotídeo energético (ATP) foi adicionado na concentração também de 100 mM para avaliar como a presença do mesmo afeta na associação de SerRS por tRNA<sup>Sec</sup>.

À esta solução, concentrações crescentes de proteína SelB ou SerRS foram tituladas e as medidas da intensidade foram registradas. Para as medidas de anisotropia, os valores obtidos foram registrados por meio de uma média de 5 aquisições com diferentes interações variando as posições do polarizador de entrada e a saída para o sistema óptico. Todas as titulações foram homogeneizadas e equilibradas durante 10 min a 25 °C antes das medições de anisotropia respeitando o limite máximo de diluição de 20% em volume.

Para as interações do tipo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> foram analisados a interação de SelB com tRNA<sup>Sec</sup> e com os demais tRNAs mutantes além do controle negativo de interação

tRNA<sup>Ala</sup>. A faixa de titulação de SelB corresponde ao intervalo de 10-1000 nM em concentração final. Para a titulação de SelB ao complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup> foram previamente preparados na cubeta 50 nM de proteína SelA e 50 nM de tRNA<sup>Sec</sup>.

Para os experimentos de anisotropia em função da titulação de SerRS, apenas o tRNA<sup>Sec</sup> foi utilizado como sonda na cubeta, e a este foram titulados a proteína SerRS, SelA, e alguns dos já conhecidos ligantes de SerRS: ATP e o aminoácido L-Serina e suas combinações. A faixa de concentração para a titulação das proteínas é de 10-500 nM em concentração final, sendo registrado a média entre 5 interações. Foram adicionadas titulações de SerRS ao complexo 50 nM SelA e 50 nM tRNA<sup>Sec</sup>, e de forma análoga SelA foi titulada ao complexo contendo 50 nM SerRS e 50 nM tRNA<sup>Sec</sup>. As concentrações de ATP e L-serina utilizada em seus respectivos experimentos foram de 100 nM.

Os resultados foram processados pelo *software* Origin 8.6 e ajustados com a equação de *Hill* para obter a constante de dissociação aparente ( $K_d$ ) e a constante de *Hill* ( $n$ ) de acordo com a seguinte equação:(76)

$$r = r_0 + (r_f - r_0) \times \frac{([Proteína])^n}{(K_d)^n + ([Proteína])^n} \quad (2)$$

Onde  $r$  é o valor de anisotropia ( $r_0$  e  $r_f$  correspondem aos valores inicial e final, respectivamente) e o índice  $[Proteína]$  é a concentração de proteína titulada. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

### 3.10 Experimentos de Ultracentrifugação Analítica para a formação do complexo SelB.GTP.tRNA

Para confirmar a estequiometria da interação e verificar os valores de constantes de dissociação obtidos pela técnica de anisotropia de fluorescência para as interações do tipo SelB.tRNA, utilizou-se a técnica de ultracentrifugação analítica. Os experimentos de ultracentrifugação analítica (AUC) 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) com um rotor Proteome Lab XL-I (220-240 VAC, 50 Hz) e auxílio das Dra. Ana Carolina Figueiredo e Dra. Fernanda Batista.

A técnica de Ultracentrifugação Analítica (*Analytical Ultracentrifugation* - AUC) é

uma poderosa técnica biofísica utilizada para analisar o comportamento de macromoléculas biológicas. Em termos gerais, a Ultracentrifugação Analítica permite o monitoramento constante da sedimentação de macromoléculas em função do tempo quando submetidas a um campo centrífugo uniforme.

Quando partículas em um tubo são submetidas à centrifugação em velocidade constante  $\omega$ , estas possuem a tendência de migrar para o fundo do recipiente com uma velocidade constante, chamada de velocidade de sedimentação  $u$ . A velocidade de sedimentação de uma partícula está intrinsicamente relacionada com sua massa, coeficiente de atrito, e densidades da partícula da solução. Desta forma, é definida a constante de sedimentação de Svedberg ao relacionar a velocidade de sedimentação com a velocidade de rotação da seguinte maneira:(77)

$$S = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{m(1-\bar{v}\rho)}{NA.f} = \frac{MD(1-\bar{v}\rho)}{RT} \quad (3)$$

Em que  $r$  corresponde à posição radial,  $\bar{v}$  é o volume parcial específico,  $m$  é a massa molecular da partícula,  $\rho$  é a densidade da solução,  $f$  é definido como coeficiente friccional,  $N_A$  é o número de Avogadro,  $D$  é o coeficiente de difusão e  $R$  é a constante universal dos gases.

Para uma comparação qualitativa de coeficientes de sedimentação provenientes de diferentes amostras em diferentes tampões, usualmente é realizado uma normalização para o estado padrão da água a 20 °C. Este coeficiente de sedimentação padronizado ( $S_{20,w}$ ) é obtido da seguinte maneira:

$$S_{20,w} = S_{T,B} \left( \frac{\eta_{T,B}}{\eta_{20,w}} \right) \frac{(1-\bar{v}\rho)_{20,w}}{(1-\bar{v}\rho)_{T,B}} \quad (4)$$

Em que T e B representam as condições experimentais em relação à temperatura e tampão e as condições padrões são representadas pelo índice  $20,w$ .

A variação da concentração de espécies em solução em função da posição radial e do tempo pode ser descrita pela Equação de *Lamm* da seguinte maneira:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[ rD \frac{\partial c}{\partial r} - s\tilde{\omega}r^2 c(r, t) \right] \quad (5)$$

Onde o parâmetro  $c(r,t)$  é a função que relaciona a concentração de migração e difusão de uma partícula em função do raio ( $r$ ) e tempo ( $t$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão da partícula em solução e  $\omega$  é a velocidade angular do rotor.

À medida que a partícula é depositada no fundo do tubo durante o experimento de ultracentrifugação analítica, o monitoramento de sua absorvância é realizado de forma instantânea por meio da detecção por um monocromador que é acoplado ao sistema. Desta maneira, a concentração de uma partícula pode ser quantificada constantemente em função da posição radial.

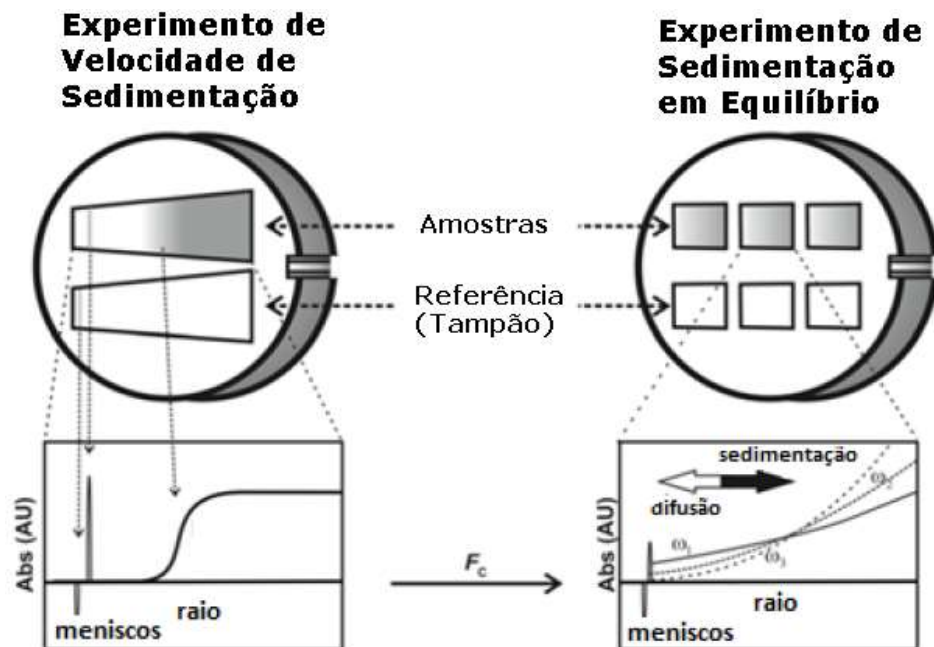


Figura 14 – Aparato experimental para o experimento de ultracentrifugação analítica.  
Fonte: Adaptada de BORGES; RAMOS.(78)

### 3.10.1 Experimento de Velocidade de Sedimentação

A técnica de velocidade de sedimentação que utiliza de rotações em altas velocidades foi utilizada para se determinar o coeficiente de sedimentação da proteína SelB bem como como esta constante é alterada na presença de  $tRNA^{Sec}$ . A formação do complexo SelB. $tRNA^{Sec}$  na presença de GTP deve deslocar os valores de constante de sedimentação para valores maiores, uma vez que o coeficiente de sedimentação é diretamente proporcional à massa molecular e forma da molécula.

Para as análises de velocidade de sedimentação foram ainda selecionados 5 diferentes tRNAs mutantes com mutações nas regiões mais relevantes para a interação com SelB: mutantes no braço aceptor, D-loop, T $\psi$ C, braços variáveis, bem como o mutante com braço

variável deletado e tRNA<sup>Ala</sup> como controlo negativo. Os ensaios foram realizados para SelB apo na concentração de 9,8  $\mu$ M. Já os complexos SelB.GTP.tRNAs foram testados a uma razão molar de 3 SelB : 1 tRNA utilizando tampão E (100mM fosfato de potássio pH 7,0; 0,5 mM EDTA; 150 mM NaCl; 5 mM MgSO<sub>4</sub>) como referência.

Os experimentos de velocidade de sedimentação foram realizadas 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. Com o intuito de analisar o efeito que os tRNAs acarretam sobre a proteína, o monitoramento de absorção foi realizado no comprimento de onda de 280 nm utilizando tampão E como referência. A escolha do monitoramento a 280 nm se deve ao objetivo de quantificar a sedimentação da proteína, e não do tRNA, desta forma, apenas a absorção referente à proteína é computada.

Os valores teóricos para as constantes relacionadas à densidade e viscosidade a partir do tampão experimental foram calculados pelo programa Sednterp.(79) Para a interpretação da absorção radial, todas as curvas resultantes foram ajustadas pelo programa SEDFIT utilizando o modelo de distribuição contínua  $c(S)$ .(80)

### 3.10.2 Experimento de Equilíbrio de Sedimentação

Com a finalidade da obtenção de constantes de dissociação para a comparação com os dados já obtidos pelas técnicas anteriores, foram realizadas as medidas da interação de SelB com tRNA<sup>Sec</sup> em diferentes estequiometrias na presença de GTP. A técnica de equilíbrio de sedimentação é caracterizada pelo equilíbrio entre as forças de sedimentação e difusão presentes em baixas rotações.

As medidas de equilíbrio de sedimentação foram obtidas em passos de 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 para assegurar o equilíbrio. As medidas foram realizadas a 25 °C com monitoramento no comprimento de onda de 280 nm.

Foram selecionados complexos de SelB com 3 diferentes tRNAs para o experimento de equilíbrio: tRNA<sup>Sec</sup>, Var1 e tRNA<sup>Ala</sup> utilizando tampão E como referência. Em especial, foi investigada a contribuição da estrutura do braço variável para a formação deste complexo, como sugerido por técnicas anteriores. Para tal, os experimentos de equilíbrio também foram realizados com o mutante do tRNA<sup>Sec</sup> com braço variável deletado.

Como o monitoramento da sedimentação foi realizado a 280 nm (correspondente à absorção da proteína), o fator limitante para a concentração foi a quantidade de proteína em



solução, já que o equipamento opera com boa faixa de precisão em concentrações dados por absorbância de até  $Abs = 1$  u.a..

As concentrações de tRNA<sup>Sec</sup>, tRNA<sup>Sec</sup> com braço variável deletado (Var1) e tRNA<sup>Ala</sup> foram mantidas constantes a 0,34  $\mu$ M e foram adicionadas quantidades variáveis de SelB na proporção molar final de 0,5:1, 1:1 e 2:1 de proteína:tRNA, respectivamente. Para o tratamento do conjunto de dados do experimento de equilíbrio foi utilizado o *software* SEDPHAT.(80)

Como já é caracterizado pela literatura, a proteína SelB se apresenta em forma monomérica em solução, portanto as análises de equilíbrio foram realizadas utilizando o modelo  $A + B = AB$ , sendo então calculados os valores de constante de dissociação para cada complexo. Os valores teóricos dos parâmetros de viscosidade e densidade foram calculados pelo programa Sednterp.(79)

### **3.11 Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética qualitativa em condições nativas**

Para corroborar com os resultados interação de SelB com tRNA<sup>Sec</sup> foram realizados ensaios de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética qualitativa em condições nativas. 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*” fazem uso de géis de agarose ou poliacrilamida com a finalidade de realizar a separação de uma mistura contendo proteínas ligadas a DNA ou RNA. Assim é possível investigar a formação destes complexos moleculares pelas diferenças de tamanho apresentadas no gel de análise.(22, 77)

Os ensaios de deslocamento de Mobilidade Eletroforética foram realizados monitorando moléculas de tRNA<sup>Sec</sup> marcadas com fluoresceína a 1  $\mu$ M e titulando SelB, em concentração saturante de GTP (100  $\mu$ M), em proporções estequiométricas de (1:0,5; 1:1 e 1:2). A separação foi realizada em gel de agarose 2% livre de RNases, corado com 10% de SyBr Safe (ThermoFisher) com a aplicação de tensão de 80 V, e corrente de 400 mA por 120 minutos a 4 °C. Os resultados foram observados utilizando o fotodocumentador Gel DocTM XR + Gel (BioRad) utilizando comprimento de onda de 470 nm.

### 3.12 Ensaios de estabilidade térmica de SelB por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de calorimetria diferencial de varredura consiste na análise da estabilidade térmica de macromoléculas biológicas a partir do monitoramento dos valores de temperatura de *melting* ( $T_m$ ) entre as transições de estados. O monitoramento do  $T_m$  da amostra é realizado através de fornecimento de calor à amostra numa taxa constante à pressão constante, o que acarreta no incremento da temperatura dentro de um intervalo específico. Em casos de proteína, em uma determinada temperatura a amostra perde sua conformação estrutural nativa por meio do processo denominado desnaturação térmica. Quanto maior o ponto médio de transição térmica, dado por  $T_m$ , mais estável é a molécula. A técnica de DSC tem como objetivo medir a variação de entalpia ( $\Delta H$ ) durante o processo de desnaturação térmica induzida pela variação do calor específico à pressão constante ( $C_p$ ).

Diversas macromoléculas biológicas tem a capacidade de formar estruturas bem definidas. A formação destas estruturas está diretamente relacionada à temperatura em solução, dentre outros fatores. O rearranjo estrutural ocasionado pela variação da temperatura resulta na absorção do calor causado pela redistribuição de ligações não covalentes. Esta absorção de calor é então o objetivo de medida dos calorímetros de DSC.

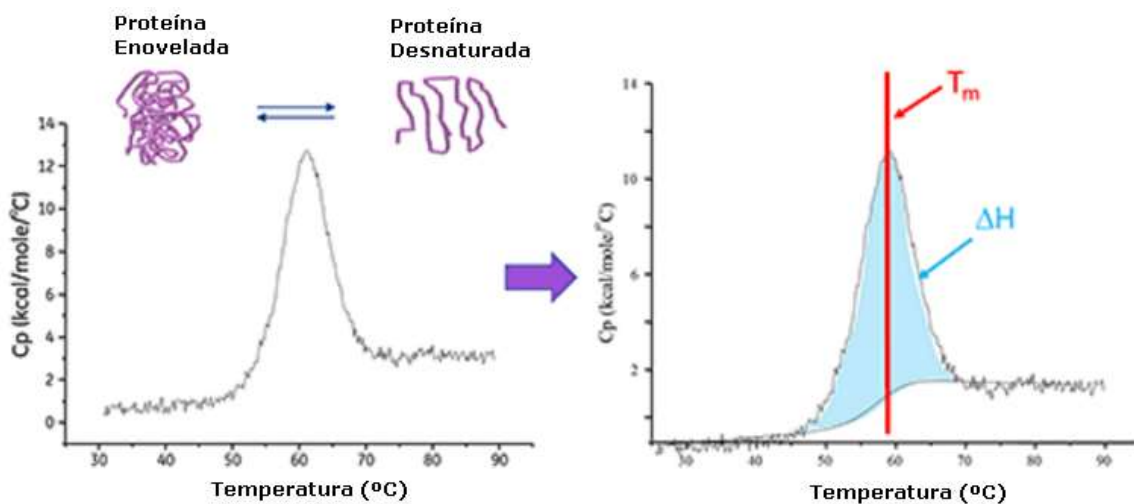


Figura 15 – Esquema de transição de fase pelo monitoramento da variação da capacidade térmica por Calorimetria de Varredura Diferencial.

Fonte: Adaptada de MALVERN.(81)

Uma vez determinado o valor de  $T_m$  para a proteína SelB, é então determinado como o valor da temperatura de *melting* é afetada na presença dos tRNAs, sendo possível determinar características energéticas da formação destes complexos.

Utilizou-se a calorimetria diferencial de varredura (DSC) para caracterizar a estabilidade de SelB e seus complexos com nucleotídeos (GTP e GDP) e os complexos com diferentes tRNAs através da determinação da transição da temperatura de *melting* e das entalpias de desenovelamento associadas. Os experimentos de DSC foram realizados em colaboração com o Dr. Luís 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 instrumental antes dos experimentos de desenovelamento da proteína para registrar o histórico térmico do calorímetro. Os termogramas de DSC de proteína SelB e dos complexos SelB.tRNA foram registrados apenas durante o primeiro scan após 15 minutos de equilíbrio da amostra à temperatura de partida. Esta medida única para cada scan se deu pois após a perda de estrutura havia agregado de proteína em solução. A concentração de SelB utilizada foi de 7 µM, as concentrações de GTP, GDP foram de 100 µM. Já as concentrações de tRNA<sup>Sec</sup> e demais mutantes foram de 14 µM. O volume de amostra necessário para a realização das medidas é de 500 µL, o que foi um fator limitante para as escolhas de concentração de trabalho uma vez que a proteína SelB e os tRNAs possuem baixos rendimentos de purificação.

Após a subtração de tampão 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.(43,53)

### 3.13 Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) é um método analítico para a determinação de estruturas de macromoléculas a baixa resolução. O espalhamento a baixo ângulo é obtido pelo espalhamento elástico gerado por uma partícula quando a esta é incidido um feixe monocromático de raios-X. Ao contrário do que ocorre na difração de cristalografia por raios-X em que as partículas são organizadas tridimensionalmente em forma periódica de um cristal, o espalhamento a baixo ângulo é obtido para amostras em solução,

onde as partículas estão ao acaso, em movimento browniano.(82) Desta forma, apesar da baixa resolução dos resultados obtidos, a técnica de SAXS é extremamente útil para fornecer informações de alta precisão quanto ao tamanho e fórmula de moléculas, além de ser um método alternativo para a resolução estrutural de moléculas que não cristalizam ou não difratam.(83)

O padrão de espalhamento é obtido em função do módulo do vetor de espalhamento,  $q$  dado por:

$$q = \frac{4\pi \sin(\theta)}{\lambda} \quad (6)$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda do feixe incidente e  $2\theta$  é o ângulo de espalhamento.

Para um sistema de partículas espalhadoras em soluções bem diluídas, a intensidade de espalhamento  $I(q)$  é proporcional à forma das partículas em solução.

Desta forma, assumindo que as partículas não interagem entre si, temos que para quando a amplitude do vetor de espalhamento  $q$  se aproxima de zero, a intensidade de espalhamento pode ser descrita pela aproximação de *Guinier*:

$$I(q) \approx I(0) \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (7)$$

Onde  $R_g$  corresponde ao raio de giro da partícula e pode ser obtido quando  $q \rightarrow 0$  pelo intercepto do ajuste linear do gráfico de *Guinier* ( $\ln I(q)$ ) e  $I(0)$  é o valor da intensidade quando o ângulo é zero. Esta relação é válida somente para quando  $qR_g < 1,3$ .

Para a interpretação das informações estruturais que a intensidade de estrutura carrega consigo, é necessário realizar a Transformada de *Fourier* do perfil de espalhamento para obter a distribuição das distâncias interatômicas,  $p(r)$ , que é dado por:

$$p(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty q I(q) \sin(rq) dq \quad (7)$$

Com base na função de distribuição  $p(r)$  é possível obter toda a informação estrutural. A partir desta função, é possível gerar modelos de envelope proteico *ab initio* para as moléculas em estudo, o que pode servir como molde para comparação com estruturas em alta resolução de estruturas homólogas já conhecidas.

Os experimentos de Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) foram

coletados na linha de luz SAXS1 no Laboratório Nacional de Sincrotrão (LNLS/CNPEM - Campinas, Brasil) em colaboração com o Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto (Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu). A configuração experimental utilizada se deu pela utilização de feixes de  $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$  e com distância de 1.033 mm em relação ao detector bidimensional MarCCD (MarXperts). As análises SAXS de SelB foram realizadas em duas condições diferentes: SelB.GTP e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e em concentrações finais de 2,2 mg/mL e 1,0 mg/mL de proteína e concentração equimolar de tRNA. As medidas foram realizadas em tampão E a 25 °C.

As amostras de proteínas e o tampão a ser subtraído foram obtidos como uma média de 3 scans de 30 segundos cada, e a dispersão residual referente ao tampão foi subtraída dos espalhamentos das amostras. A obtenção e processamento inicial dos dados foram realizados pelo programa FIT2D,(84) em que as curvas de espalhamentos tiveram as contribuições do tampão subtraídas e normalizadas pela intensidade do feixe. O tratamento dos dados foi realizado através do pacote do programa ATSAS. As análises das curvas experimentais foram realizadas pelo programa PRIMUS (85) e as curvas teóricas para as curvas de espalhamento foram obtidas pelo programa CRY SOL.(86) Os raios de giro ( $R_g$ ) e a função de distribuição de distâncias  $p(r)$  foram obtidos pela Transformada de *Fourier* implementada no programa GNOM.(87) Além disso, a massa molecular teórica foi calculada pelo servidor SAXSMoW.(88) A partir das curvas de dispersão foram gerados 10 reconstruções independentes para obtenção de modelos de baixa resolução *ab initio* através de DAMMIF.(89) O programa SUPCOMB foi utilizado para realizar a superposição adequada destes modelos *ab initio* com modelos de estruturas de alta resolução obtidos por cristalografia de raios-X.(90) Por fim, o programa CRY SOL foi utilizado para gerar as curvas teóricas de SAXS para realizar a comparação com os resultados experimentais. Os envelopes de SAXS de SelB e complexo SelB.tRNA foram analisados no PyMOL.(61)

### **3.14 Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (NS-EM) para a formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup>**

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo se baseia na deposição de partículas sobre um filme, geralmente feito de carbono. Sobre a amostra é depositado um sal metálico composto por material eletronicamente denso, como por exemplo, urânio na forma de acetato de uranila. O contraste negativo é realizado por meio da imagem de diferença, ou seja, a imagem depositada sobre o filme de carbono gera uma imagem em

branco no padrão observado. As imagens são então obtidas pela diferença de contraste gerado entre a amostra analisada e o material de fundo, ou *background*.



Figura 16 – Representação esquemática do princípio da microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo. A imagem é obtida pela região ocupada pela proteína na camada de acetato de uranila.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> na estequiometria de 1:1:1 foi previamente incubado por 20 min a 25 °C em tampão 50 mM fosfato de potássio pH 7,4; 500 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM 2-mercaptoetanol; 2% glicerol.

As amostras SerRS, SelA e tRNA<sup>Sec</sup> foram purificadas e quantificadas como descrito previamente. Uma alíquota de 3 µL foi depositada por 30 segundos 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 uL de acetato de uranila 2% foi utilizado para o recobrimento da amostra por 1 minuto e posteriormente secado com a utilização de papel filtro e cerca de 5 minutos ao ar em temperatura ambiente.

As imagens foram coletadas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Tecnai G2F20 HRTEM single-tilt operando em 200 KV em uma camera TIA (FEI) de alta resolução utilizando 1 segundo de exposição e -5 µm de *defocus* e x60,000 de magnificação

Os experimentos de contraste negativo foram coletadas no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) DEMa / UFSCar.

### 3.15 Ensaios de Cristalização da proteína SelB

A cristalização de proteínas foi primeiramente observada por L. Hünefeld em 1840 na Universidade de Leipzig na Alemanha, em trabalhos com mioglobina.(91) A partir de 1934, J. D. Bernal e Dorothea Crowfoot Hodgkin mostraram que cristais de proteínas são capazes de produzir um padrão de interferência construtiva ao ser difratado por feixe de raios-X.

A cristalização de cristais de proteínas é um fenômeno dependente de uma diversidade de parâmetros como concentração, solubilidade, sais, temperatura e da própria estrutura tridimensional das moléculas, uma vez que estruturas extremamente flexíveis dificilmente se organizam na forma de cristais. O crescimento de um cristal de uma macromolécula se dá quando uma solução supersaturada atinge lentamente um estado termodinamicamente estável por meio da deposição organizada e periódica.

O método mais comum utilizada para o crescimento de cristais é o método de difusão de vapor. Este procedimento consiste na deposição de uma gota contendo a macromolécula a ser cristalizada a um reservatório com a mesma solução em concentração maior. Por meio de difusão de vapor a gota contendo a macromolécula tende a equilibrar sua pressão de vapor com a da solução do reservatório. Desta forma, a gota tem uma redução de seu volume o que leva ao aumento da concentração da macromolécula o que torna a cristalização possível na condição de supersaturação. Os métodos mais comuns que se utilizam da difusão de vapor são as técnicas da gota pendurada (*hanging drop*) e da gota sentada (*sitting drop*).<sup>(92)</sup> Estes dois métodos se diferenciam apenas na forma em que a gota é depositada no recipiente. No caso da gota pendurada, a gota cuja solução contém a macromolécula a ser cristalizada é depositada na parte superior do recipiente, já no caso da gota sentada, a gota é depositada em uma superfície plana próxima à solução do poço (Figura 17).

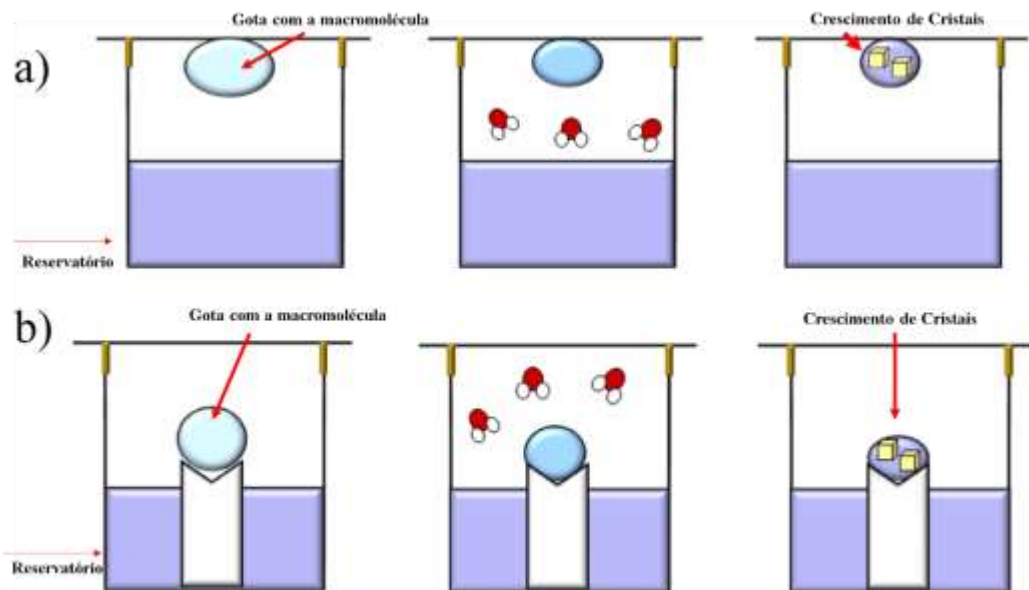


Figura 17 – Representação Esquemática das principais técnicas de crescimento de cristais por difusão de vapor. a) gota pendurada (*hanging drop*); b) gota sentada (*sitting drop*).

Fonte: Adaptada de KRAUSS et al.<sup>(93)</sup>

Para os testes iniciais de cristalização, a proteína SelB foi utilizada na concentração de 2 mg/mL e o seu complexo foi submetido ao teste de cristalização com concentração equimolar de tRNA. Em ambos os casos foram realizados em tampão E com excesso de GTP (100  $\mu$ M). A triagem inicial das condições de cristalização se deu por meio da utilização dos kits comerciais de cristalização Crystal Screen HT, Index HT (HAMPTON RESEARCH), JCSG-plus HT-96, MIDAS (Molecular Dimensions). O método utilizado foi o de gota sentada com o uso do robô *Honeybee* 939 (DigiLab) por meio da triagem de 96 condições contendo 0,2  $\mu$ L de solução de proteína e 0,2  $\mu$ L de solução tamponante para cada kit utilizado.



## 4 ANÁLISE DO tRNA<sup>Sec</sup>

### 4.1 Obtenção do tRNA específico (tRNA<sup>Sec</sup>) e seus mutantes

#### 4.1.1 Amplificação e transcrição do tRNA específico, tRNA<sup>sec</sup>

O gene *selC* foi amplificado e o tRNA<sup>Sec</sup>, transcrito utilizando o kit comercial Megashortscript T7 (Ambion), obtendo o tRNA<sup>sec</sup> específico para incorporação de selenocisteínas.

O gene foi amplificado por PCR e posteriormente, esse fragmento foi utilizado 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 18).

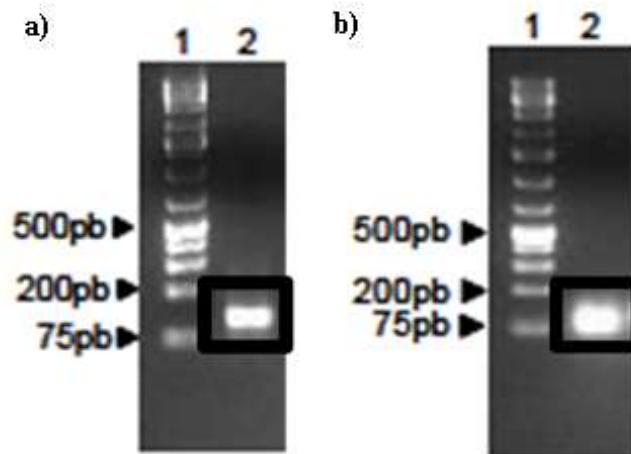


Figura 18 – Obtenção *in vitro* do gene *selC*: a) Amplificação e produtos da reação de transcrição. (A) Resultado da amplificação do gene *selC*. 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) gene *selC* de *E. coli* (121 pb); b) Produtos da reação de transcrição *in vitro* após procedimento de purificação. 1) padrão de massa molecular 1 kb Plus (Fermentas); 2) tRNA<sup>Sec</sup> (*SelC*) de *E. coli* (95 bases). As caixas pretas indicam as bandas desejadas para cada experimento.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.1.2 Amplificação e transcrição dos tRNAs mutantes

Assim como foi realizado para gene *selC*, os genes dos mutantes também foram amplificados e transcritos utilizando o kit comercial Megashortscript T7 (Ambion).

Para a comprovação da amplificação por meio de PCR e transcrição *in vitro* destes tRNAs, novamente utilizou-se de eletroforeses em gel de agarose 2% (Figura 19).

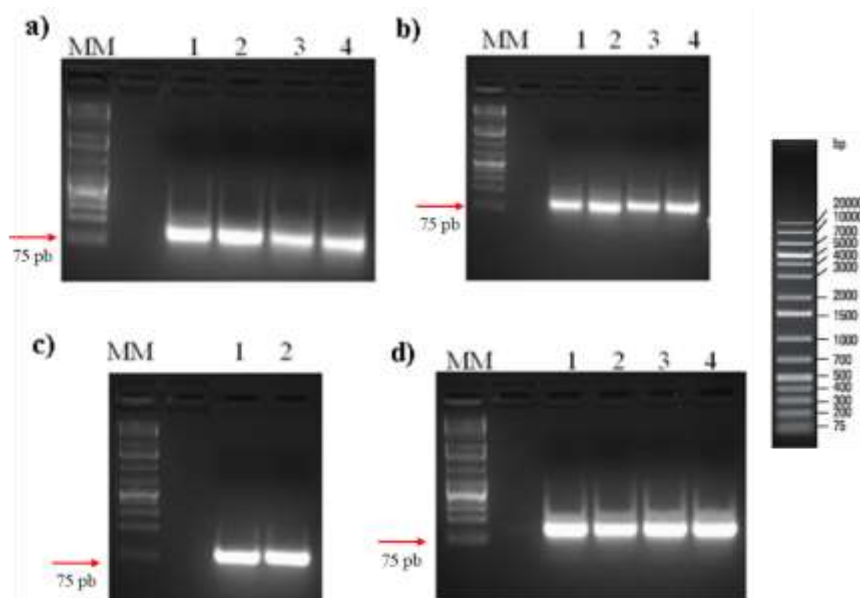


Figura 19 – Amplificação de genes para tRNAs mutantes: a) 1,2: mutante do braço acceptor; 3,4: mutante do braço T $\Psi$ C; b) 1,2: mutante do braço variável deletado (Var1); 3,4: mutante do braço variável (Var2); c) tRNA<sup>Ala</sup>; d) 1,2: mutante do anticódon; 3,4 mutante do braço D.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 4.2 Análise do enovelamento de tRNAs por Dicroísmo Circular

O genes codificantes para o tRNA<sup>Sec</sup> e mutantes foram amplificados por PCR e, subsequentemente, transcritos obtendo assim os tRNAs enovelados. Para assegurar que os RNAs estão devidamente enovelados, foram realizados experimentos de dicroísmo circular, uma vez que estes tRNAs têm estruturas secundárias resultando em curvas características no monitoramento de uma função de temperatura. Parte dos tRNAs foram submetidos ao protocolo de marcação com fluoróforo para experimentos de interação com as proteínas SelB e SerRS.

Para verificar o estado de enovelamento do tRNA<sup>Sec</sup>, ensaios de dicroísmo circular foram realizados, uma vez que a estrutura secundária dessa macromolécula apresenta o perfil de curva em “S” característica para tRNAs em função da temperatura, obtendo um padrão de enovelamento análogo ao descrito em trabalhos envolvendo análises de ácidos nucleicos por dicroísmo circular (Figura 20).

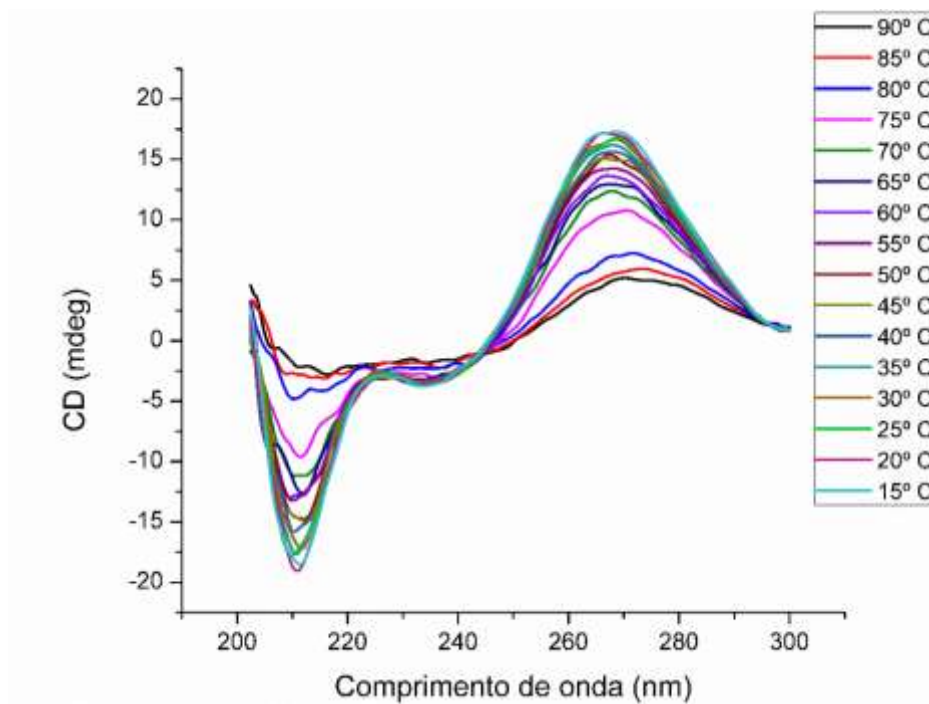


Figura 20 – Espectros de dicroísmo circular devido às mudanças conformacionais ocorridas em função da variação de temperatura para tRNA<sup>Sec</sup> de *E. coli* sintetizado *in vitro*. As diferentes cores representam as mudanças na elipsidade em função da temperatura de 90 °C (inicial) a 15°C (final).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mesmo procedimento foi realizado para analisar o estado de enovelamento dos tRNAs mutantes. O espectro de dicroísmo circular em função da temperatura para cada um dos tRNAs mutantes pode ser verificado pela Figura 21 a seguir:

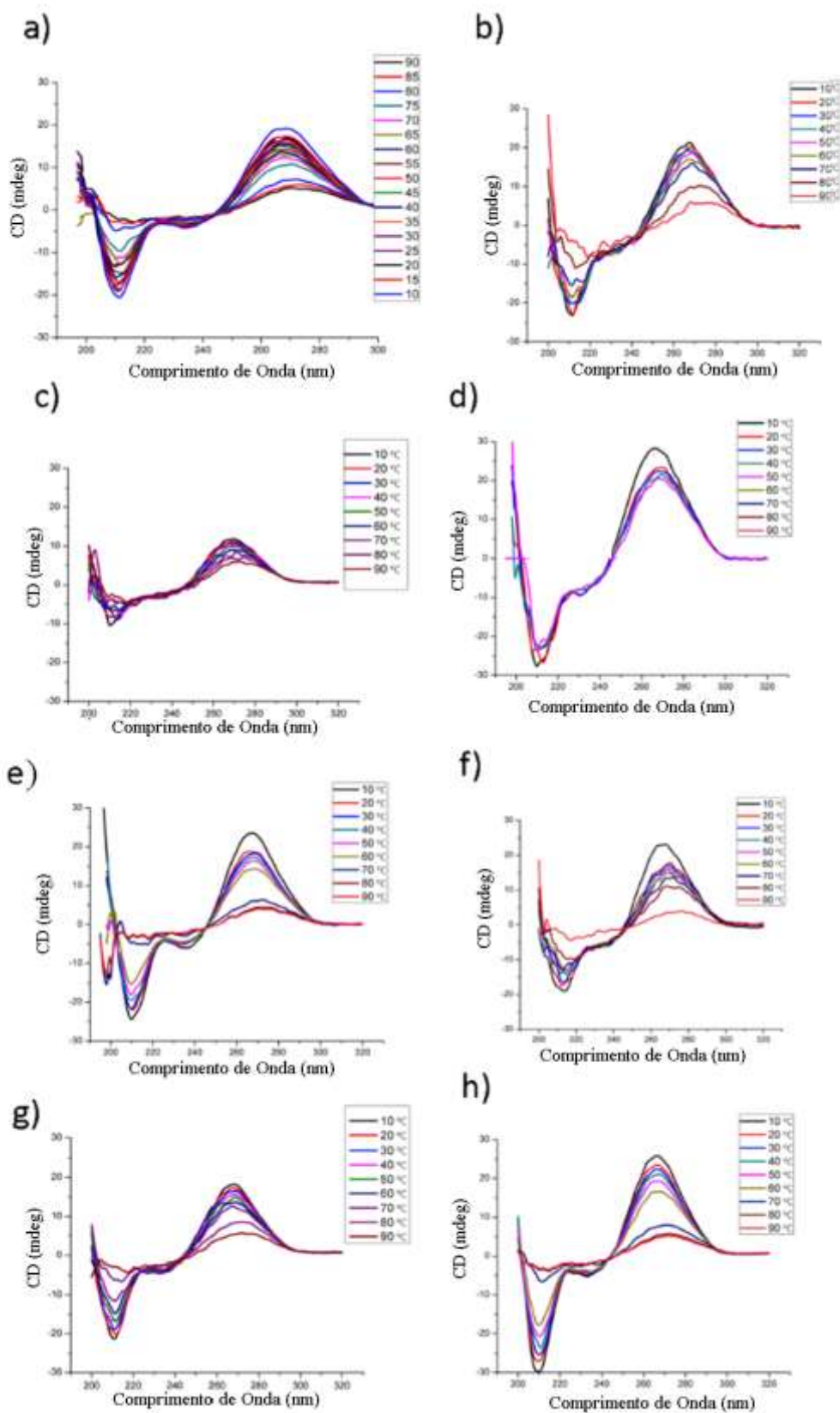


Figura 21 – Espectros de dicroísmo circular em função da variação de temperatura para os tRNAs mutantes: a) tRNA<sup>Sec</sup>; b) tRNA<sup>Acceptor</sup>; c) tRNA<sup>Ala</sup>; d) tRNA<sup>Anti</sup>; e) tRNA<sup>D-loop</sup>; f) tRNA<sup>TψC</sup>; g) tRNA<sup>Var1</sup>; h) tRNA<sup>Var1</sup>.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir das curvas de CD para os tRNAs, é possível calcular a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) por meio do monitoramento da elipsidade em um comprimento de onda específico. Neste caso, o valor de CD no comprimento de onda de 268 nm foi anotado em cada temperatura como pode ser verificado na Figura 22 a seguir:

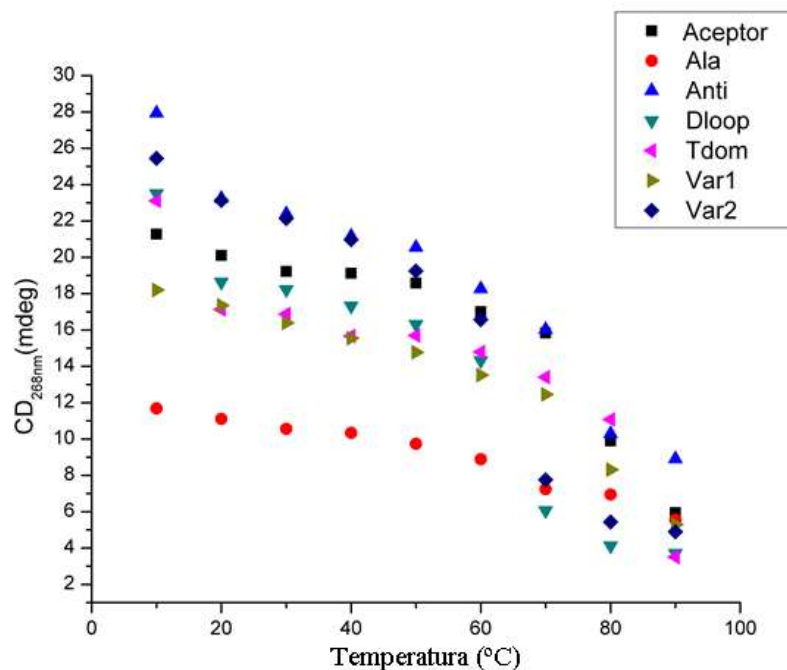


Figura 22 – Monitoramento do valor de dicróismo circular no comprimento de onda de 268 nm em função da temperatura por meio do ajuste de *Boltzmann*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como o tRNA sofre uma transição conformacional do estado enovelado para o desenovelado com o aumento da temperatura (o contrário é observado pelo decréscimo de temperatura), é possível realizar um ajuste por meio da função de *Boltzmann*, uma vez que é um processo reversível para a determinação de valores esperados para o  $T_m$  de cada tRNA como pode ser observado a seguir:

Tabela 5 – Valores de temperatura de *melting* calculados pelo ajuste de *Boltzmann* a partir do monitoramento de  $CD_{268nm}$ .

tRNA	$T_m$ (°C)
tRNA <sup>Sec</sup>	62,4 ± 2,2
tRNA <sup>Acceptor</sup>	70,3 ± 2,5
tRNA <sup>Anti</sup>	53,3 ± 3,4
tRNA <sup>D-loop</sup>	52,3 ± 3,5
tRNA <sup>TyrC</sup>	59,2 ± 5,6
tRNA <sup>Var1</sup>	65,6 ± 2,6
tRNA <sup>Var2</sup>	57,2 ± 2,2
tRNA <sup>Ala</sup>	59,0 ± 1,8

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota-se claramente que para todos os tRNAs, os valores calculados para  $T_m$  são superiores a 52 °C. Este resultado será posteriormente de grande valia para as análises de estabilidade térmica realizada pelo experimento de DSC.

## 5 ANÁLISE BIOFÍSICA DE SelB E SEUS COMPLEXOS

### 5.1 Análise Bioinformática - SelB

A construção de um modelo teórico para a proteína SelB foi motivada pela inexistência de estruturas resolvidas de SelB de *Escherichia coli*. Para a construção deste modelo, foi utilizado o programa I-TASSER (Zhang Lab) tomando como molde a estrutura da proteína análoga *A. aeolicus* sob o código PDB ID 4ZU9.

Além disto, o modelo resultante para SelB foi submetido ao programa MolProbity (Duke Biochemistry) para a determinação do gráfico de Ramachandram. Este apresentou 97,4% dos resíduos em regiões favoráveis e 99,2% em regiões permitidas.

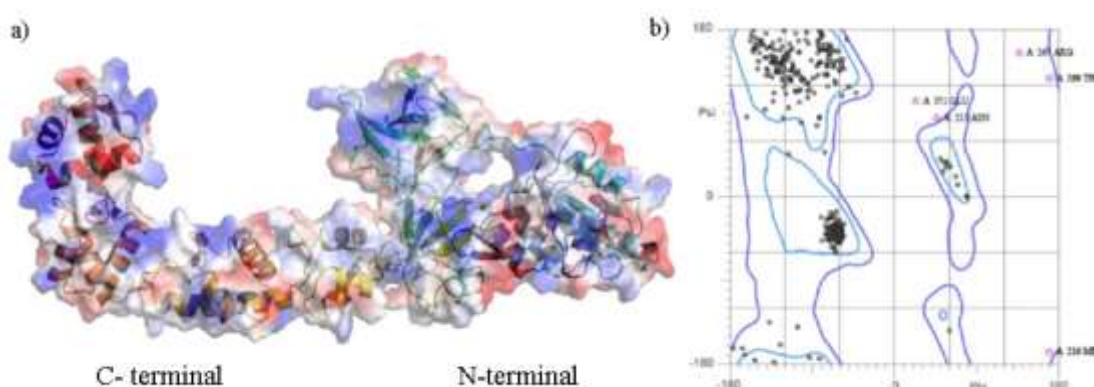


Figura 23 – Obtenção de modelo estrutural para SelB: a) Modelo estrutural de SelB de *E. coli* gerado pelo programa I-TASSER (Zhang Lab). b) Gráfico de Ramachandram validando a qualidade do modelo gerado pela disposição de 97,4% dos resíduos do modelo em regiões favoráveis.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo obtido apresenta cada um dos domínios com enovelamento esperado apresentando em sua estrutura composta majoritariamente por  $\alpha$ -hélices, além de possuir um formato alongado, o que é característico para esta proteína. É possível distinguir região de ligação ao GTP (porção N-terminal), a região de ligação ao tRNA (porção C-terminal) e uma região extremamente flexível que conecta à porção C-terminal, presente apenas em bactérias e responsável pelo reconhecimento ao elemento SECIS.

A porção N-terminal, responsável pela interação com GTP, possui enovelamento conservado como todo fator de alongação. A porção C-terminal é constituída por 4  $\alpha$ -hélices, (denominadas *winged-helix domains*) sendo que as  $\alpha$ -hélices WHD3 e WHD4 estão conectadas por uma região flexível com as  $\alpha$ -hélices da extremidade N-terminal, WHD1 e

WHD2.

Através da análise de superfície eletrostática realizada por meio do software PYMOL, pode-se verificar a distribuição de cargas positivas (representado em azul na Figura 23). Estas regiões positivas estão dispostas majoritariamente na porção de ligação ao GTP na extremidade N-terminal e nas regiões de interação ao tRNA<sup>Sec</sup> e ao elemento SECIS. Como citado anteriormente, é proposto uma região com cargas positivas na junção das  $\alpha$ -hélices WHD1 e WHD2 em relação às WDH3 e WDH4. Este resultado está de acordo com o previsto, pois estas regiões de interação a RNAs devem sofrer alterações conformacionais na presença de GTP durante a tradução no ribossomo.

## **5.2 Obtenção do Fator de Elongação Específico (SelB)**

### **5.2.1 Expressão e purificação do Fator de Elongação SelB**

O plasmídeo pT7-6 SelBH6 contendo o gene *selB* foi transformado em cepas de propagação e, posteriormente, nas cepas de expressão *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460. Após este processo, o plasmídeo foi novamente purificado por kit de extração de DNA plasmidial (CellCo) para a confirmação da presença do inserto por meio da técnica de PCR.

O protocolo de amplificação por meio da PCR é idêntico ao descrito na Seção 3.2.1 e o resultado pode ser verificado através de eletroforese em gel de agarose 1% de uma banda correspondente ao gene *selB* de interesse (1850 pb) representada na Figura 24.



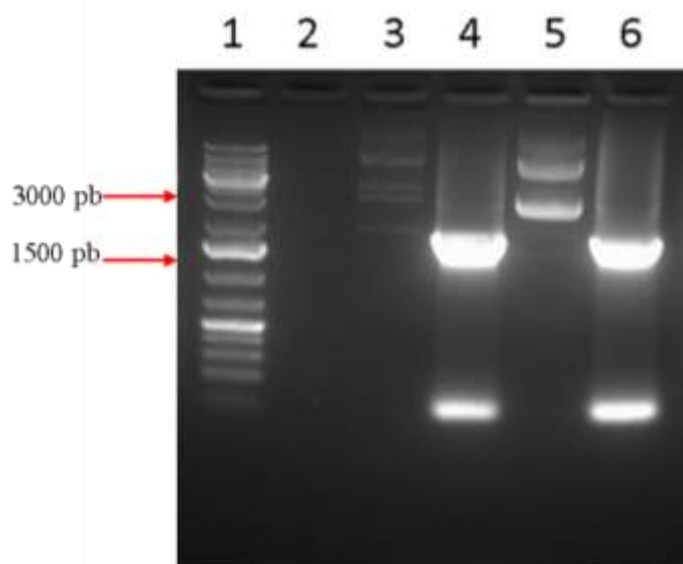


Figura 24 – Amplificação do gene *selB* em pT7-6 SelBH6 de *Escherichia coli*. À esquerda: Através de PCR, o fragmento correspondente ao gene de interesse (1850 pb). 1) Marcador de massa molecular Gene Ruler 1Kb Plus; 4) e 6) Amplificação de *selB* no tamanho esperado de ~1850 pb (BL21 e WL81460, respectivamente); 3) e 5) Controle - plasmídeo pT7-6 (3075 pb) contendo o incerto. À direita: padrão de marcador de massa molecular utilizado para todos os géis de agarose.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As amostras obtidas a partir das metodologias de superexpressão e purificação, anteriormente descritas, foram aplicadas a um gel SDS-PAGE 15% para verificar a presença da proteína recombinante de interesse. O gel revelou a presença de uma banda intensa a ~ 69 kDa correspondente a SelB (Massa Teórica = 68,9 kDa), que foi ainda confirmada por análise de espectrometria de massa (Figura 24-a).

Estes experimentos foram realizados por digestão em gel com adição de tripsina (Sigma) com identificação de peptídeos pela digestão a partir do gel. Os resultados de espectrometria de massa apresentaram cobertura de 52%.

As condições ideais para a expressão foram obtidas, prosseguindo-se então para o processo de purificação da proteína SelB ao qual pode ser verificado por gel SDS-PAGE 15%, como verificado na Figura 25-a a seguir. A purificação se deu inicialmente por cromatografia de afinidade em coluna de  $\text{Co}^{2+}$ , seguida por cromatografia por exclusão molecular utilizando o sistema ÅKTA. Os cromatogramas obtidos por esta etapa de purificação podem ser observados pela Figura 25-b.

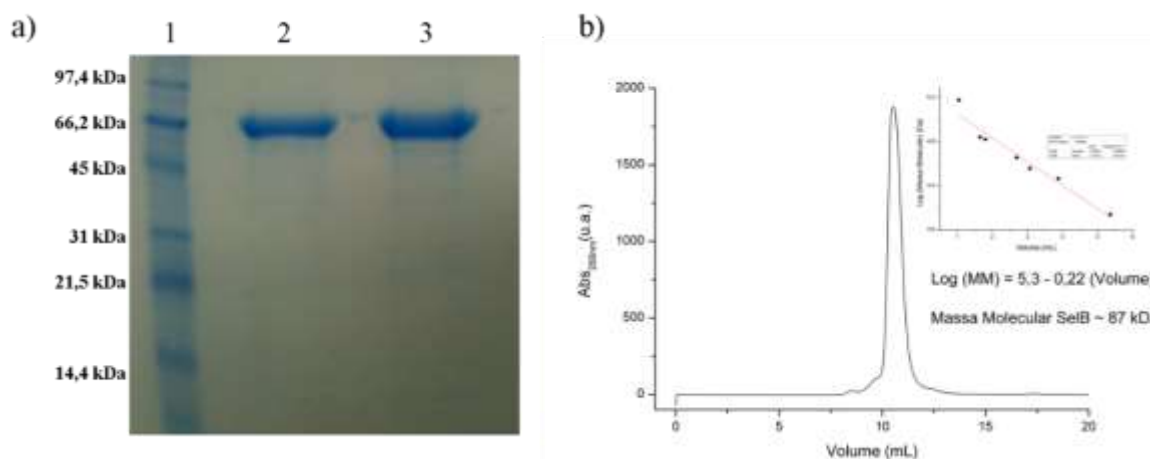


Figura 25 – Purificação de SelB: a) Obtenção após cromatografia por exclusão molecular: 1) Marcador molecular; 2) SelB expressa em sistema *E. coli* BL21; 3) SelB expressa em sistema *E. coli* WL81460. b) cromatograma relativo à purificação por exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/30* (GE). *Inset*: curva de calibração a partir de pesos moleculares conhecidos. Os cromatogramas da purificação em ambas as cepas se apresentaram semelhantes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 5.2.2 Quantificação da presença de nucleotídeos endógenos

Como amplamente já descrito, SelB possui a capacidade de interagir com RNAs.(11-13,47) Portanto, é esperado que eventualmente nucleotídeos endógenos pudessem ser copurificados durante o processo de obtenção da proteína. Para quantificar a presença de RNAs endógenos foi utilizado o espectrofotômetro Qubit<sup>®</sup> e os resultados das concentrações de RNAs medidos antes e após a adição de RNase podem ser observados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6 – Quantidades de RNAs presentes após o processo de purificação.

Condição	[RNA] (ng/ $\mu$ L)	$\frac{[\text{RNA}_{\text{final}}]}{[\text{RNA}_{\text{inicial}}]}$
<i>E. coli</i> BL21 (Antes do tratamento com RNase A)	1416	100%
<i>E. coli</i> BL21 37 °C (1h após o tratamento com RNase A)	994	70%
<i>E. coli</i> BL21 37 °C (Tratamento com RNase por 18 h)	0	0
<i>E. coli</i> WL81640 (Antes do tratamento com RNase A)	1198	100%
<i>E. coli</i> WL81640 37 °C (1h após o tratamento com RNase A)	409	34%
<i>E. coli</i> WL81640 37 °C (Tratamento com RNase por 18 h)	0	0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio desta análise, foi verificado que a proteína SelB é copurificada com a presença de RNAs endógenos, o que confirmou a hipótese anteriormente levantada. Pode-se notar que 1 h após a adição de RNase, a amostra expressa em cepa *E. coli* BL21 apresentava cerca de 70% da concentração inicial de RNAs, enquanto que para o mesmo tempo a amostra proveniente da cepa *E. coli* WL81460 continha 34% dos RNAs copurificados.

É observado que em 18 h após a adição de RNase ambas as cepas se apresentam completamente livre de RNAs endógenos. A partir destes resultados, a etapa adicional com tratamento de RNase A por 18 h foi adicionado ao processo de purificação de SelB.

Além disto, foi observado que ao final deste tratamento as amostras provenientes de ambas as cepas não apresentavam mais RNAs endógenos, o que tornou indiferente a utilização de uma ou outra cepa de expressão. Portanto, como a expressão da proteína SelB proveniente da cepa *E. coli* BL21 apresentou maior rendimento proteico, esta foi a única cepa utilizada para posteriores expressão e purificação de SelB.

### 5.2.3 *Western Blot* para SelB

A confirmação da obtenção da proteína SelB em cada etapa do processo de purificação foi realizada por meio da técnica de *Western Blot*.

Como a proteína SelB utilizada neste trabalho possui uma cauda de hexa-histidina fusionada à sua porção C-terminal, foram realizados experimentos com anticorpos contra His-TAG, desta forma a cauda é utilizada como sonda para o monitoramento da presença da proteína. O resultado de *Western Blot* pode ser observado pela Figura 26 a seguir:

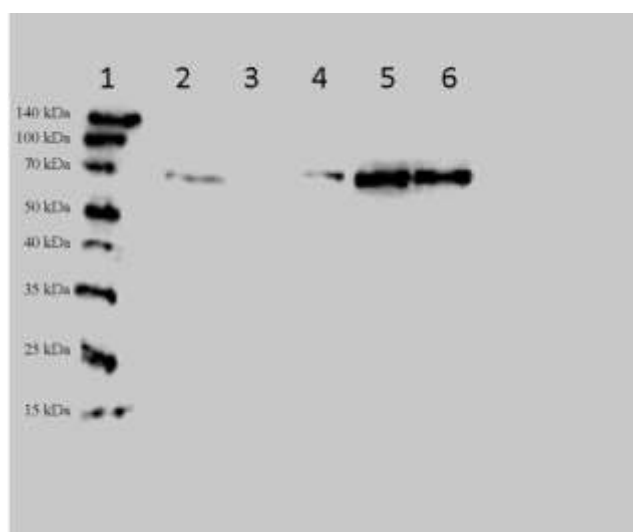


Figura 26 – Ensaio de *Western Blot* para o monitoramento da purificação de SelB: 1) Marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2) Sobrenadante injetado na coluna de cromatografia de afinidade; 3) Fração eluída diretamente da coluna sem adição de imidazol; 4) Lavagem da coluna com 10 mM de imidazol; 5) Eluição da amostra com 100 mM de imidazol; 6) Após cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/300* acoplada ao sistema ÄKTA (GE).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado, SelB está presente em quantidades identificáveis nas frações de maior interesse, em especial na fração eluída pela cromatografia de exclusão molecular. Após esta etapa de confirmação da presença de SelB em adjunto aos resultados de espectroscopia de massas, pode-se garantir a obtenção da proteína e prosseguir com os experimentos de interação.

### 5.2.4 Comparação das cepas de expressão de SelB por Dicroísmo Circular (CD)

Para verificar o enovelamento e com a finalidade de comparar o padrão estrutural entre as duas cepas analisadas, as amostras foram submetidas ao experimento de dicroísmo

circular (CD). Através deste, foi possível identificar a presença de estruturas secundárias, o que indica o correto enovelamento da proteína como descrito na literatura (Figura 27).(71)

O cálculo do percentual de estruturas secundárias para SelB proveniente de cada uma das cepas analisadas foi realizado por meio do programa CDNN (Applied Photophysics). As quantidades estimadas do conteúdo de estruturas em  $\alpha$ -hélices foram de 98,4% para *E. coli* BL21 e 99,3% para *E. coli* WL81460. Além disto, foi estimado um percentual de 1,6% para a cepa *E. coli* BL21 e 0,7% para estruturas do tipo alça.

Como pode ser observado, o padrão de dicroísmo circular para a proteína SelB é muito semelhante tanto para a cepa *E. coli* BL21 quanto para *E. coli* WL81460. O perfil de dicroísmo circular obtido é característico de estruturas  $\alpha$ -hélices, o que era de se esperar, dado ao grande número de  $\alpha$ -hélices que compõem SelB.

Posteriormente, SelB proveniente das cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460 foram submetidas a experimentos de variação térmica (VT-CD) em mesmas condições experimentais. Por meio do monitoramento dos mínimos em 222 nm, é possível verificar um leve deslocamento dos valores de  $T_m$ s referentes a cada cepa de expressão. Por meio do ajuste de *Boltzmann*, é calculado um valor de  $T_m$  de  $(48,2 \pm 0,4)$  °C para a cepa *E. coli* BL21 e para a cepa *E. coli* WL81460 foi calculado um  $T_m$  de  $(48,0 \pm 0,5)$  °C.

Considerando-se as margens de erros, os valores de temperatura de *melting* para cada cepa de expressão utilizada se apresentaram equivalentes, indicando que não há diferença na estabilidade térmica na escolha de uma cepa ou outra.

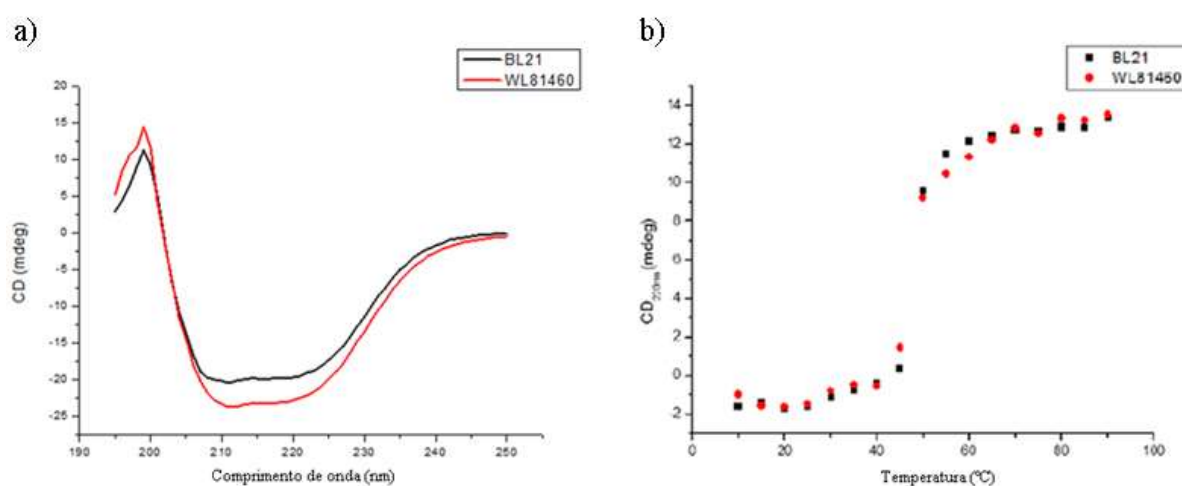


Figura 27 – Verificação do arranjo de estruturas secundárias por meio de ensaios de CD: a) Espectro de dicroísmo circular apresentando o padrão de estruturas secundárias indicando o enovelamento obtido para a proteína SelB obtida a partir das cepas *E. coli* BL21 e *E. coli* WL81460. b) Monitoramento dos máximos de CD no comprimento de onda de 222 nm pelo ajuste de *Boltzmann*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com estes resultados, foi determinado que para as próximas análises apenas a cepa *E. coli* BL21 será utilizada como meio de expressão para a proteína SelB.

Além das análises de dicroísmo circular evidenciando que não há alteração da estabilidade térmica entre as cepas, as análises de Qubit após o tratamento de RNase indicam que em ambas as cepas a proteína é obtida na ausência de RNA endógeno. A escolha da cepa *E. coli* BL21 foi realizada por ser uma cepa que apresenta maior rendimento na expressão proteica.

### 5.2.5 Determinação de nucleotídeos endógenos e quantificação do consumo de GTP por HPLC

Como já descrito pela literatura, a proteína SelB tem a capacidade de se ligar a nucleotídeos de guanina.(43,53) Desta maneira, ensaios de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) foram realizados para investigar a presença destes nucleotídeos que possam vir copurificados durante o processo de obtenção de SelB.

A quantificação de GTP e GDP foi realizada pelo monitoramento no comprimento de onda de 253 nm. Como pode ser observado pela Figura 28-a não foi possível identificar a presença de nucleotídeos de GTP ou GDP copurificados com amostras SelB.

Este resultado gerou a necessidade da adição de GTP em todos os posteriores experimentos de interação, uma vez que a proteína SelB só é ativa com seu sítio de ligação ao GTP ativado.(43,53)

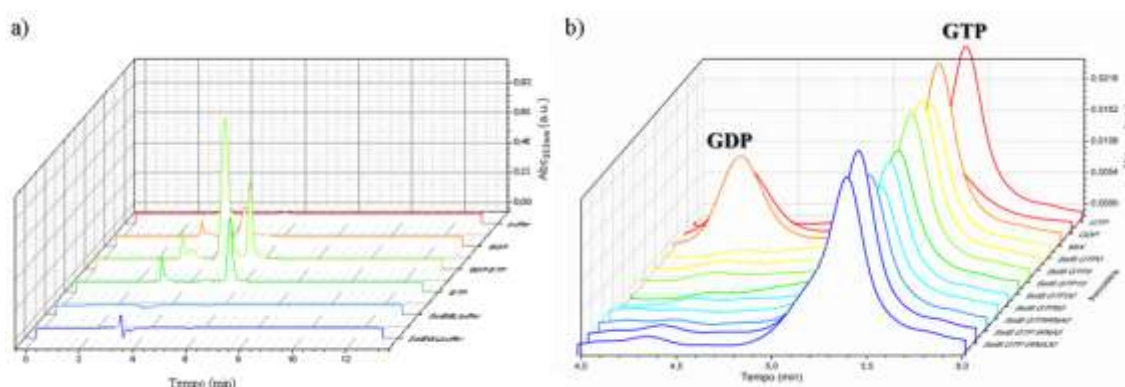


Figura 28 – Quantificação de GTP em solução por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC): a) Determinação da ausência de GTP ou GDP endógenos que eventualmente poderiam ser copurificados; b) Análise do não consumo de GTP ao longo do tempo na temperatura de 25 °C por HPLC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Posteriormente foi analisado o consumo de GTP em função do tempo com o uso do HPLC (Figura 28-b). Como pode ser verificado, não há considerável consumo de GTP e consequentemente formação de GDP ao longo dos 60 min analisados a 25 °C. Este resultado é observado tanto para o complexo SelB.GTP quanto para o complexo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.GTP. Com base nestes resultados é possível garantir que nas análises posteriores em que são adicionadas GTP, não haverá a hidrólise deste nucleotídeo, o que garante uma estrutura estável na formação do complexo SelB.GTP e demais complexos envolvendo essa macromolécula

Uma vez verificado que a proteína SelB é purificada na ausência de GTP e que o enovelamento das proteínas obtidas a partir das duas cepas de interesse neste trabalho é muito semelhante, os ensaios CD e DSC foram empregues para investigar a estabilidade térmica de SelB na presença de nucleotídeos.

### 5.3 Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca para SelB

Uma vez determinada a estabilidade e formação do complexo SelB.GTP, foram realizadas experimentos de interação com RNAs específicos utilizando a metodologia de Espectroscopia de Fluorescência Intrínseca (IFS). Os espectros de emissão dos resíduos de triptofano da proteína SelB após tratamento com RNase são mostrados na Figura 29-a.

Inicialmente, concentrações crescentes de tRNA<sup>Sec</sup> foram tituladas em SelB cuja fluorescência intrínseca foi monitorada. A intensidade dos máximos de emissão foi decaindo em função da titulação de tRNA<sup>Sec</sup> devido à oclusão dos resíduos de triptofano causada pela interação com este tRNA. Correlacionando os valores de intensidade máxima para a concentração em função do tRNA<sup>Sec</sup> titulado, foi possível obter uma curva de interação. Através do tratamento utilizando o ajuste pela função *Hill*, foi possível determinar o valor de  $K_d = (250 \pm 60)$  nM e o índice de cooperatividade  $n = (1,7 \pm 0,7)$ . Estes resultados indicam não-cooperatividade na formação SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.

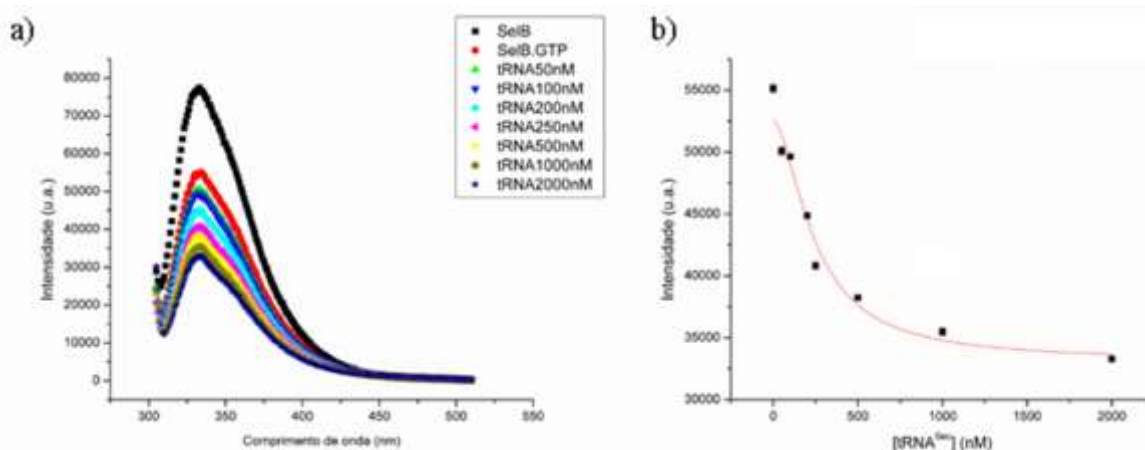


Figura 29 – Monitoramento da oclusão de resíduos aromáticos por Fluorescência Intrínseca: a) Espectro de emissão de resíduos aromáticos. É possível observar que a intensidade de emissão decai com a adição de tRNA<sup>Sec</sup>; b) Ajuste de *Hill* por meio do monitoramento dos máximos de emissão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5.4 Interação por Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência

Para os experimentos de anisotropia foram investigadas a formação dos complexos do tipo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SelA. O aumento da anisotropia indica a formação do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> em solução e o perfil sigmoidal resultante é característico de moléculas biológicas interagentes em solução. Utilizando o ajuste da função *Hill* foi possível determinar os valores de  $K_d = (283,3 \pm 52,8)$  nM e  $n = (1,4 \pm 0,6)$  para a titulação de SelB em GTP.tRNA<sup>Sec</sup> previamente incubados (Figura 29-b), resultados estes que corroboram os dados obtidos pela análise de IFS.

A curva tem duas transições que podem estar relacionadas ao fato de SelB ter dois domínios interagindo com RNAs, e em altas concentrações, levam a interação não específica do tRNA com o domínio de interação ao SECIS (domínio C-terminal).

Para determinar a ordem dos eventos, 50 nM SelA.tRNA<sup>Sec</sup> previamente preparados na cubeta recebeu titulações crescentes de SelB em excesso de GTP (10  $\mu$ M) e os valores de anisotropia devido ao aumento de massa ocasionado pela formação do complexo ternário foram registrados (Figura 30).



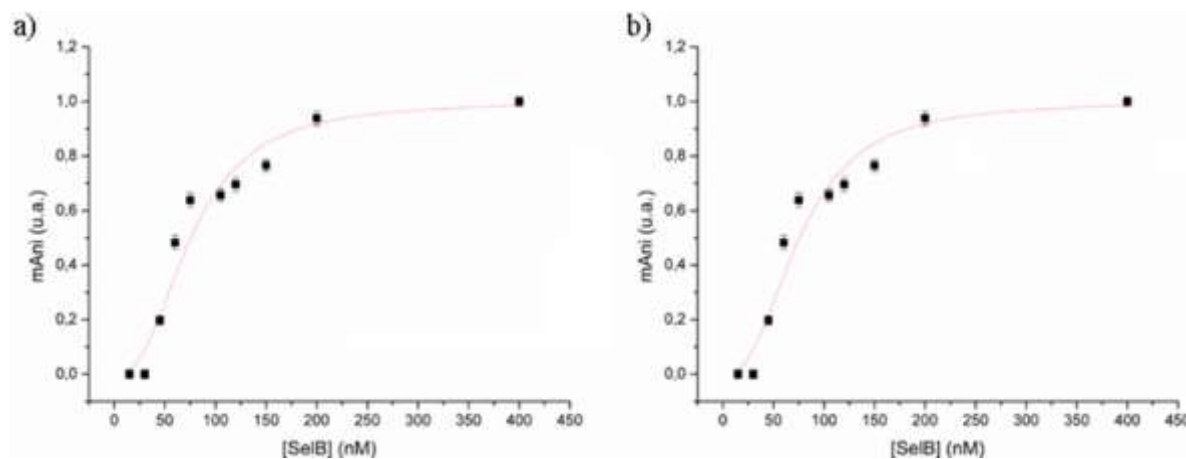


Figura 30 – Curvas de anisotropia de fluorescência. a) Titulação de SelB em tRNA<sup>Sec</sup>; b) Titulação de SelB em SelA.tRNA<sup>Sec</sup>. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através do processamento dos dados obtidos pelas curvas de anisotropia pelo ajuste de *Hill*, obtém-se o valor de constante de dissociação aparente de  $K_d = (75,8 \pm 5,1)$  nM para a formação do complexo SelB.GTP.SelA.tRNA<sup>Sec</sup>. Este valor de constante de dissociação obtido para a interação de SelB ao complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup> já montado é inferior aos valores observados para outros complexos e tem com índice de cooperatividade  $n = (2,5 \pm 0,4)$  indicando cooperatividade positiva.

Desta forma é possível inferir uma hipótese de ordem de incorporação de Sec através de eventos através das constantes obtidas. Por meio destes resultados, 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>.

A interação de SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> é facilitada pela presença de SelA, dado o baixo valor de constante de dissociação e ao índice de cooperatividade obtidos para esta interação. Este fato é 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.(5)

De forma semelhante, os ensaios de FAS foram realizados com os tRNAs mutantes (Figura 31). Foram obtidos os valores das constantes de dissociação dos complexos através do ajuste de *Hill*. Todas as constantes são representadas na Tabela 7.

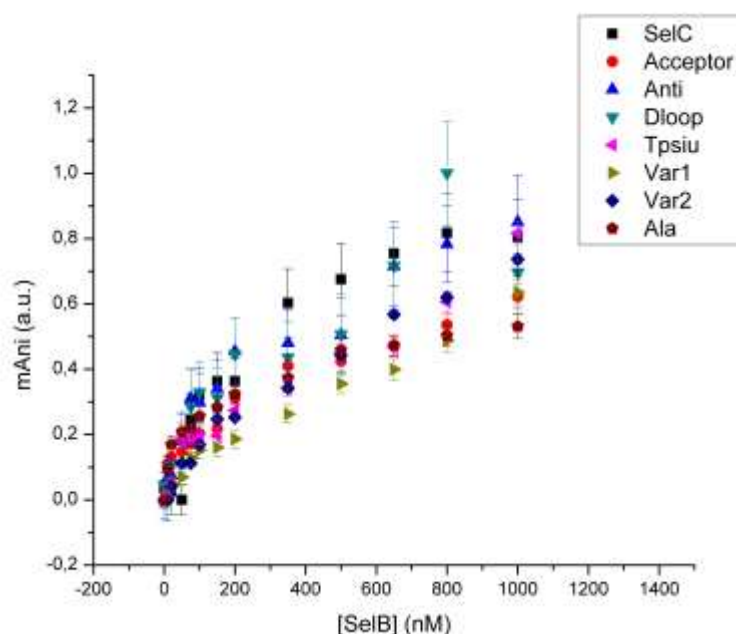


Figura 31 – Curva de anisotropia resultantes da titulação de SelB em tRNAs na presença de GTP indicando a formação de complexos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados foram processados pelo *software* Origin 8.6 por meio do ajuste da Equação de *Hill* a fim de se obter a constante de dissociação aparente ( $K_d$ ) e a constante de *Hill* ( $n$ ) de acordo com a Equação de *Hill* (Equação 2). Os valores calculados para  $K_d$  e  $n$  a partir da Equação de *Hill*, bem como a qualidade de seu ajuste dado por  $r^2$  podem ser verificados pela Tabela 7 a seguir:

Tabela 7 – Constantes de interação para a formação de complexos do tipo SelB.tRNAs mutantes

Complexo	$K_d$ (nM)	$n$	$r^2$
SelB.tRNA <sup>Sec</sup>	$266,8 \pm 27,5$	$1,4 \pm 0,4$	0,97
SelB.tRNA <sup>Acceptor</sup>	$583,6 \pm 88,7$	$0,8 \pm 0,1$	0,91
SelB.tRNA <sup>Anti</sup>	$269,4 \pm 28,8$	$0,9 \pm 0,1$	0,96
SelB.tRNA <sup>D-loop</sup>	$284,7 \pm 42,4$	$0,9 \pm 0,1$	0,92
SelB.tRNA <sup>T<math>\psi</math>C</sup>	$500,7 \pm 69,3$	$1,0 \pm 0,1$	0,91
SelB.tRNA <sup>Var1</sup>	$720,7 \pm 90,2$	$1,1 \pm 0,2$	0,90
SelB.tRNA <sup>Var2</sup>	$491,1 \pm 43,7$	$1,2 \pm 0,1$	0,95
SelB.tRNA <sup>Ala</sup>	$645,8 \pm 129,4$	$0,6 \pm 0,1$	0,91

Fonte: Elaborada pelo autor.

Através dos resultados obtidos, pode-se classificar as interações SelB.tRNA mutantes em dois grupos, aqueles que pouco alteram os valores das constantes de dissociação e aqueles em que a mudança é mais significativa.

No primeiro grupo, as mutações que aumentam ligeiramente o valor da constante estão nos braços Anti e D-loop. Estes resultados eram esperados, uma vez que é descrito que a proteína SelB não deve interagir ao tRNA<sup>Sec</sup> por estas regiões. Portanto, as mutações dos ribonucleotídeos que constituem os braços anti e D-loop de tRNA<sup>Sec</sup> por ribonucleotídeos equivalentes em tRNA<sup>Ser</sup> não devem afetar na interação com SelB. Com base na Tabela 7, verifica-se que os valores de constante de dissociação aparente obtidos para os mutantes nos braços Anti e D-loop são de  $K_d = (269,4 \pm 28,8)$  nM e  $K_d = (284,7 \pm 42,4)$  nM, respectivamente. Estes valores são ligeiramente superiores ao caso SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> possivelmente pelo fato das mutações causarem pequenas alterações na estrutura secundária do tRNA, o que acarreta na formação de um complexo menos compacto. Estes resultados serão posteriormente analisados por ultracentrifugação analítica.

Por outro lado, alguns dos tRNAs mutantes analisados na interação com SelB apresentam maiores valores de constante de dissociação aparente. Os tRNAs mutantes que compõem este grupo são os que foram submetidos a mutações nos braços acceptor, T $\psi$ C e braço variável. Estes tRNAs mutantes apresentam uma diminuição considerável da afinidade para a proteína SelB se comparado ao tRNA<sup>Sec</sup>. Como esperado, as mudanças nas estruturas de Acceptor e T $\psi$ C de fato perturbam a interação, como foi descrito anteriormente. Além disto, por meio destes experimentos podemos inferir que o braço variável adicional também diminui a afinidade, mostrando que está diretamente relacionado à interação com SelB. Os mutantes em braço acceptor e T $\psi$ C apresentaram constante de dissociação aparente de  $(583,6 \pm 88,7)$  nM e  $(500,7 \pm 69,3)$  nM respectivamente. Já o tRNA de alanina tomado como controle apresentou uma constante de  $K_d = (645,8 \pm 129,4)$  nM. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o dobramento específico '8-5' do tRNA<sup>Sec</sup> é uma característica estrutural essencial para a correta acomodação do tRNA ao fator de alongação analisado.

Além destes, verifica-se que a interação de SelB com o tRNA cujo braço variável foi substituído pelo braço variável do tRNA de serina (tRNA<sup>Var2</sup>) apresentou constante de dissociação aparente de  $K_d = (491,1 \pm 43,7)$  nM, enquanto o tRNA em que esta estrutura foi completamente deletada (tRNA<sup>Var1</sup>) apresentou uma constante de interação  $K_d = (720,7 \pm 90,2)$  nM. Estes resultados levam a conclusão de que tanto a presença quanto a sequência específica do braço variável de tRNA<sup>Sec</sup> são fatores importantes para a afinidade com a proteína SelB.

A importância do braço variável para o reconhecimento de SelB não era elucidada ao início deste trabalho de mestrado, portanto, foram realizados esforços para inferir a participação desta estrutura para a interação de SelB como será descrito posteriormente.

Recentemente, estudos estruturais por criomicroscopia confirmaram que o braço variável presente no tRNA<sup>Sec</sup> está diretamente relacionado ao reconhecimento ao Fator de Elongação de Selenocisteína.(11) Entretanto em seu trabalho, Niels Fischer e colaboradores apresentam uma análise estrutural para a formação deste complexo.(11) Este projeto de mestrado corrobora com a literatura ao realizar uma análise biofísica para a formação deste complexo em solução.

## **5.5 Análise de Ultracentrifugação Analítica**

### **5.5.1 Análise de Velocidade de Sedimentação**

Com a finalidade de aprofundar na caracterização da formação de complexos do tipo SelB.GTP.tRNA obtidos por Fluorescência de Anisotropia, foram realizados ensaios de Velocidade de Sedimentação por Ultracentrifugação Analítica.

Para o experimento de Velocidade de Sedimentação, a proteína SelB e os complexos com tRNA<sup>Sec</sup>, e os mutantes nos braços acceptor, D-loop, T $\psi$ C, braço variável deletado (Var1), bem como tRNA<sup>Ala</sup> como controle negativo de interação foram submetidos à sedimentação a um campo centrífugo uniforme, conforme descrito na Seção 3.10.1.

Os dados brutos foram coletados (ANEXO 1) e posteriormente processados pelo programa SEDFIT.(80) Os picos relativos às concentrações de diferentes populações em função da posição radial podem ser observados pela Figura 32 a seguir:

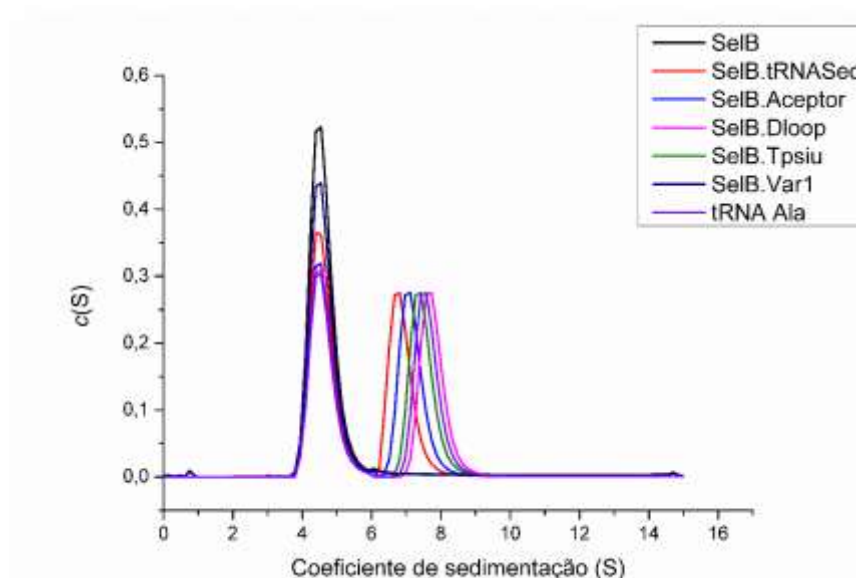


Figura 32 – Picos correspondentes à proteína SelB e complexos para o experimento de velocidade de sedimentação a 25 °C na rotação de 40.000 rpm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser verificado pela Figura 32, os experimentos de Ultracentrifugação Analítica apresentaram 2 picos, sendo estes relativos a presença de duas distintas populações em solução: proteínas livres e proteínas interagindo com tRNA

As constantes biofísicas resultantes relativas ao coeficiente de sedimentação em função da concentração, massa molecular e raio de *Stokes* podem ser observadas pela Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 – Valores de constantes biofísicas calculadas para as soluções das Equações de *Lamm* pelo programa SEDFIT.

Amostra	sw (S)	sw(20,w) (S)	MM (Da)	Rs (nm)
SelB	4,507	4,779	63,426	3,17
SelB.tRNA <sup>Sec</sup>	6,894	7,310	119,984	3,91
SelB.tRNA <sup>Aceptor</sup>	7,147	7,579	126,656	3,99
SelB.tRNA <sup>D-loop</sup>	7,671	8,134	140,830	4,13
SelB.tRNA <sup>TψC</sup>	7,252	7,690	129,467	4,02
SelB.tRNA <sup>Var1</sup>	4,674	4,957	66,994	3,22
SelB.tRNA <sup>Ala</sup>	7,556	8,012	137,671	4,10

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados da Tabela 8 indicam o valor da constante de sedimentação obtida para proteína SelB de  $sw(20,w) = 4,779$  S. Os demais valores desta coluna são relativos às constantes de sedimentação para cada complexo, uma vez que em todos os casos o pico relativo à proteína estava presente.

O valor do coeficiente de sedimentação obtido pelo segundo pico para a amostra contendo SelB.tRNA<sup>Sec</sup> é de  $sw(20,w) = 7,310$  S. Tomando este valor como referência, é possível verificar que os demais complexos com outros tRNAs apresentaram valores de constantes de sedimentação maiores. Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que o coeficiente de sedimentação depende, além de outros fatores, da forma da molécula em análise. O tRNA<sup>Sec</sup> é o tRNA que possui a estrutura mais adequada para a interação com SelB se comparado com os demais tRNAs, dados já confirmados por anisotropia de fluorescência. Desta forma, é possível distinguir dois complexos com valores próximos de constante de dissociação aparente por meio da obtenção de distintos coeficientes de sedimentação.

O principal resultado das análises de velocidade de sedimentação se dá pela análise da formação do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Var1</sup>. Neste caso, há a presença apenas do pico referente à proteína (Figura 32), e os valores correspondentes na Tabela 8 se devem a deconvolução do mesmo. Desta forma, conclui-se que a ausência do braço variável acarreta numa grande perda de interação com a proteína SelB, a ponto deste complexo não ser observado pela experimento de velocidade de sedimentação.

Estes resultados estão de acordo com as conclusões obtidas por anisotropia de fluorescência, o que nos leva a propor uma regra que o reconhecimento do tRNA<sup>Sec</sup> por SelB é realizado não por duas estruturas, mas sim por uma tríade composta pelo braço acceptor, braço T $\psi$ C e braço variável extra.

### 5.5.2 Análise de Equilíbrio de Sedimentação

Como já descrito na Seção 3.10.2, foram realizados experimentos de equilíbrio de sedimentação da proteína SelB em complexo com alguns tRNAs.

Com o objetivo de confrontar os dados de interação obtidos por anisotropia de fluorescência e velocidade de sedimentação, experimentos de equilíbrio de sedimentação foram realizados para auxiliar na investigação da importância do braço variável para o reconhecimento de SelB. Dado em vista que a estrutura do braço variável se apresentou relevante para a interação com SelB, o que até então não era previsto pela literatura, passou-se

a analisar o efeito que a deleção desta estrutura acarreta perda de afinidade para a interação. Para isto, estes experimentos foram conduzidos em três diferentes estequiometrias com três diferentes complexos: SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, SelB.tRNA<sup>Var1</sup> e SelB.tRNA<sup>Ala</sup>. Os dados brutos foram coletados (ANEXO 1) e processados pelo programa SEDPHAT com uso do modelo  $A + B = AB$ .(80) Os resultados para as constantes de dissociação obtidos podem ser observados na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9 – Valores de constantes de dissociação para formação de complexos obtidos pelo SEDPHAT.

<b>Amostra</b>	<b><math>K_d</math> (nM)</b>	<b>rmsd</b>
0,5 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	230,21	0,02
1 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	261,03	0,04
2 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	277,93	0,04
$K_d$ médio = 256,39		
0,5 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	610,93	0,03
1 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	629,74	0,01
2 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	629,92	0,05
$K_d$ médio = 623,53		
0,5 SelB : 1 tRNA <sup>Var1</sup>	794,33	0,02
1 SelB : 1 tRNA <sup>Var1</sup>	700,12	0,05
2 SelB : 1 tRNA <sup>Var1</sup>	773,19	0,02
$K_d$ médio = 755,88		

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como observado, os valores de constante de dissociação para os complexos SelB.tRNA<sup>Var1</sup> e SelB.tRNA<sup>Ala</sup> ( $K_{dmédio} = 623,53$  nM e  $K_{dmédio} = 755,88$  nM respectivamente) se apresentam maiores do que o valor da constante no caso do complexo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, que é de  $K_{dmédio} = 256,39$  nM.

Apesar deste aumento no valor de  $K_d$ , o que reflete na perda de afinidade, o valor de  $K_d$  obtido ainda está na faixa de baixo nanomolar. Estes valores podem ser comparados com os valores obtidos pelo experimento de anisotropia de fluorescência. Se analisarmos a formação

do complexo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, obteve-se por anisotropia o valor de constante de dissociação de  $K_d = (266,8 \pm 27,5)$  nM enquanto para o experimento de equilíbrio o valor de constante de dissociação obtido foi de  $K_d = 277$  nM. A mesma comparação pode ser feita para a formação dos complexos SelB.tRNA<sup>Ala</sup> e SelB.tRNA<sup>Var1</sup> em que os valores de constantes de dissociação obtidos por anisotropia de fluorescência foram de  $K_d = (645,8 \pm 129,4)$  nM e  $K_d = (720,7 \pm 90,2)$  nM, respectivamente, e para o experimento de equilíbrio, os valores obtidos foram de  $K_d = 623,53$  nM e  $K_d = 755,88$  nM, respectivamente. Os valores obtidos por estas duas técnicas diferentes são equivalentes entre si, e dão maior garantia nos valores obtidos para as constantes, indicando que o evento medido realmente é um fenômeno experimental e não é influenciado por limitações técnicas.

### 5.6 Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética qualitativa em condições nativas

A análise da formação do complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> por Deslocamento de Mobilidade Eletroforética em gel de agarose foi realizado em três diferentes estequiometrias. Este experimento foi realizado para confirmar a interação, desta forma é possível acompanhar em géis como a mobilidade do tRNA é afetada na presença da proteína SelB. Estes resultados podem ser observados pela Figura 33 a seguir:

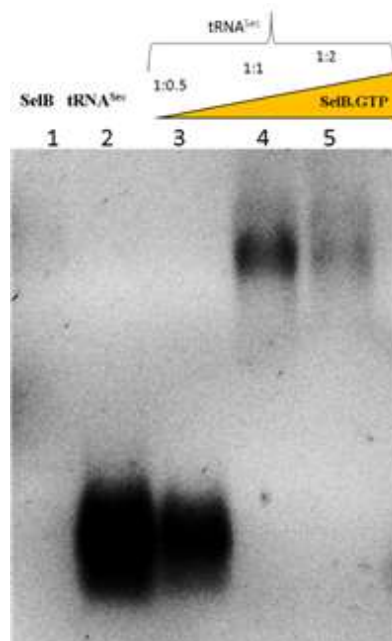


Figura 33 – Ensaio de Deslocamento de Mobilidade Eletroforética. 1) SelB e 2) tRNA<sup>Sec</sup>, utilizados como controles na concentração de 1  $\mu$ M. Diferentes estequiometrias: 3) 1 tRNA<sup>Sec</sup> : 0,5 SelB.GTP; 4) 1 tRNA<sup>Sec</sup> : 1 SelB.GTP; 5) 1 tRNA<sup>Sec</sup> : 2 SelB.GTP.

Fonte: Elaborada pelo autor.



O aumento da concentração de SelB.GTP resulta em complexos com massas moleculares mais elevadas se comparado com os tRNA<sup>Sec</sup> utilizado como controle. Como pode ser observado, a proteína SelB sozinha não é sensível ao comprimento de onda da luz observada, portanto todo sinal é proveniente exclusivamente do tRNA<sup>Sec</sup> marcado. É possível verificar pela Figura 33 que há um deslocamento de massa proveniente da formação do complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.

Nota-se claramente que na canaleta 3, grande parte do RNA é observado na região esperada para o tRNA livre, como indicado pela canaleta 2. Já na canaleta 4, onde há a presença do dobro de concentração de SelB.GTP se comparado à canaleta 3, pode-se observar a presença do tRNA com massa molecular maior no gel, o que indica que este está ligado a uma molécula de maior massa molecular, ou seja, está interagindo com a proteína SelB. O mesmo resultado se repete para a canaleta 5, entretanto uma menor intensidade do sinal fluorescente proveniente do tRNA marcado é observado. Isto está relacionado ao fato de que mais proteínas estão disponíveis, portanto um maior número de tRNAs estão interagindo e as porções fluorescentes ligadas à extremidade 3'-OH do braço acceptor do tRNA estão cada vez mais oclusas devido à interação com a proteína SelB.

### 5.7 Análise da estabilidade térmica de SelB por DSC

Uma vez verificado por HPLC que a proteína SelB é purificada sem a presença de GTP endógeno e que o *folding* das proteínas obtidas a partir das duas cepas de interesse neste trabalho é muito semelhante, ensaios de DSC foram realizados para investigar sua estabilidade térmica.

Os experimentos de DSC foram também realizados para verificar a estabilidade térmica de SelB na presença dos nucleotídeos. A Figura 34 mostra os padrões de DSC representativos de SelB na presença de nucleotídeos ligados (linha contínua) e na ausência dos mesmos (linha tracejada). Como pode ser observado, tanto o GDP como o GTP deslocam os termogramas para temperaturas mais altas, o que indica uma maior estabilidade térmica.

Além disso, ensaios de DSC foram empregues para avaliar a estabilidade térmica de complexos do tipo SelB.GTP na presença de tRNA<sup>Sec</sup> e seus mutantes. A amostra SelB apo foi utilizada como referência.

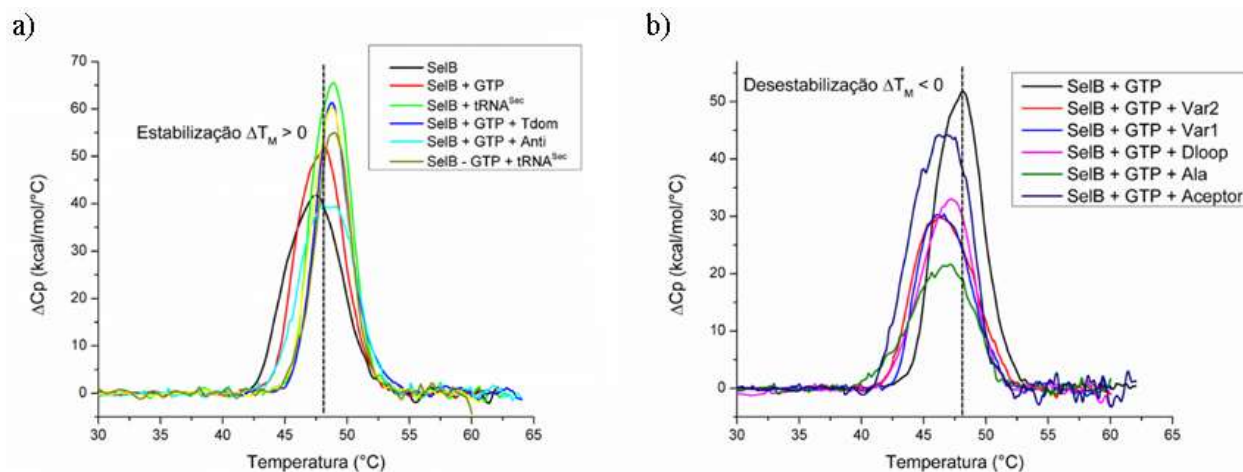


Figura 34 – Deslocamento dos valores de  $T_m$  na presença de tRNAs. a) Ligantes que promovem a estabilização térmica de SelB: GTP,  $tRNA^{Sec}$ ,  $tRNA^{T\psi C}$ ,  $tRNA^{Anti}$ ; b) Ligantes que causam a destabilização térmica de SelB:  $tRNA^{Acceptor}$ ,  $tRNA^{D-loop}$ ,  $tRNA^{Var1}$ ,  $tRNA^{Var2}$ ,  $tRNA^{Ala}$ .

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os dados fornecidos por estes termogramas foram processados pelo *software* Microcal Origin DSC e os valores de temperatura de *melting* e capacidade térmica relativos ao processo de desnaturação térmica para cada complexo analisado pode ser verificados pela Tabela 10 a seguir:

Tabela 10 – Constantes biofísicas obtidas para a proteína SelB e formação de complexos com tRNAs.

Amostra	$T_{max}$ (°C)	$C_{Pmax}$ (kcal/mol/°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
SelB (BL21) apo	$47,4 \pm 0,2$	$43 \pm 3$	$4,7 \pm 0,6$
+ GTP	$48,1 \pm 0,1$	$55 \pm 3$	$3,8 \pm 0,6$
+ tRNA	$49,0 \pm 0,1$	$55 \pm 2$	$3,3 \pm 0,2$
+ GTP + $tRNA^{Sec}$	$48,9 \pm 0,1$	$65 \pm 2$	$3,8 \pm 0,2$
+ GTP + $tRNA^{T\psi C}$	$48,8 \pm 0,2$	$61 \pm 2$	$3,2 \pm 0,2$
+ GTP + $tRNA^{Anti}$	$48,7 \pm 0,2$	$39 \pm 4$	$5,2 \pm 0,3$
+ GTP + $tRNA^{Acceptor}$	$46,9 \pm 0,3$	$44 \pm 3$	$5,8 \pm 0,3$
+ GTP + $tRNA^{D-loop}$	$47,3 \pm 0,2$	$33 \pm 2$	$4,8 \pm 0,2$
+ GTP + $tRNA^{Ala}$	$46,9 \pm 0,5$	$21 \pm 2$	$5,8 \pm 0,2$
+ GTP + $tRNA^{Var1}$	$46,1 \pm 0,5$	$30 \pm 2$	$5,1 \pm 0,2$
+ GTP + $tRNA^{Var2}$	$46,2 \pm 0,5$	$30 \pm 2$	$5,9 \pm 0,2$

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base nestes resultados, é possível categorizar as amostras em dois grupos diferentes: ligantes que realizam a estabilização térmica ( $\Delta T_m > 0$ ) e ligantes que promovem a desestabilização térmica ( $\Delta T_m < 0$ ). O primeiro grupo (GTP, tRNA<sup>Sec</sup>, e os complexos de SelB com tRNAs mutantes em T $\psi$ C e Anticodon) se apresentou mais estável do que a amostra SelB apo. Este deslocamento positivo na  $T_m$  indica que o complexo se torna mais estável e corroboram com as análises de anisotropia e ultracentrifugação analítica indicando a especificidade de interação. Por outro lado, os demais complexos (tanto os mutantes variáveis como os braços D-loop e acceptor também o controle negativo tRNA<sup>Ala</sup>) mostraram um deslocamento negativo do pico  $T_m$ , o que indica a desestabilização térmica, evidenciando menor estabilidade dos complexos.

### 5.8 Análises de Espalhamento de raios-X a baixo ângulo

Com o objetivo de elucidar informações estruturais para SelB de *E. coli*, foram realizados esforços para determinar o modelo de baixa resolução por Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS). As curvas experimentais para o espalhamento de SAXS foram tratadas pelo programa PRIMUS.(85) Para a realização das curvas teóricas de espalhamento foi utilizado o programa CRY SOL. Para isto, a curva experimental para o espalhamento de SelB.GTP foi obtida por meio da utilização do modelo de SelB gerado anteriormente (Seção 3.1.1). O modelo utilizado para restrição da curva de espalhamento teórica para o complexo SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> foi realizado por meio da realização do *docking* de tRNA<sup>Sec</sup> na orientação esperada na estrutura de SelB. Na Figura 35 a seguir, pode-se observar a comparação das curvas experimentais com as curvas obtidas pelo CRY SOL (86) com  $\chi = 3,324$  para SelB.GTP e  $\chi = 2,891$  para SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.

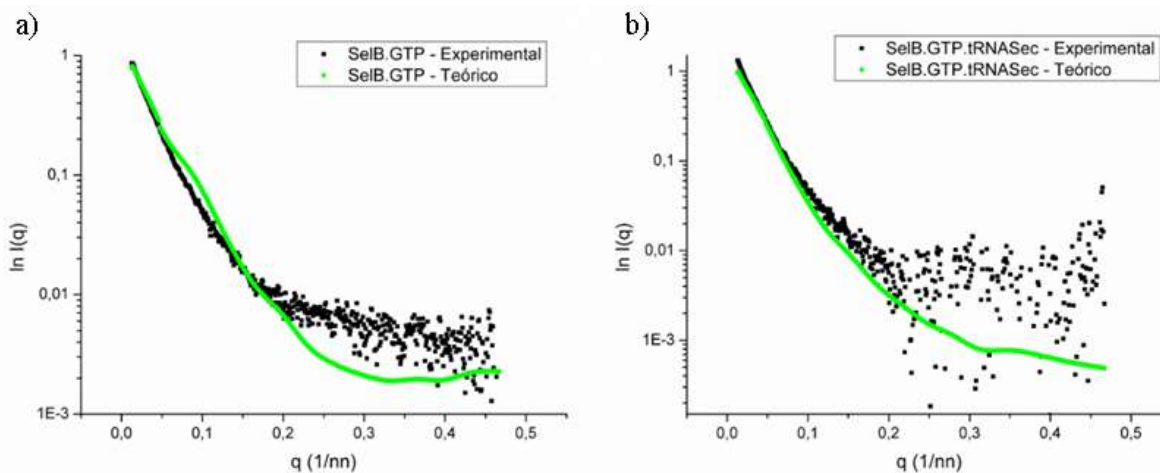


Figura 35 – Comparação das curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo experimental e calculada para os complexos SelB.GTP e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. As curvas teóricas foram obtidas utilizando o modelo gerado pelo programa I-TASSER (Zhang Lab) para SelB proposto por este trabalho.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com estes dados foi possível gerar o Gráfico de aproximação de *Guinier* por meio do programa AutoRG como mostrado abaixo.(94)

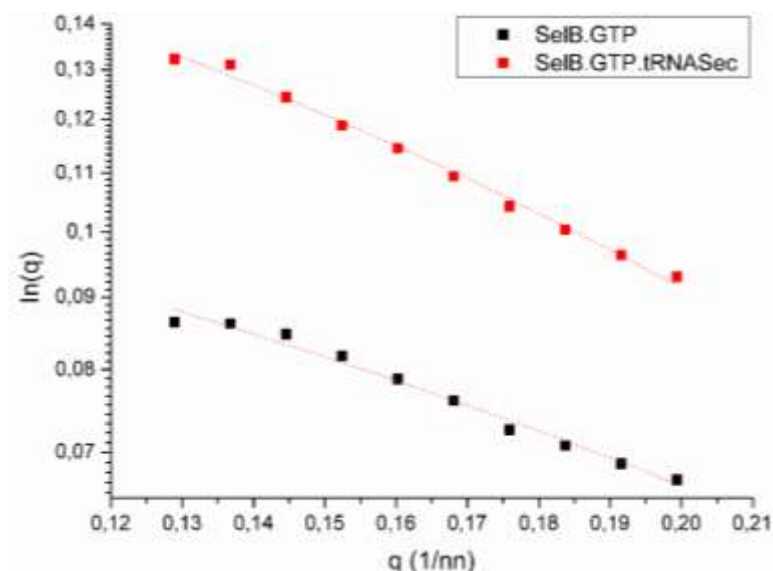


Figura 36 – Gráfico de *Guinier* para os primeiros pontos das curvas de espalhamento experimentais resultando em  $R_g = 4,37$  nm para SelB.GTP e  $R_g = 4,82$  nm para SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A aproximação de *Guinier* foi utilizado para os 10 primeiros pontos das curvas de espalhamento (onde  $qR_g < 1,3$ ) resultando em um raio de giro de 4,37 nm para SelB.GTP e 4,82 nm para SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.

As curvas referentes à distribuição de distâncias  $p(r)$  entre os centros espalhadores de raios-X para cada amostra foi calculada pelo programa GNOM como visto na Figura 37.

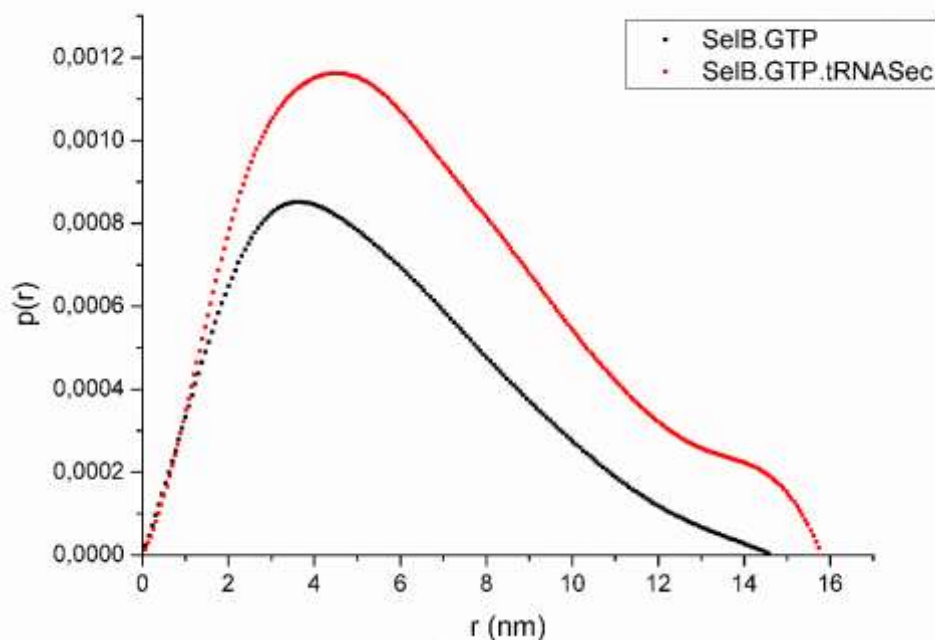


Figura 37 – Comparação das curvas  $p(r)$  para a proteína SelB e para o complexo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, ambos em condições saturantes de GTP. É possível verificar um aumento na distância máxima devido a interação com tRNA<sup>Sec</sup>.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A distância máxima obtida para os ensaios de SAXS determinados para SelB.GTP apresentou valor estimado de  $D_{\max}$  de 14,65 nm, enquanto SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> tem 15,0 nm. Com base na interceptação no eixo das ordenadas do Gráfico de *Guinier* ( $I(0)$ ) é possível estimar a massa molecular dos complexos por meio do programa *SAXS MoW*. Os valores das massas obtidas podem ser verificados na Tabela 11 a seguir. Vale ressaltar que a flexibilidade da proteína SelB em solução acarreta em perturbações no gráfico de *Kratky*, influenciando na obtenção do volume de *Porod*, e desta forma, superestimando o valor da massa molecular para os complexos.

Tabela 11 – Parâmetros estruturais obtidos para as análises de SAXS.

	SelB	SelB.tRNA <sup>Sec</sup>
Massa Molecular (kDa) (discrepância em %)	91,9 (0,34)	135,6 (0,358)
$D_{\max}$ (nm)	14,65	15,0
Raio de <i>Guinier</i> (nm)	4,37	4,82
Volume de <i>Porod</i> (nm <sup>3</sup> )	150,51	228,92

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os modelos de baixa resolução foram utilizados para alocar o modelo obtido por modelagem para a estrutura SelB de *E. coli* com base na estrutura resolvida para Itoh e colaboradores para *Aquifex aeolicus* (2015).(47) Os resultados obtidos para os envelopes gerados pelo método *ab initio* através do programa DAMMIF podem ser observados pela Figura 38 a seguir:

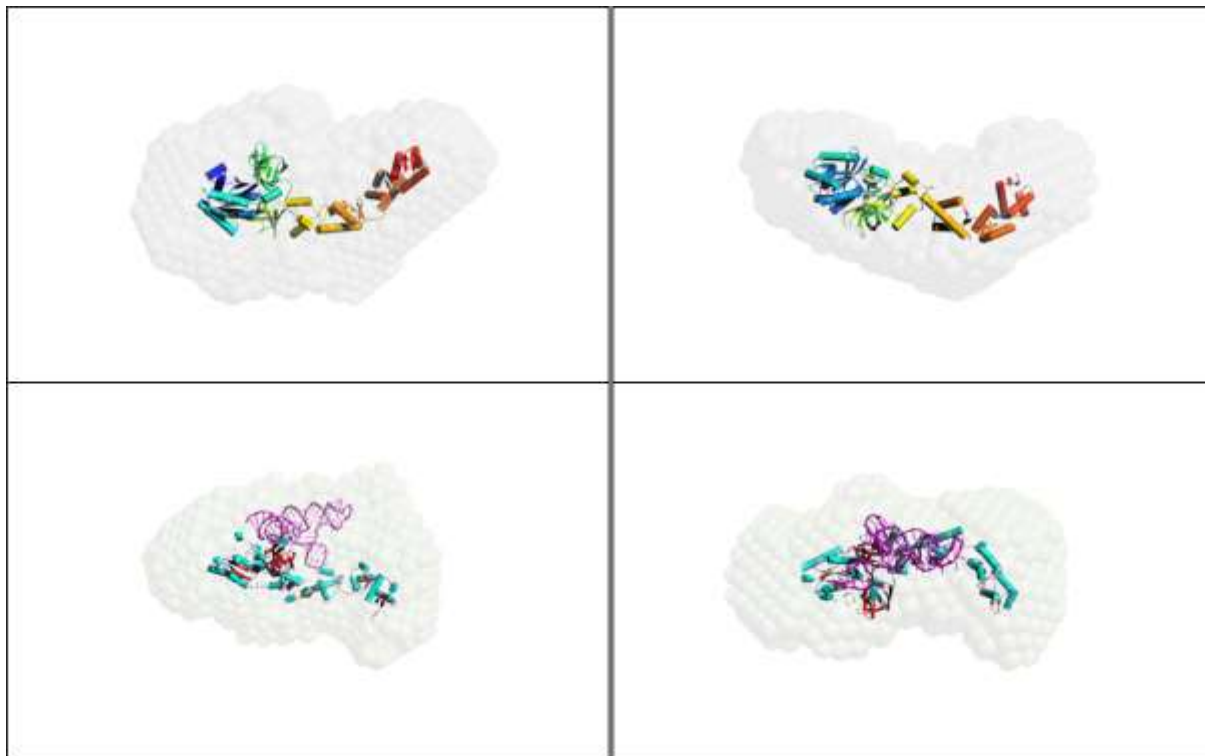


Figura 38 – Superposição do modelo proposto pelo programa I-TASSER (Zhang Lab) ao envelope gerado pelo DAMMIF: a) e b) Modelo para SelB.GTP; c) e d) Modelo para SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. Os envelopes resultantes foram alinhados às estruturas modelo por meio do programa SUPCOMB.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir dos modelos obtidos, observa-se a presença de regiões flexíveis, particularmente em modelos que se referem a complexos com tRNAs. Tais resultados sugerem que a proteína sofre alteração conformacional devido à interação com RNAs, o que era esperado.

Os resultados obtidos pelos experimentos de SAXS se apresentaram de acordo com o que era esperado. Como proposto por Dobosz-Bartoszek, após a realização dos experimentos deste trabalho, na presença de GTP a proteína SelB está em sua conformação ativa o que provoca mudanças conformacionais em sua estrutura.(11,47,53) Este fato somado a flexibilidade intrínseca do *linker* que conecta as porções N e C terminal sugerem que em solução a proteína SelB se apresente ligeiramente diferente do que foi descrito por sua estrutura cristalográfica.

## 5.9 Testes de Cristalização da proteína SelB

Com a finalidade de se obter a informação a partir da estrutura tridimensional de SelB, foram realizadas triagens iniciais de possíveis condições de cristalização para a proteína SelB em duas condições: SelB apo, e o complexo SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, ambos em excesso de GTP. Dado o baixo rendimento desta proteína, cerca de 16 L de cultura foram utilizados com o objetivo de realizar triagens das condições de cristalização.

A proteína SelB possui diferentes domínios, e uma *link* extremamente flexível conectando as porções N-terminal e C-terminal,(11,47) o que aumenta o desafio de obter a formação de cristais. Apesar do enovelamento não favorável para a organização cristalina, foram obtidos cristais em algumas condições listadas na Tabela 12:

Tabela 12 – Principais condições em que foi possível o crescimento de cristais.

1	2	3	4
Crystal Screen HT (HAMPTON RESEARCH)	Index HT (HAMPTON RESEARC)	JCSG- <i>plus</i> HT-96 (Molecular Dimensions)	MIDAS (Molecular Dimensions)
C6: 0,2 M Sulfato de Amônia, 30% m/v polietilenoglicol 4000	B6: 0,1 M cloreto de sódio, 0,1 M BIS-TRIS, 1,5 M sulfato de amônia, pH6,5	B10: 0,2 M cloreto de magnésio, 0,1 M cacodilato de sódio, 50% m/v polietilenoglicol 200, pH 6,5	C10: 0,1 M cloreto de sódio, 35% m/v polietilenoglicol 2100, 0,1 M HEPES, pH 7,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Parte destes cristais foi testada no equipamento de difração de raios-X e a partir dos padrões de difração observados, verificou-se que eram sais. Grande parte destes cristais ainda não foi testada, no entanto estão congelados para futuras coletas no equipamento de raio-X utilizando o equipamento Rigaku R-AXIS-IV<sup>++</sup> presente em nosso grupo de pesquisa (LBEst-IFSC) e na linha MX-2 do CNPEM-Campinas.

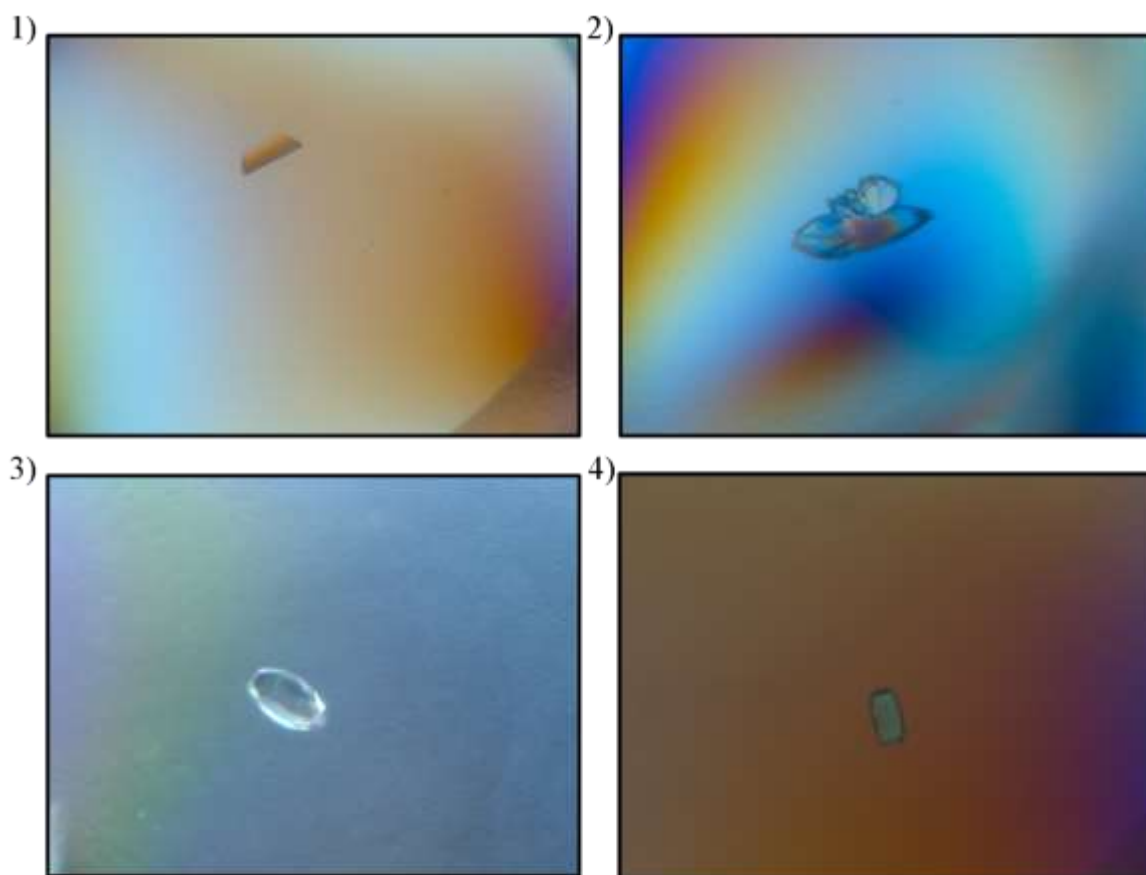


Figura 39 – Cristais obtidos nas condições descritas pela Tabela 12. A numeração das imagens corresponde à numeração da tabela.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dadas as condições de cristalização citadas pela Tabela 12, tem-se como objetivo a triagem de novas condições experimentais para o preparo de amostra. Como já citado, os cristais já obtidos foram armazenados e serão testados futuramente em conjunto com os demais cristais que eventualmente possam ser obtidos.



## 6 ANÁLISE DA PROTEÍNA SerRS DE *Escherichia coli*

### 6.1 Análise Bioinformática da proteína SerRS

O modelo estrutural para a proteína SerRS foi gerado pelo programa I-TASSER (Zhang Lab) utilizando como modelo de restrição a proteína SerRS de *Aquifex aeolicus* (PDB ID: 2DQR). Esta estrutura possui depósito no banco de dados PDB, entretanto, o artigo científico que a originou não foi publicado até a escrita deste trabalho de mestrado. A estrutura para SerRS resultante pode ser observada pela Figura 40 a seguir.

Para validação deste modelo, foi realizado o Gráfico de Ramachandram teórico pelo programa MolProbity (Duke Biochemistry) como pode ser observado pela Figura 40-b. De acordo com este resultado, 85,0% dos resíduos estão presentes em regiões favoráveis e 95,8% em regiões permitidas. Portanto há 18 dos 428 aminoácidos que constituem a proteína SerRS em que não obedecem as restrições phi e psi (Figura 40-c).

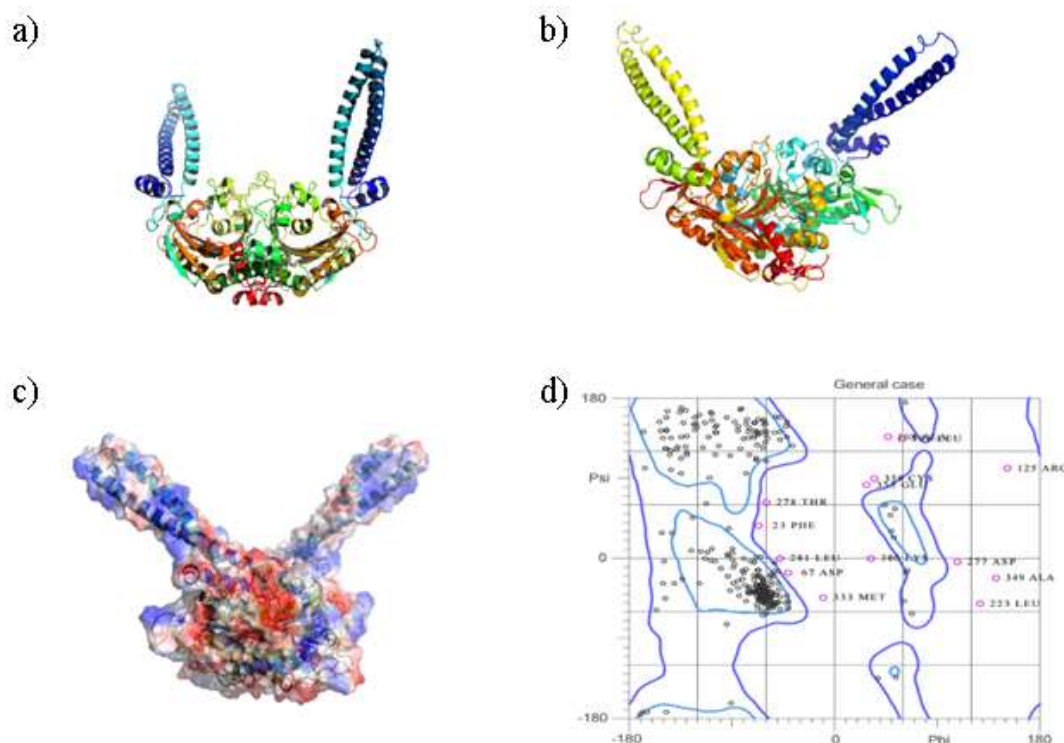


Figura 40 – Modelagem computacional por homologia para SerRS. a) Estrutura cristalográfica tomada como referência: SerRS de *A. aeolicus* (PDB ID: 2DQ3:A), b) Modelo de dímero gerado pelo I-TASSER (Zhang Lab) para SerRS, c) Visualização da superfície eletrostática do modelo gerado; d) Gráfico de Ramachandram indicando 85,0% dos resíduos do modelo em regiões favoráveis.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Por meio do mapa eletrostático gerado para o modelo de SerRS (Figura 38-c) pode-se observar que os domínios N-terminal de cada dímero é apresentado majoritariamente em azul

na parte superior da figura, indicando uma região com cargas majoritariamente positiva. Este domínio é a porção de interação com o tRNA, portanto este resultado se apresenta de acordo com o esperado.

## 6.2 Obtenção de SerRS

### 6.2.1 Amplificação e clonagem de *serRS*

A sequência de oligonucleotídeos referentes ao gene para a obtenção da Seril-tRNA Sintetase foi utilizada nas etapas de amplificação e clonagem. Posteriormente o inserto de interesse foi utilizado para expressão e purificação da SerRS para a continuidade deste trabalho.

A reação de amplificação foi submetida a gel de agarose 1% e o fragmento amplificado com 1292 pb pode ser observado pela Figura 41-a a seguir. O fragmento foi purificado do gel por meio do kit de purificação Clean Up (Cellco).

Em seguida, o fragmento referente ao gene *serRS* foi ligado ao vetor de propagação pJET1.2/blunt de 2974 pb e esta ligação foi transformada em cepa *E. coli* DH5- $\alpha$  para obtenção de um maior número de cópias. Após a extração do vetor contendo o inserto de interesse destas células, foi realizada a digestão com as enzimas de restrição específicas *PhastDigest* (Fermentas) NcoI e XhoI e o resultado pode ser verificado pela Figura 41-b.

Paralelo a isto, células contendo o vetor de expressão pET32(a) de 5900 pb foram crescidas e seus plasmídeos foram purificados. Então o vetor pET32(a) foi digerido também com as enzimas NcoI e XhoI. Após a digestão, tanto do vetor contendo o inserto como o pET32a, foi realizada uma nova etapa de ligação e transformação na cepa de expressão *E. coli* BL21. Após a transformação, o vetor contendo o gene foi ainda mais uma vez purificado para confirmação da ligação por meio de uma nova digestão com as enzimas NcoI e XhoI. O resultado desta digestão pode ser verificado na Figura 41-c onde é possível observar o fragmento de DNA referente ao vetor pET32(a) e o inserto de interesse contendo o gene *serRS*.

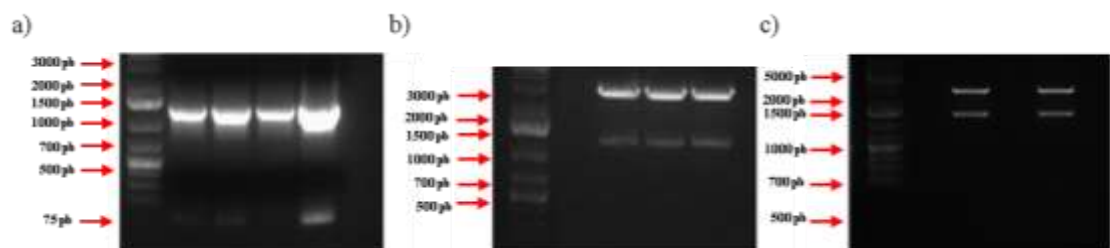


Figura 41 – Processo de obtenção de *serRS* em cepa de expressão: a) Amplificação a partir de DNA genômico de *E. coli*; b) Confirmação da ligação de SerRS no vetor de propagação pJET1.2/blunt por meio da digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Fermentas); c) Confirmação da ligação de *SerRS* no vetor de expressão pET32(a) por meio da digestão com as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Fermentas).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez realizada e confirmada cada etapa da amplificação do gene até sua incorporação em cepa de expressão, foi possível prosseguir com os ensaios de obtenção da proteína pura.

## 6.2.2 Expressão e purificação de SerRS

O protocolo de expressão para a obtenção da proteína SerRS foi definido conforme descrito na Seção 3.6. Os resultados de expressão e purificação em cromatografia de afinidade por Ni<sup>2+</sup> com tempos de indução de 3 h e 18 h podem ser vistos na Figura 42 a seguir.



Figura 42 – Purificação de SerRS: 1) Marcador Molecular. Indução por 3 h: 2) Vazio; 3) Precipitado; 4) Sobrenadante; 5) Extrato Bruto; 6) Fração não interagente com a coluna; 7) Lavagem da coluna com 10 mM de imidazol; 8) Eluição com 100 mM de imidazol; 9) Vazio. Indução por 18 h: 10) Precipitado; 11) Sobrenadante; 12) Extrato Bruto; 13) Fração não interagente com a coluna; 14) Lavagem com 10 mM de imidazol; 15) Eluição com 100 mM de imidazol.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base na Figura 42 verifica-se que a proteína SerRS está presente na fração sobrenadante após a lise celular. Pode-se também verificar que a fração obtida após o primeiro passo de purificação corresponde a massa de aproximadamente 60 kDa. Este resultado está de acordo com o esperado uma vez que calcula-se que a proteína SerRS fusionada a cauda de Tiorredoxina proveniente do uso do pET32(a) como sistema de expressão, apresenta massa molecular de 60.220,6 Da.

Como previsto pela literatura, SerRS possui o domínio N-terminal como região de interação a tRNAs.(11,47,53) A proteína SerRS obtida até então possui a cauda Tiorredoxina fusionada à esta porção, logo como quer-se analisar a interação da proteína SerRS com diferentes tRNAs, é necessário um passo adicional de clivagem desta cauda. A digestão da cauda Tiorredoxina foi mediada pela ação da enzima enteroquinase (BioLabs) que reconhece a sequência de clivagem Asp-Asp-Asp-Asp-Lis. O resultado da digestão da cauda após 16 h de clivagem pode ser verificada via gel 12% SDS PAGE como observado pela Figura 43-a. Após a etapa de digestão da cauda tiorredoxina, espera-se ter em solução dímeros com clivagem da cauda em ambas as porções N-terminal, proteínas que tiveram clivagem em apenas uma extremidade N-terminal de cada monômero do dímero e proteínas em que não houve clivagem da cauda em nenhum dos monômeros.

Diversos protocolos de purificação foram realizados na tentativa de separar a proteína SerRS livre de cauda tiorredoxina em solução. O método mais propício para isto foi a inclusão de um passo adicional de cromatografia de afinidade. Desta forma, a proteína de interesse não deve reagir com a resina e deve ser eluída diretamente da coluna (Figura 43 b e c).

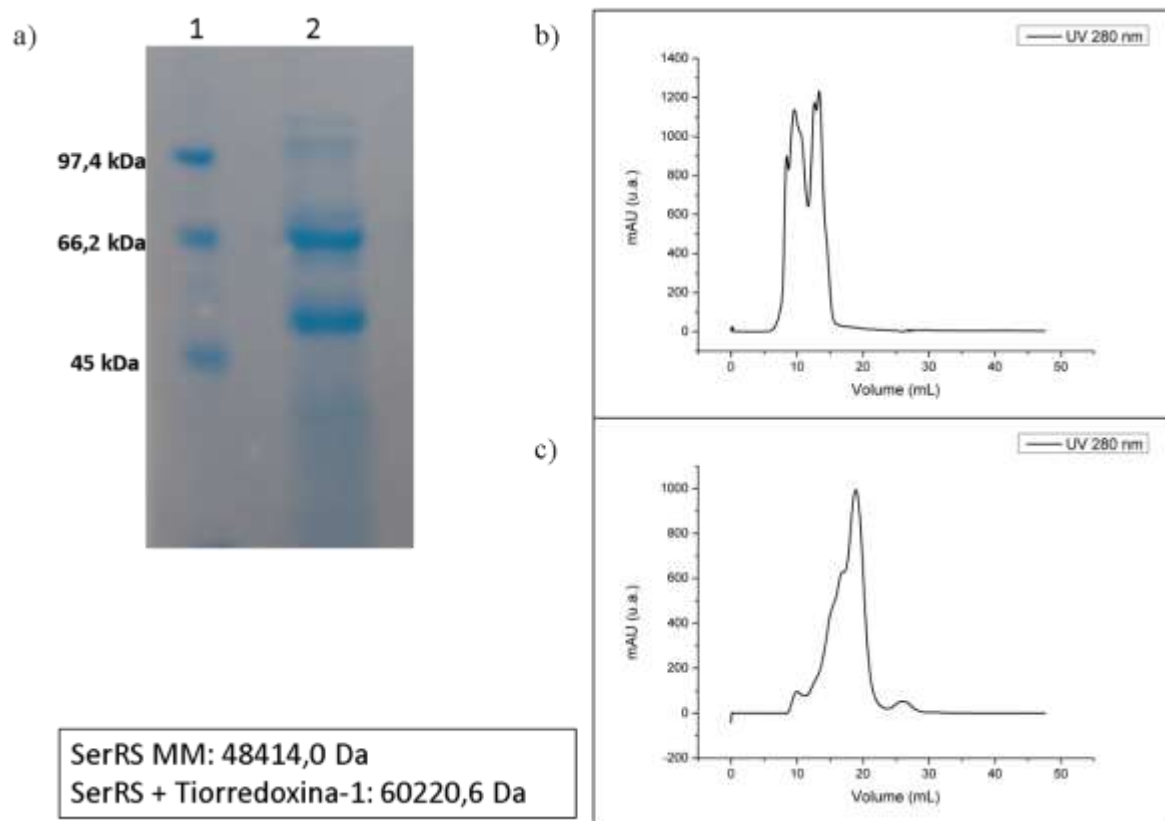


Figura 43 – Purificação de SerRS após digestão da cauda de tiorredoxina: a) 1) Marcador molecular; 2) Resultado da digestão: proteína digerida e proteína não-digerida. b) Cromatograma de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/300* (GE) acoplada ao sistema *ÅKTA* (GE) para a purificação de SerRS após a digestão, mas sem o segundo passo de cromatografia de afinidade. c) Cromatograma de exclusão molecular para obtenção de SerRS após a digestão e após o segundo passo de cromatografia de afinidade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

### 6.2.3 Monitoramento da purificação de SerRS por *Western Blot*

Para o acompanhamento da purificação da proteína SerRS fusionada com a cauda de Tiorredoxina bem como a clivagem da mesma, foram realizados ensaios de *Western Blot* com anticorpo anti-His. Desta forma, é possível monitorar as frações de interesse por meio da presença da cauda. O gel resultante da análise por *Western Blot* pode ser verificado na Figura 44 a seguir:

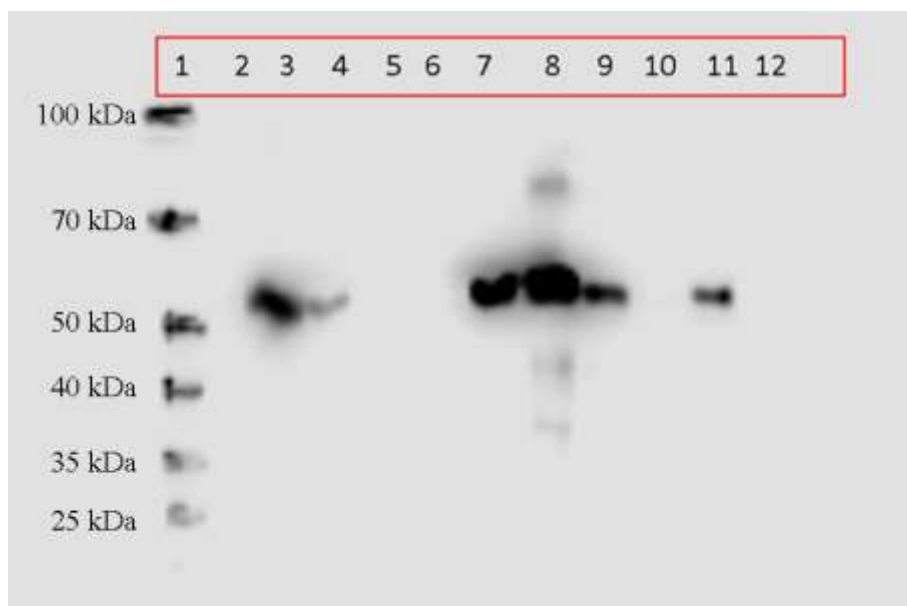


Figura 44 – Ensaio de *Western Blot* para o monitoramento da digestão da cauda de tiorredoxina: 1) Marcador molecular; 2) Vazio; 3) Sobrenadante; 4) Precipitado; 5) Fração não interagente com a coluna; 6) Lavagem com 10 mM de imidazol; 7) Eluição com 100 mM de imidazol; 8) Resultado da digestão; 9) Fração não interagente com a coluna; 10) Lavagem com 10 mM de imidazol; 11) Eluição com 100 mM de imidazol; 12) Após cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/300* (GE) acoplada ao sistema *ÅKTA* (GE).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como se pode observar, a proteína SerRS está presente majoritariamente na fração sobrenadante após a lise celular. Durante a primeira etapa de cromatografia por afinidade a  $\text{Co}^{2+}$ , a proteína permanece ligada à resina e é eluída apenas na adição do tampão de lise com adição de 100 mM imidazol, como pode ser observado pela canaleta 7. Após o processo de digestão da cauda, a proteína é submetida a uma nova cromatografia de afinidade por  $\text{Ni}^{2+}$ . Desta vez, a proteína de interesse é eluída durante a lavagem com tampão de lise com adição de 20 mM de imidazol, o que pode ser observada pela canaleta 10 na Figura 44. É interessante notar que a cauda Tiorredoxina ligada ou não à proteína SerRS é eluída com a adição de tampão de lise adicionado de 100 mM de imidazol (canaleta 11). A amostra referente à canaleta 10 foi ainda submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 75 10/30* (GE) e seu resultado pode ser verificado na canaleta 12. Como não há mais cauda de histidina fusionada à proteína, era de se esperar que esta amostra não apresentasse detecção em *Western Blot*, como verificado.

### 6.3 Análises de Dicroísmo Circular para SerRS

A análise da composição de estruturas secundárias da proteína SerRS foi realizada por meio da técnica de dicroísmo circular (CD). Assim como foi realizado para a proteína SelB, a

deconvolução do espectro de dicroísmo circular para a proteína SerRS foi realizada pelo programa CDTtools. A predição para a porcentagem de estruturas secundárias indica a presença de 30,2% de estruturas em  $\alpha$ -hélice, 19,2% em folhas- $\beta$ , 17,4% em forma de alças e 33,2% em regiões não estruturadas.

O estudo do dicroísmo circular de SerRS foi realizado por meio de desnaturação térmica de 10 °C a 90 °C com passos de 10 °C a cada medida. Os espectros resultantes de CD referente às médias obtidas em cada temperatura podem ser verificados pela Figura 45-a a seguir. Através do monitoramento do valor de elipsidade obtido nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm (Figura 45-b). Desta forma, é possível gerar um gráfico que relaciona as mudanças estruturais ocasionadas pela variação térmica à temperatura de *melting* calculada para esta transição por meio do ajuste de *Boltzmann*.

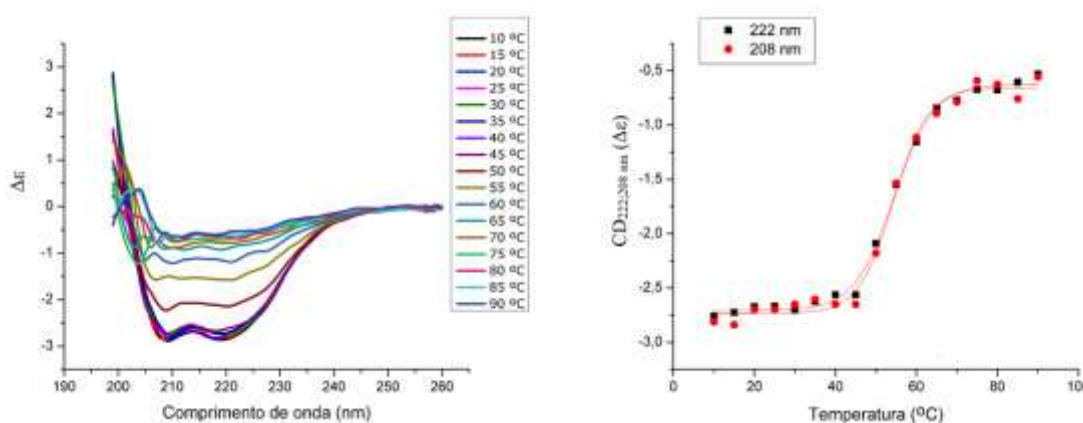


Figura 45 – Monitoramento da estabilidade térmica de SerRS por CD: a) espectros de CD para experimento de variação térmica (VT-CD) de SerRS. b) monitoramento dos mínimos de CD em 222 nm e 208 nm indicando valores de temperatura de *melting* calculados de  $(54,4 \pm 0,4)$  °C e  $(54,3 \pm 0,6)$  °C, respectivamente.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados foram obtidos pela média de 3 experimentos independentes revelando alta estabilidade térmica da proteína, pois esta manteve a sua estrutura secundária até aproximadamente 54 °C.

#### 6.4 Monitoramento da emissão de fluorescência de resíduos aromáticos de SerRS por Fluorescência Intrínseca

Os espectros de emissão dos resíduos de triptofano da proteína SerRS purificada após o tratamento da digestão da cauda Tiorredoxina são mostrados na Figura 46. Como já previsto pela literatura, SerRS possui 3 triptofanos, dos quais 2 pertencem ao sítio de ligação ao ATP. Concentrações crescentes de ATP, L-Serina e tRNA<sup>Sec</sup> foram tituladas em SerRS cuja

fluorescência intrínseca foi monitorada.

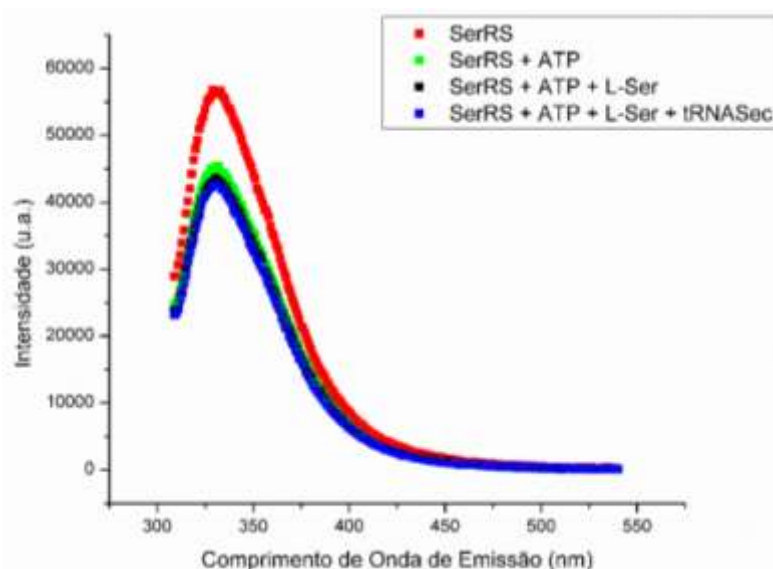


Figura 46 – Experimento de fluorescência intrínseca dos resíduos aromáticos de SerRS em função da adição de ligantes. Pode-se verificar a diminuição dos espectros de emissão devido à interação com ATP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A intensidade do máximo de emissão decai devido à presença de ATP. Uma vez adicionado ATP, o máximo de emissão diminuiu pouco com a adição de L-Serina e do tRNA<sup>Sec</sup> específico. Estes resultados indicam indiretamente que SerRS está ativa, pois ao se ligar ao ATP, é notável a diferença na intensidade obtida se comparado à mesma medida realizada na ausência deste nucleotídeo energético.

### 6.5 Ensaios de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência para interação de SerRS com ligantes

A Anisotropia de Fluorescência foi mais uma vez recorrida, desta vez para analisar a interação da proteína SerRS com alguns de seus ligantes e parceiros de interação. Da mesma maneira como realizado para as medidas com SelB, o tRNA<sup>Sec</sup> previamente marcado com fluoróforo foi utilizado como sonda sendo deixado sempre em concentrações constantes na cubeta.

Para este experimento, foram realizadas titulações com diferentes amostras e suas curvas de anisotropia podem ser visualizadas pela Figura 47 a seguir e os parâmetros bioquímicos calculados a partir destas curvas podem ser verificados pela Tabela 13 abaixo.



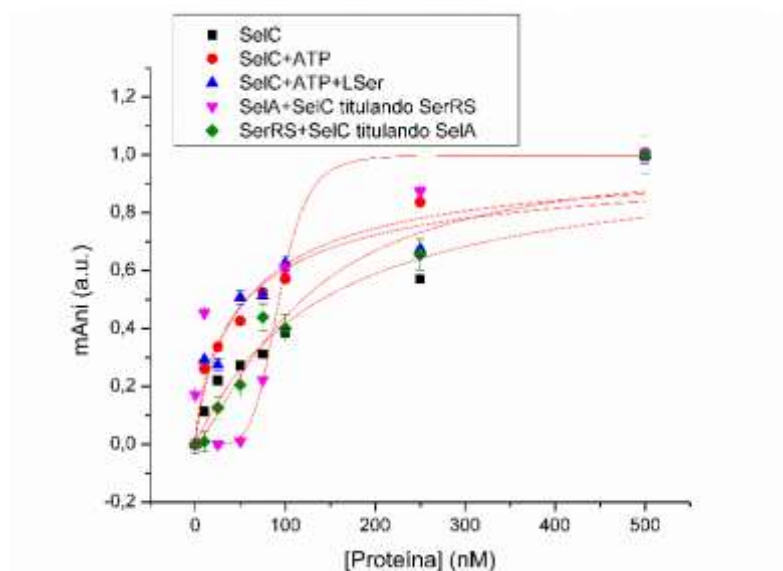


Figura 47 – Ensaio de Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência para a formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> em função da adição de ligantes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de constantes de dissociação bem como o parâmetro de cooperatividade (parâmetro de *Hill*) calculados a partir das curvas de anisotropia podem ser resumidos pela Tabela 13 a seguir:

Tabela 13 – Experimento de anisotropia de fluorescência em função da adição de ligantes.

	$K_d$ (nm)	<b>n</b>	<b>r<sup>2</sup></b>
SerRS.(SelA.tRNA <sup>Sec</sup> )	92,9 ± 10	5,9 ± 0,2	0,92
SerRS.tRNA <sup>Sec</sup>	140,1 ± 20	1,0 ± 0,2	0,90
(SerRS.tRNA <sup>Sec</sup> ).SelA	119,0 ± 10	1,4 ± 0,2	0,96
SerRS.(tRNA <sup>Sec</sup> .ATP)	56,4 ± 10	0,9 ± 0,1	0,96
SerRS.(tRNA <sup>Sec</sup> .ATP.L-Serina)	56,4 ± 10	0,8 ± 0,2	0,93

Fonte: Elaborada pelo autor.

Com base na Tabela 13, pode-se verificar que a constante de dissociação para a adição de SerRS ao complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup> já previamente incubado é menor do que o o valor de constante de dissociação para o caso da adição de SelA ao complexo SerRS.tRNA<sup>Sec</sup>. O que indica que no ambiente celular o complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup> deve inicialmente estar montado para posterior interação com a proteína SerRS.

Pode-se também observar que tanto para a titulação de SerRS em SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, como para a adição de SelA em SerRS.tRNA<sup>Sec</sup> o valor da constante de dissociação se apresentou menor do que o valor obtido para a formação do complexo SerRS.tRNA<sup>Sec</sup> por meio da adição de SerRS ao tRNA<sup>Sec</sup> previamente incubado.

Além disto, é verificado que o valor para a constante de dissociação de SerRS por tRNA<sup>Sec</sup> é menor na presença de ATP, e menor ainda se na cubeta o tRNA<sup>Sec</sup> for previamente preparado com ATP e L-serina. Estes resultados mostram claramente que SerRS está em sua conformação ativa, uma vez que a presença do ATP favorece a interação com o tRNA<sup>Sec</sup>. Desta forma, o evento de aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup> deve ocorrer primeiramente pelo reconhecimento de SelA pelo tRNA<sup>Sec</sup> e então após a formação deste complexo, a proteína SerRS reconhece o tRNA<sup>Sec</sup> carregando-o com selenocisteína.

## **6.6 Visualização de complexos por Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo**

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo pode ser utilizada para a observação de estruturas macromoleculares de tamanho da ordem de centenas de nanômetro.(77) Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa levaram a publicações de diversos trabalhos utilizando microscopia eletrônica de transmissão utilizando contraste negativo relacionados à proteína Selenocisteína Sintase (SelA). Como já previsto pela literatura e juntamente com os resultados das análises de anisotropia de fluorescência, a proteína SerRS e SelA devem interagir na presença de tRNA<sup>Sec</sup>.(34)

Como mostrado pela Dr. Livia R. Manzine e colaboradores, a proteína SelA em solução está na forma homodecamérica com massa de 600 kDa, e possui estequiometria de ligação de tRNA<sup>Sec</sup> de 1 SelA : 10 tRNA<sup>Sec</sup>.(34)

O complexo SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> foi previamente incubado por 20 min antes da deposição em filme de carbono e as imagens geradas pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão FEI Tecnai G2F20 HRTEM single-tilt operando em 200 KV em uma camera TIA (FEI) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa/UFSCar) podem ser verificadas pela Figura 48.

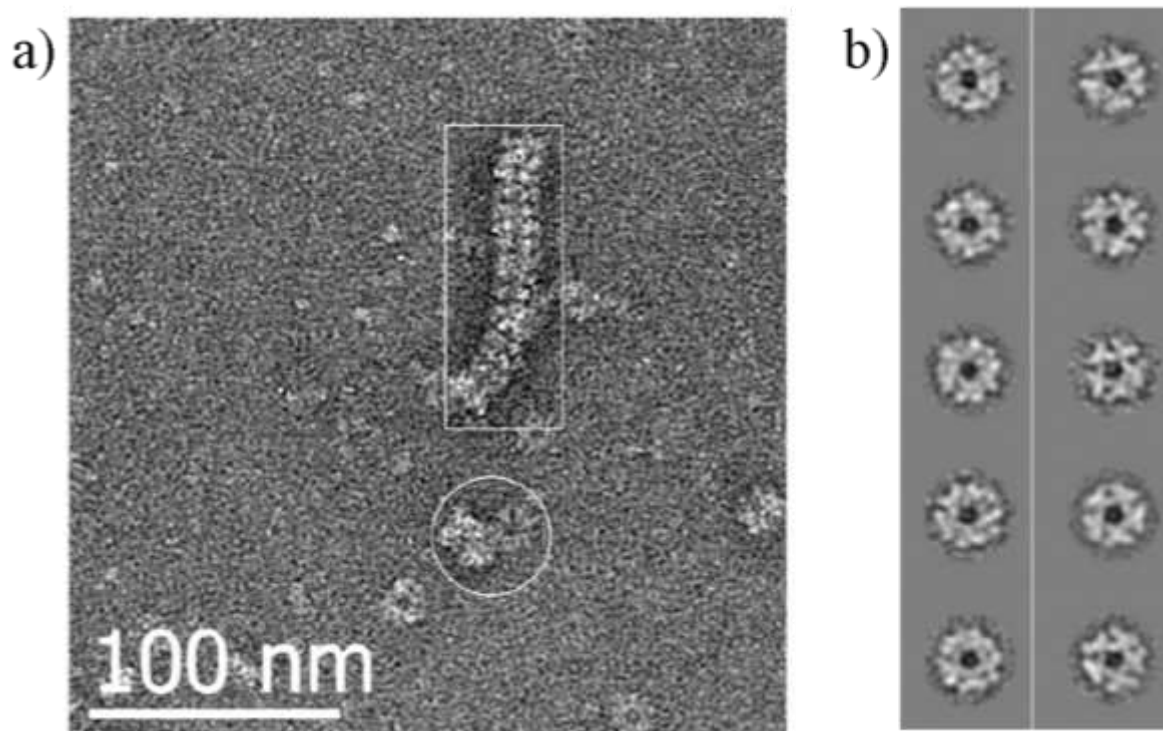


Figura 48 – Imagens de contraste de negativo para SelA e SelA.tRNA<sup>Sec</sup> previamente publicados. a) Imagem de microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo SelA. b) (esquerda) Classe do estado não ligado de SelA, (direita) Complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.

Fonte: Adaptada de MANZINE, L. R.(34)

Já as imagens obtidas para a formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> obtidas ao decorrer deste trabalho podem ser visualizadas pela Figura 49 a seguir:

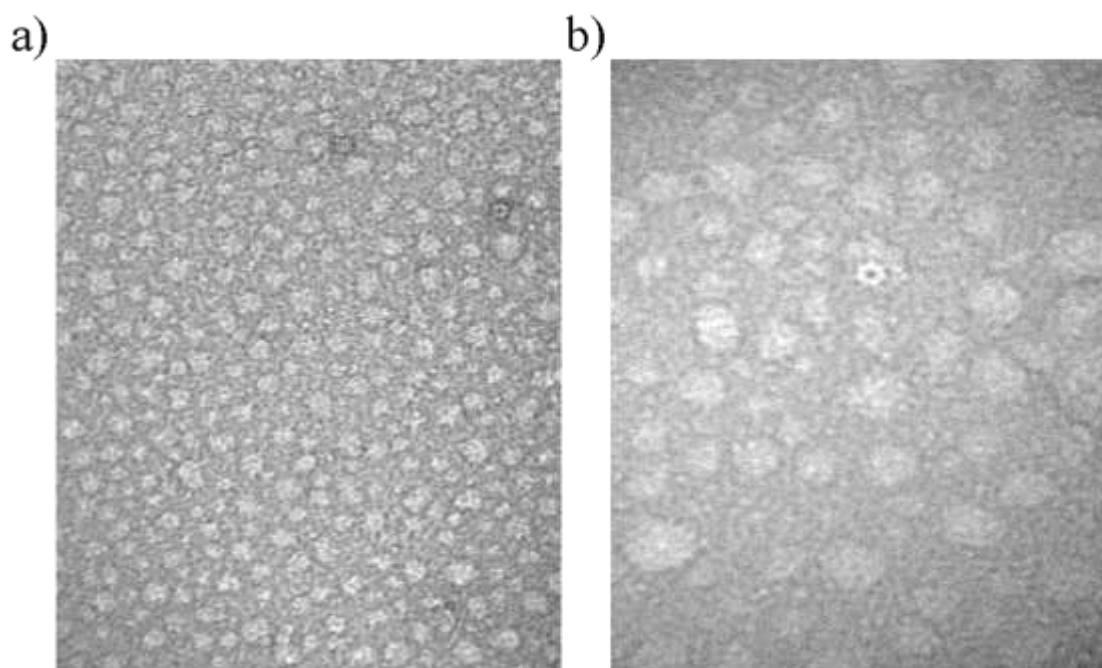


Figura 49 – Imagens do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> por microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo. a) e b) Visualização do complexo ternário onde é possível observar que o interior da proteína SelA é preenchida pelos parceiros de interação SerRS e tRNA<sup>Sec</sup>.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como já descrito pela literatura, SelA possui um formato circular com uma região vazia no interior de seu homocomplexo decamérico como pode ser observado pela Figura 48.(34) Este comportamento é semelhante na formação do complexo binário SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, sendo que a região central da proteína SelA não é preenchida pelo tRNA<sup>Sec</sup>.

Já os resultados realizados neste projeto podem ser observados pela Figura 49. É interessante notar pelas imagens geradas para a formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> que esta região central passa a ser preenchida. Este resultado indica que há a interação de SerRS por SelA na presença do tRNA<sup>Sec</sup> o que corrobora com os resultados Anisotropia de Fluorescência previamente discutidos. Além disto, estes estudos podem auxiliar no desenvolvimento de uma proposta de interação para a formação deste complexo, uma vez que atualmente não há informações estruturais com alta resolução descrevendo detalhadamente como este complexo se forma.

## 7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

### 7.1 Conclusões

Este projeto de mestrado teve seu foco principal na investigação das estruturas determinantes do tRNA específico para inserção de selenocisteínas (tRNA<sup>Sec</sup>) para o reconhecimento ao fator de alongação específico para selenocisteínas (SelB), bem como na interação deste tRNA com a proteína Seril tRNA-Sintetase (SerRS), além da caracterização biofísica destas macromoléculas.

Para isto, um novo protocolo para a superexpressão e purificação de SelB foi estabelecido com aumento do rendimento comparado com previamente citado pela literatura.(71) A principal alteração deste protocolo é um passo adicional de degradação por RNase devido à presença de RNAs de nucleotídeos endógenos quantificados. O produto da purificação foi caracterizado por espectrometria de massa e *Western Blot* assegurando a obtenção da amostra de interesse. Além disso, os resultados de HPLC a 25 °C demonstraram que amostra SelB é purificada na ausência de GTP e uma vez adicionado este nucleotídeo, a proteína não realiza sua hidrólise a esta temperatura e permanece estável na formação dos complexos de interesse na presença do tRNA específico.

Os tRNAs sintetizados *in vitro* (tRNA<sup>Sec</sup> e seus diferentes mutantes) apresentaram um correto enovelamento o que pode ser inferido pela análise de suas estruturas secundárias por meio de ensaios de Dicroísmo Circular. O arranjo estrutural correto dos tRNAs é essencial para as posteriores análises de interação com as proteínas.

A formação do complexo ternário SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> foi inicialmente monitorada pela emissão dos resíduos aromáticos por fluorescência intrínseca revelando uma constante de dissociação aparente de  $K_d = (248 \pm 59)$  nM. Estes resultados corroboram com a constante de ligação obtida por espectroscopia de anisotropia de fluorescência usando marcação com tRNA<sup>Sec</sup>-fluoresceína ( $K_d = 266,8 \pm 27,5$  nM). O índice de cooperatividade para este complexo ternário mostra uma interação não cooperativa em ambos os experimentos.

A interação de SelB.GTP tRNA<sup>Sec</sup> é facilitada pela presença de Sela, dado o baixo valor obtido para a constante e a cooperatividade na interação. Este fato é biologicamente razoável dado que tRNA<sup>Sec</sup> não é abundante no ambiente celular e a via deve ser extremamente eficiente devido à alta toxicidade dos compostos de selênio.(4-6)

Como já descrito pela literatura, SelB interage com tRNA<sup>Sec</sup> pelos braços acceptor e T $\Psi$ C.(71) Apenas recentemente, a dependência do braço variável de tRNA<sup>Sec</sup> foi determinada

pela análise de partícula única Cryo-EM do ribossomo em complexo com SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS,(11) que corroboram diretamente com os resultados deste estudo. Por espectroscopia de anisotropia de fluorescência e ultracentrifugação analítica, relatamos as constantes de ligação de diferentes mutantes tRNA<sup>Sec</sup>, onde avaliamos as constantes de ligação e a importância de suas interações específicas. As diferentes construções de braços indicam constantes de ligação semelhantes ao nosso controle negativo (tRNA<sup>Ala</sup>) mostrando uma inespecificidade para suas interações.

Além disso, CD e DSC mostram que SelB interage com GTP ou GDP em condições saturantes. A  $T_m$  das formas ligadas a nucleotídeos é superior à forma apo. Além disso, a  $T_m$  da forma ligada a GTP é aproximadamente 1,2 °C mais elevada do que a  $T_m$  de SelB.GDP, indicando que SelB.GTP forma um complexo binário mais termicamente estável do que SelB ligada a GDP. O complexo macromolecular na presença de RNAs também foi avaliado e pode ser distinguido em dois grupos diferentes: complexos que apresentam estabilização térmica ( $\Delta T_m > 0$ ) ou desestabilização térmica ( $\Delta T_m < 0$ ).

As propostas de interação também foram elucidadas por modelos de baixa resolução obtidos pela análise SAXS de onde foram obtidos envelopes de estruturas para os complexos SelB.GTP e SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. Estes resultados auxiliam na validação e compreensão deste complexo macromolecular em solução e mostram a especificidade de tRNA como um elemento de reconhecimento nesta via bioquímica específica.

Desta forma, este trabalho aborda as estruturas essenciais do tRNA<sup>Sec</sup> para interação com SelB por meio de experimentos biofísicos em solução, indicando que as estruturas dos braços acceptor, T $\Psi$ C e braço variável são pontos essenciais para a realização desta interação.

Para a obtenção da proteína Seril tRNA Sintetase foi realizada um novo protocolo de expressão e purificação, em que se faz necessário a digestão da cauda de tiorredoxina proveniente do vetor de expressão utilizado.

Para a caracterização bioquímica de SerRS foram realizados ensaios de *Western Blot*, dicróismo circular e fluorescência intrínseca de seus resíduos aromáticos em função da adição dos ligantes ATP, L-Serina e tRNA<sup>Sec</sup>.

Medidas de interação de SerRS com tRNA<sup>Sec</sup> na presença da proteína SelA e dos ligantes ATP e L-Serina por anisotropia de fluorescência indicam a grande afinidade da formação destes complexos. Verificou-se que há uma preferência do reconhecimento de SerRS para o complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup> já previamente montado, o que sugere que esta deve ser a ordem de eventos em nível celular. A formação do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> também foi monitorada por microscopia eletrônica de transmissão por

contraste negativo, em que resultados preliminares indicam uma alteração das estruturas esperadas para a proteína SelA ou para o complexo SelA.tRNA<sup>Sec</sup>, sendo que estas são provenientes da interação com a proteína SerRS.

## 7.2 Perspectivas

Como perspectivas deste projeto são propostos os seguintes experimentos a fim de complementar os resultados aqui expressos e dar continuidade à compreensão da biossíntese de selenocisteínas em *E. coli*:

- Realizar medidas de interação do tipo SerRS.tRNA e complexos através de medidas de constantes de interação por Espectroscopia de Anisotropia de Fluorescência e Ultracentrifugação Analítica. Além disso, serão propostos ensaios por técnicas estruturais como Raios-X a baixo ângulo (SAXS) e Microscopia eletrônica de transmissão por contraste negativo (NS-EM) para o monitoramento da formação dos complexos.
- Realizar a cinética do consumo de ATP pela SerRS monitorando o consumo de ATP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).
- Ensaios de aminoacilação do tRNA<sup>Sec</sup> com selenocisteína pela SerRS por meio da reconstrução da via *in vitro*, monitorando a produção de selenoproteínas.
- Aquisição de novas imagens de microscopia de transmissão por contraste negativo e refinamento dos dados para elucidar a estrutura do complexo ternário SerRS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup>.
- Cristalização de SelB e SerRS.





## REFERÊNCIAS

- 1 BURBAUM, J. J.; SCHIMMEL, P. Structural relationship and the classification of aminoacyl-tRNA synthetase. **Journal Biological Chemistry**, v.266, n. 26,p.16965-16968, 1991.
- 2 CUSACK, S. Aminoacyl-tRNA synthetase. **Current Opinion Structure Biology**, v.7, p.881-889, 1997.
- 3 ENGELHARDT, H. et al. Structure of Selenocysteine Synthase from *Escherichia coli* and Location of tRNA in the Seryl-tRNA<sup>sec</sup>-enzyme complex. **Molecular Microbiology**. v.6, n.23, p. 3461-3467, 1992.
- 4 KRYUKOV, G.V.; GLADYSHEV, V.N. The prokaryotic selenoproteome. **EMBO Reports**. v. 5, p.538-543,2004.
- 5 ZHANG, Y. et al. Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. **Genome Biology**, v.17, n. 7R, p.94 – 94, 2006.
- 6 ERIANI, G.et al. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. **Nature**., v.347, p.203-206, 1990.
- 7 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, 1991a.
- 8 SANDMAN, K.E.; NOREN, C.J. The efficiency of *Escherichia coli* selenocysteine insertion is influenced by the immediate downstream nucleotide. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.3, p. 755-761, 2000.
- 9 FORCHHAMMER, K.;BÖCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. analysis of the reaction sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n.10, p. 6324-6328, 1991b.
- 10 IBBA, M.et al. A euryarchaeal lysyl-tRNA synthetase: resemblance to class I synthetase. **Science**. v.278, p. 1119-1122, 1997.
- 11 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.
- 12 LEIBUNDGUT, M. et al. Selenocysteine tRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimaera of elongation and initiation factors. **EMBO Journal**, v.24, n.1, p.11-22, 2005.
- 13 SOLER, N.; FOURMY, D.; YOSHIZAWA, S. Structural insight into a molecular switch in tandem winged-helix motifs from elongation factor SelB. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, p.728-741, 2007. doi:[10.1093/nass/nrm189](https://doi.org/10.1093/nass/nrm189).
- 14 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.274-29, 1993.

15 SCHIMMEL, P. et al. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. **Proceedings. National. Academy of Science USA**, v.90, n.19,p.8763-8768, 1993.

16 ITOH,Y. et al. Tertiary structure of bacterial selenocysteine tRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n.13, p.6729-6738, 2013.

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

18 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..

19 PALIOURA, S. et al. The human SepSecS-tRNA(Sec) complex reveals the mechanism of selenocysteine formation. **Science**, v. 325, n.5938,p.321-325, 2009.

20 ITOH, Y. et al. Crystal structure of human selenocysteine tRNA. **Nucleic Acids Research** v. 37, n.18, p.6259-6268, 2009.

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

22 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 4<sup>th</sup> ed. New York, Worth Publishers. 2004.

23 REGAN, L. et. al. Polypeptide sequences essential for RNA recognition by an enzyme. **Science**, v. 235, n.4796, p.1651-1653, 1987.

24 YOKOYAMA, S. et. al. **Modified nucleosides and codon recognition. tRNA: structure, biosynthesis and function**, Washington: ASPM Press, 1995.p. 207-223.

25 BOREL, F. et al. Seryl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: implication of its N-terminal domain in aminoacylation activity and specificity. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n.15, 2663, 1994.

26 UZMAN, A.(Ed). **Biochemistry and molecular biology education**. New York; Freeman and Company, 2011. p.126-128.

27 ZHANG, G. et al. Different sequence signatures in the upstream regions of plant and animal tRNA genes shape distinct modes of regulation. **Nucleic Acids Research**,v.39, n.8, p.3331-3339, 2011.

28 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.10534-45, 2015.

- 29 GIEGE, R. et al. Crystallogenes trends of free and liganded aminoacyl-trna synthetases. **Crystal Growth & Design**, v.8, n.12, p. 4297–4306, 2008. doi: 10.1021/cg8007766.
- 30 FORCHHAMMER, K.; BÖCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.266, n.10, p.6324-6328, 1991.
- 31 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.
- 32 ENGELHARDT, H et al. Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA<sup>sec</sup>-enzyme complex. **Molecular Microbiology**, v.6, n.23, p.3461-3467, 1992.
- 33 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.
- 34 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.
- 35 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.
- 36 DUNKLE, J. A.; CATE, J. H. D. Ribosome structure and dynamics during translocation and termination. **Annual Review of Biophysics**, v.39, p.227-244, 2010. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125954.
- 37 WOHLGEMUTH, I. et al. Evolutionary optimization of speed and accuracy of decoding on the ribosome. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences** v. 366, n.1580, p.2979-2986, 2011.
- 38 LAALAMI, S. Messenger RNA translation in prokaryotes: GTPase centers associated with translational factors. **Biochimie**, v.78, n.7, p.577-589, 1996.
- 39 RODNINA, M. V.; WINTERMEYER, W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. **Current Opinion in Cell Biology**, v.21, n.3, p.435-443, 2009.
- 40 MILLER, D.L.; WEISSBACH, H. Molecular mechanisms of protein synthesis. In: WEISSBACH, H.; PESTKA, S (Eds). **Molecular mechanisms of protein synthesis**. New York: Academic Press, 1977. p.323-373.
- 41 HILGENFELD, R.; BÖCK, A.; WILTING, R. Structural model for the selenocysteine-specific elongation factor SelB. **Biochimie**, v.78, n.11-12, p.971-8, 1996.
- 42 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.
- 43 PALESKAVA, A.; KONEVEGA, A, L.; RODNINA, M.V. Thermodynamic and kinetic framework of selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> recognition by elongation factor SelB. **Journal**

**Biological Chemistry**, v. 285, n.5, p.3014-20, 2010.

44 VILLA, E. et al. Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.106, n.4, p.1063-1068, 2009.

45 SPIEGEL, J. et al. Small-molecule modulation of Ras signaling. **Nature Chemical Biology**, v.10, n.8, p.613-622, 2014.

46 MUKAI, T. et al. Facile recoding of selenocysteine in nature. **Angewandte Chemistry International Edition**, v.55, p.5337-41, 2016.

47 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.

48 LIU, T. et al. M. The mitochondrial elongation factors MIEF1 and MIEF2 exert partially distinct functions in mitochondrial dynamics. **Experimental Cell Research**, v.319, n.18, p.2893-2904, 2013.

49 SQUIRES, J. E.; BERRY, M. J.:Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. **IUBMB Life**, v.60, n.4, p.232-235, 2008.

50 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.

51 GANICHKIN, O.; WAHL, M. C. Conformational switches in winged-helix domains 1 and 2 of bacterial translation elongation factor SelB. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.63, pt.10, p.1075-10781, 2007.

52 THANBICHLER, M.; BOCK, A.; GOODY, R. S. Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.27, p.20458-20466, 2000.

53 DOBOSZ-BARTOSZEK, M. M. et al. Crystal structures of the human elongation factor eEFSec suggest a non-canonical mechanism for selenocysteine incorporation. **National Communications**, v.7, n.12941, 2016. doi:10.1038/ncomms12941.

54 RHOADS, R. E.; DINKOVA, T. D.; KORNEEVA, N. L. Mechanism and regulation of translation in *C. elegans*. **WormBook**, p.1-18, 2006. doi:[10.1895/wormbook.1.63.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.63.1)

55 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.

56 BIFANO, A.L. et al. Identification of nucleotides and amino acids that mediate the interaction between ribosomal protein L30 and the SECIS element. **BMC Molecular Biology**, v.14, n.12, 2013. doi: 10.1186/1471-2199-14-12.

- 57 KOSSINOVA, O. et al. A novel insight into the mechanism of mammalian selenoprotein synthesis. **RNA**, v.19, n.8,p.1147-1158, 2013.
- 58 ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v.9, p. 40,2008. doi:10.1186/1471-2105-9-40.
- 59 DUKE Biochemistry. Disponível em: <<https://www.biochem.duke.edu/>>. Acesso em: 25 out. 2016.
- 60 PETTERSEN, 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.
- 61 BRAMUCCI, E. et al. PyMod: sequence similarity searches, multiple sequence-structure alignments, and homology modeling within PyMOL. **BMC Bioinformatics**, v.13, Suppl 4, p.2, 2012.
- 62 CREIGHTON, T.E. **The physical and chemical basics of molecular biology**. [s.l]: Halvetian Press, 2010.
- 63 FASMAN, G.D. **Circular dichroism and conformational analysis of biomolecules**. New York: Plenum, 1996.
- 64 MOULTON, V.et al. RNA folding argues against a hot-start origin of life. **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, n. 4, p. 416-421, 2000.
- 65 LEES, J. G. et al. CDtool - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis and archiving. **Analytical Biochemistry**, v.15, n.2, p.332, 2004.
- 66 TOMAY, P. et al. Bacterial selenocysteine synthase-structural and functional properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 254, n. 3, p. 655-661, 1998.
- 67 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. 19, p. 6318-6323, 1991.
- 68 MANZINE, L. R. **Identificação de elementos estruturais no tRNA<sup>sec<sub>uca</sub></sup> determinantes da ligação com proteínas** 2012. p.159. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 69 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.
- 70 SERRÃO, V.H.B. **Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio de *Escherichia coli***. 2013. 187p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 71 TANBICHLER M.; BOCK A. Purification and characterization of hexahistidine-tagged elongation factor SelB. **Protein Expression and Purification**, v. 31, n.2,p. 265-270, 2003.

72 KLUG, S. J. et al. In vitro and in vivo characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.94, n.13,6676–6681, 1997.

73 JOCI, N. A. et al. The structure and properties of septin 3: a possible missing link in septin filament formation. **Biochemical Journal**, v.450, p.95–105, 2013. doi:10.1042/BJ20120851.

74 YASUKAWA, T. et al. Increase of solubility of foreign proteins in escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270,n.43, p. 25328 –25331, 1995.

75 JAMESON, D. M.; SAWYER, W. H. Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. In: SIES, H.; PACKER, L.(Ed.) **Methods in enzymology**. New York: Elsevier Enc., 1995. v.246, p.283-300.

76 LIMA, L. M. T. R.; LIMA, J. Positive contribution of hydration on dna binding by e2c protein from papillomavirus. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.47968–47974,2004. doi: 10.1074/jbc.M407696200

77 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysical chemistry: part II – techniques for study of biological structure and function**. New York: Freeman and Co., 1980.

78 BORGES, J. C.; RAMOS, C, H. I. Analysis of molecular targets of mycobacterium tuberculosis by analytical ultracentrifugation. **Current Medicinal Chemistry**,v.18,n.9 p.1276-1285, 2011.

79 SDENTERP. Disponível em: < <http://sednterp.unh.edu/>>. Acesso em: 25 out. 2016.

80 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.

81 MAVERN. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/products/technology/differential-scanning-calorimetry/>> Acesso em: 22 de dez. 2016.

82 SVERGUN, D. I. Small-angle X-ray and neutron scattering as a tool for structural system biology. **Biological Chemistry**, v.391, n. 7, p. 737-743, 2010.

83 NEYLON, C. Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology: recent examples from the literature. **European Biophysics Journal**, v. 37, n. 5, p. 531-541, 2008.

84 HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D**: an introduction and overview. Grenoble: 1997. ERSF internal report.

85 KONAREV, P. V. et al. PRIMUS – a windows-pc based system for small angle-scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**,v.36,p.1277-1282,2003. doi:10.1107/S0021889803012779.

86 SVERGUN, D. I.; BARBERATO, C.; KOCH, M. H. J. CRY SOL – a program to evaluate

X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, n. 6, p. 768-773, 1995.

87 SVERGUN, D. I. Determination of regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, p. 495-503, 1992. doi: 10.1107/S00218892001663.

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

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

90 KOZIN, M.; SVERGUN, D. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v.34, p.33-41, 2001. doi: 10.1107/S0021889800012126.

91 HÜNEFELD, F.L. **Der chemismus in der thierischen organisation**. [s.l.]Leipzig, 1840.

92 GIEGÉ, R. A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. **FEBS Journal**, v. 280, n. 24, p. 6456-97, 2013.

93 KRAUSS, I. R. et al. An overview of biological macromolecule crystallization. **International Journal Molecular Science**, v.14, n.6, p.11643-11691, 2013. doi:10.3390/ijms140611643.

94 PETOUCHOV, M. V.; SVERGUN, D. I. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. **Current Opinion in structural Biology**, v. 17, n.5, p. 562-571.

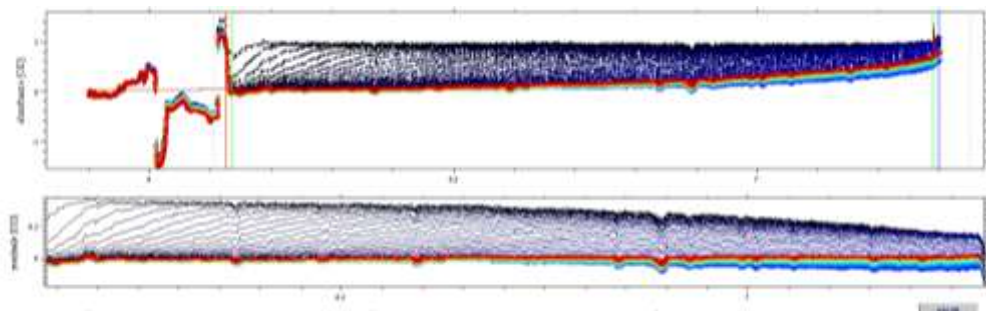




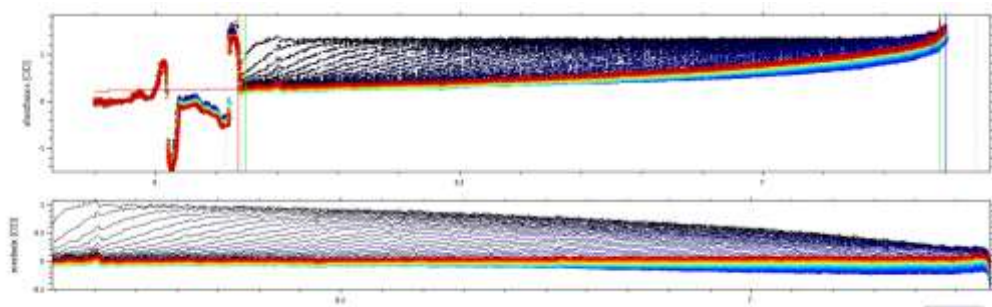
## ANEXO 1 – CURVAS EXPERIMENTAIS POR ULTRACENTRIFUGAÇÃO ANALÍTICA

- Curvas – *Velocidade de sedimentação*

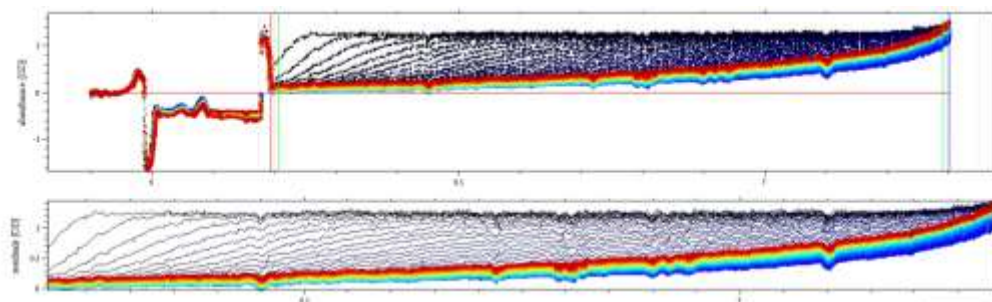
Curva 1 – SelB.GTP



Curva 2 – SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>



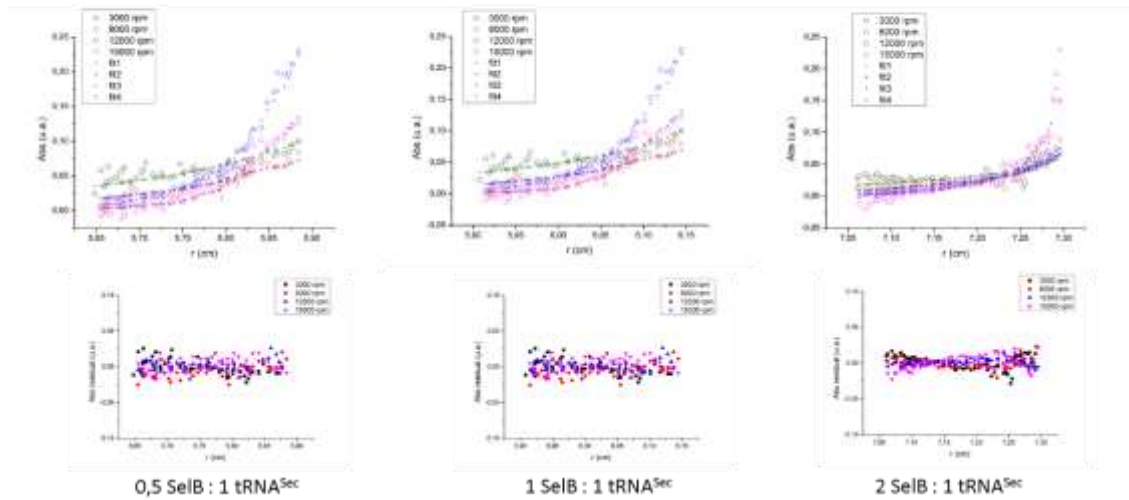
Curva 3 – SelB.GTP.tRNA<sup>Acceptor</sup>



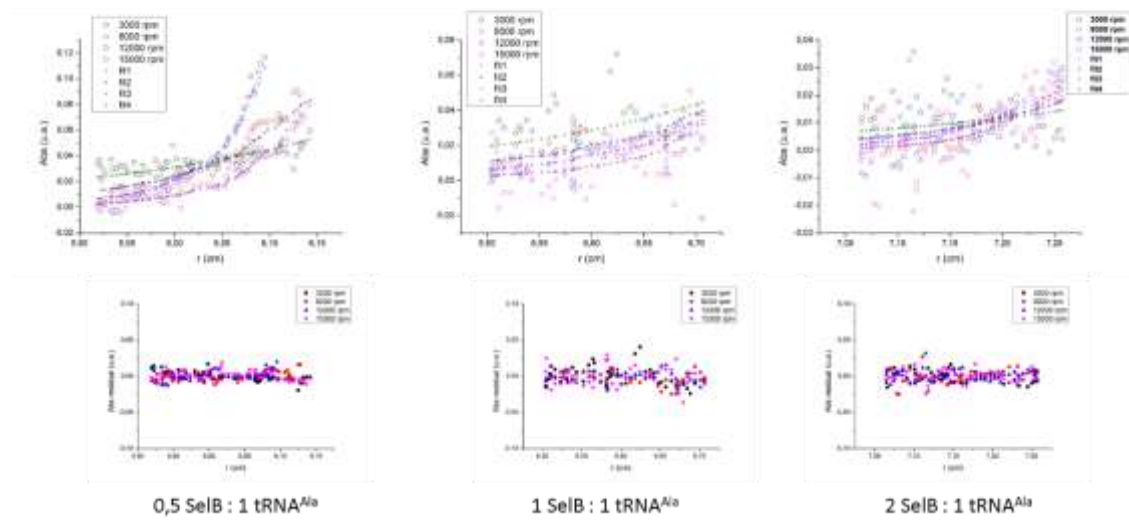


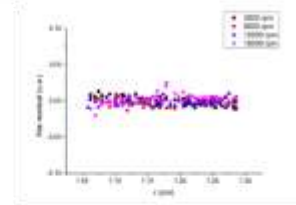
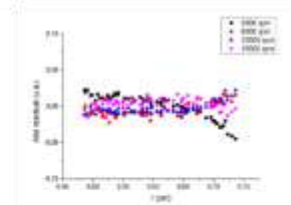
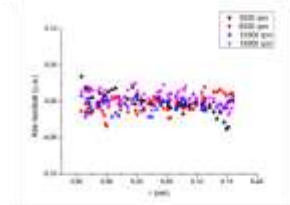
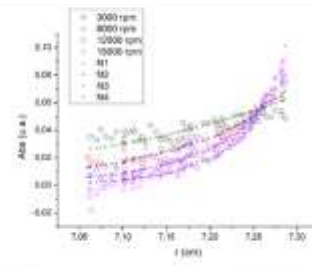
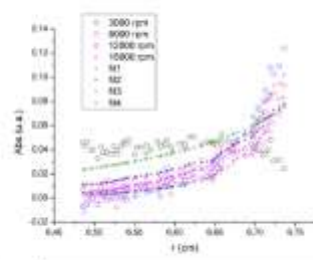
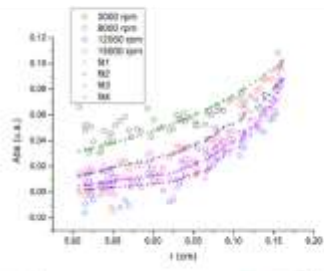
- Curvas – *Equilíbrio de sedimentação*  
 Curva 1 – SelB.GTP

SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>



SelB.GTP.tRNA<sup>Ala</sup>



SelB.GTP.tRNA<sup>Var1</sup>0,5 SelB : 1 tRNA<sup>Var1\*</sup>1 SelB : 1 tRNA<sup>Var1\*</sup>2 SelB : 1 tRNA<sup>Var1\*</sup>

**ANEXO 2 *The specific elongation factor to selenocysteine incorporation in Escherichia coli: unique tRNA<sup>Sec</sup> recognition and its interactions.***  
**ARTIGO A SER PUBLICADO**

Vitor Hugo Balasco Serrão<sup>a,b,†</sup>; Adriano de Freitas Fernandes<sup>b,†</sup>; Luis Guilherme Mansor Basso<sup>c</sup>; Edson Crusca Júnior<sup>d</sup>; Jéssica Fernandes Scortecchi<sup>b</sup>; Marinônio Lopes Cornélio<sup>e</sup>; Bibiana Monson de Souza<sup>f</sup>; Mário Sérgio Palma<sup>f</sup> and Otavio Henrique Thiemann<sup>b\*</sup>.

<sup>a</sup> Physics Department, Federal University of Sao Carlos – UFSCar, 13565-905 Sao Carlos, SP, Brazil;

<sup>b</sup> Physics and Informatics Department, Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo – USP, CEP 13563-120 Sao Carlos, SP;

<sup>c</sup> Physics Department, Ribeirao Preto School of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo – USP, CEP 14040-901 Ribeirao Preto, SP;

<sup>d</sup> Department of Physical Chemistry, Chemistry Institute of the São Paulo State University – UNESP, CEP 14800-900 Araraquara, SP.

<sup>e</sup> Physics Department, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences (IBILCE), Sao Paulo State University – UNESP, Sao Jose do Rio Preto, SP;

<sup>f</sup> Department of Biology/CEIS, Biosciences Institute of Rio Claro, Sao Paulo State University – UNESP, Rio Claro, SP.

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author: thiemann@ifsc.usp.br

Present/Permanent address: 1100 Joao Dagnone Av, Jardim Santa Angelina – Sao Carlos, SP – Brazil. Physics and Informatics Department, Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo – USP, CEP 13563-120 Sao Carlos, SP.

***Abstract***

Selenocysteine (Sec) represents the main biological form of the element selenium and its incorporation into selenoproteins at in-phase UGA-encoded codon requires a complex molecular machinery. The Sec incorporation pathway begins with the L-adenylation of amino acid serine by Seryl-tRNA synthetase with the consumption of ATP and the further transfer of L-serine to tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, resulting in Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>. The Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> is recognized by Selenocysteine synthase for selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> synthesis. Then, Sec-tRNA<sup>Sec</sup> is delivered to the Selenocysteine specific elongation factor (SelB) that is responsible for delivering to the ribosome in presence of Selenocysteine Insertion Sequences (SECIS element) - a hairpin structure present in the mRNA that indicates the position to Sec incorporation. Although it is known the proteins of the selenium incorporation pathway, how tRNA<sup>sec</sup> is recognized by SelB for its subsequent incorporation on the ribosome is not fully understood yet. In this

study, we show the importance of the structural regions of the tRNA for SelB recognition using fluorescence anisotropy spectroscopy, analytical ultracentrifugation and calorimetric assays through interaction with different tRNA<sup>Sec</sup> mutants. In addition, we determined the interactions ordering for SelB complexes with tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS and ribosome. Modeling of SelB was fitted in a low-resolution structure obtained from small-angle x-ray scattering to corroborate with the proposed interaction. We also demonstrated by interaction constants that the acceptor, D-loop and variable arms are essential for the specific SelB recognition. Moreover, SelB initially recognizes the Sela-tRNA<sup>Sec</sup> binary complex in the withdrawn process specific tRNA and subsequently recognizes the SECIS element for its incorporation. Our findings contribute to the understanding of the tRNA<sup>Sec</sup> role and shed light on the ordering of events in selenocysteine delivery. Furthermore, we showed, for the first time, the binding constants between SelB and tRNA<sup>Sec</sup> mutants indicating the variable arm dependence and the event ordering to Sec delivery.

### **Highlights**

- An efficient protocol for *Escherichia coli* specific elongation factor (SelB) purification and its biochemical analysis of tRNA<sup>Sec</sup> specificity;
- Elucidate the Sec incorporation pathway having SelB as checkpoint through the dissociation constant values observed in the formation of complexes with tRNA, SECIS element, Sela and ribosome;
- Determine the order of events in the withdrawal process of mature Sec-tRNA<sup>Sec</sup> from binary complex Sela.tRNA<sup>Sec</sup> and delivery to the ribosome by constant interaction values.

### **Keywords**

- Selenocysteine; Elongation Factor; SelB; tRNA<sup>Sec</sup>, Protein-RNA interaction.

### **Abbreviations used:**

ACN: Acetonitrile; ATP: Adenosine 5'-triphosphate; CD : Circular Dichroism; DSC: Differential Scanning Calorimetry; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EF: Elongation factor; FAS: Fluorescence Anisotropy Spectroscopy; GTP: Guanosine-5'-triphosphate; GDP: Guanosine-5'-diphosphate; HPLC: High-Performance Liquid Chromatography; IFS: Intrinsic Fluorescence Spectroscopy; IPTG: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; ITC: Isothermal Titration Calorimetry; LB: Luria Broth; PBST: Phosphate Buffered Saline with Tween; PLP: Pyridoxal 5'-phosphate; Sec: Selenocysteine; SEC: Size-exclusion chromatography; SECIS: Selenocysteine Insertion Sequence; SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide

Gel Electrophoresis; SelA: Selenocysteine Synthase; SelB: selenocysteine-specific elongation factor; SelC: selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup>; SelD: Selenophosphate Synthetase; SerRS: Seryl-tRNA Synthetase; PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride.

### ***Introduction***

Selenium has been recognized as an essential element into all life domains, despite its high cell toxicity [1,2]. A specific repository of selenium compounds is an unconventional amino acid, selenocysteine (Sec, U), which is the biological form of selenium in the cells and is present in the three domains of life (Bacteria, Archaea, and Eukarya).

The Sec amino acid is co-traditional incorporated into specialized selenoproteins that are involved in several functions such as oxidoreduction, redox signaling, and antioxidant defense [1,3]. The Bacterial Sec, for instance, is synthesized on the specific L-serine-aminoacylated tRNA (Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>) and incorporated into selenoproteins at UGA stop codons. Some proteins and RNAs are required for this incorporation. In particular, the specific tRNA<sup>Sec</sup> (SelC) and a specific mRNA structure denominated Selenocysteine Insertion Sequences (SECIS element) [1,3] represent the RNA elements of this specific pathway.

The Sec biosynthesis in Bacteria domain is initiated by the charging of tRNA<sup>Sec</sup> with L-serine (L-Ser) by Seryl-tRNA synthetase (E.C. 6.1.1.11, SerRS), a class-II aminoacyl-tRNA synthetase, to form the L-Seryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, or Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>. The Ser-Sec conversion is catalyzed by Selenocysteine synthase (E.C. 4.2.1.-, SelA), a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent homo decameric enzyme with approximately 500 kDa [4]. The Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> is covalently bound to SelA through the interaction with PLP bound to the catalytic lysine residue, which results in a binary complex consisting of 1 SelA<sub>decamer</sub> : 10 Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> [5,6]. The selenophosphate used in this conversion is delivered to the binary SelA-tRNA<sup>Sec</sup> complex by the dimeric Selenophosphate synthetase enzyme (E.C. 2.7.9.3, SelD), forming a transient ternary complex, SelA-tRNA<sup>Sec</sup>-SelD, that contributes to the Ser-Sec conversion, resulting in L-Selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> [7].

Since tRNA<sup>Sec</sup> is aminoacylated with Sec amino acid, the resulting Sec-tRNA<sup>Sec</sup> is recognized by selenocysteine-specific elongation factor (E.C. 3.6.5.-, SelB), which is responsible for delivering this aminoacyl-tRNA to the translational machinery for incorporation into selenoproteins [8].

Differently from other elongation factors (EFs), SelB presents four independent domains. Two of them are also present in other EFs: a conserved GTPase N-terminal domain, responsible for GTP-GDP conversion and ribosome recognition, as well as a wing domain, responsible for

tRNA recognition. Furthermore, SelB also exhibits a unique C-terminal domain that is responsible for SECIS recognition that provides the specific Sec incorporation around that structural RNA element that was the first SelB domain resolved by crystallography interacting with a part of SECIS element [9;10].

SelB has been characterized since the early 1990s and only recently start to be widely characterized [8]. The N-terminal domain of SelB shares high homology with canonical N-terminal EF-Tu domain and other EFs that provided the homologous modeling to the structure inferred in 2005 [10]. Binding studies of this GTPase N-terminal domain with nucleotides were investigated by calorimetric and fluorimetric methodologies, which revealed a GTP preference over GDP (KD of 0.7  $\mu$ M and 13  $\mu$ M, respectively) [11]. These results suggest an event ordering: binding of GTP to SelB is a prerequisite for tRNA<sup>Sec</sup> recognition and hydrolysis to occur after tRNA<sup>Sec</sup> delivery at ribosome [11]. On the other hand, the wing domain is responsible for tRNA<sup>Sec</sup> recognition by the specific tetrad nucleotides in acceptor-T $\Psi$ C helix [12], denoting the relevance of different tRNA structural elements for its recognition in the pathway. The third domain is responsible for SECIS recognition by the apical helix recognition [13], providing the specificity to UGA recognition.

In 2015, Itoh *et al* solved the full-length bacterial SelB structure from *Aquifex aeolicus* by X-ray crystallography, which provided new insights on tRNA and Ribosome recognition by molecular modeling [9]. In their study, SelB was divided into three main regions: N-terminal, C-terminal and a flexible linker (N-C linker) composed by two  $\alpha$ helices that connect the N-terminal and C-terminal portions. The C-terminal section was further subdivided into three different domains: I, II and III [8]. The domain I of SelB has a high conserved folding of  $\alpha/\beta$  topologies, having an allosteric catalytic site that suffers conformational variation due to the GTPase process in the presence of magnesium [15]. The suggested interaction region of SelB with the tRNA is the interface of the domains D1 and D2 with the acceptor arm tRNA<sup>Sec</sup> while the T $\Psi$ C arm is recognized by D3 domain [9]. Another structural information is the N-terminal portion of SelB, which present four winged-helix: WDHD1, WHD2, WHD3 and WHD4. The first two winged-helix (WHD1 and WHD2) are responsible for the interaction with the ribosome and are separated from the latter (WHD3 and WHD4) by a flexible portion that guarantees conformational freedom to WHD3 and WHD4 portions. This flexibility might enable SelB to recognize the SECIS element for different mRNAs and then adjust them to ribosome entry site in the presence of Sec-tRNA<sup>Sec</sup> [9]. This proposal was clarified by the SelB complex structure obtained by cryo-electron microscopy [14], where the complex with the specific RNAs (tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element) and ribosome was solved resulting in an



electronic map at 3.6 Å resolution. The linker present at domains 3 and 4 promotes a tRNA conformational change in the variable arm portion, which allows the accommodating inside the SelB pocket. The 8/5 acceptor and T $\psi$ C arms fold and the variable arm are essential for the interaction with SelB and thus its distinction in comparison with canonical tRNAs. However, the interaction constants are not fully known. The domain 4 of SelB is extremely flexible and when the GTP binding domain is activated, the SECIS element is responsible for the recognition of the SelB.Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS ternary complex at the 30S subunit of the ribosome, as previously suggested [9, 14-17].

Moreover, Dobosz-Bartoszek and collaborators proposed that the mechanism of interaction between the specific elongation factors and Sec-tRNA<sup>Sec</sup> is different from that for the canonical EF-Tu. Contrarily to other EF-Tus, SelB has affinity constants similar to both GTP and GDP. Through analysis of X-ray structures of the complexes of human EFSec, Dobosz-Bartoszek *et al* showed that the D4 portion of the mammalian eEFSec is the portion that undergoes a major conformational change in the presence of guanine nucleotides. This surprising result goes contrary to what was expected, once it is not the interaction domain with guanine nucleotide. This feature may be related to the regulation of GDP-GTP hydrolysis, as well as to being responsible for binding to a nucleotide that differs from the others EF-Tu [19].

Zinoni and collaborators initiated an event sequence to Sec delivery by SelB, which initially the ribosome moves until the UGA codon forming a complex to SECIS element [20]. Then, the Sec-tRNA<sup>Sec</sup>.SelB.GTP complex is stabilized by the interaction with SECIS element connected to the ribosome, which in turn delivers the Sec-tRNA<sup>Sec</sup> to A site of ribosome for its incorporation into the polypeptide chain [20-21]. However, the mechanism to Sec-tRNA<sup>Sec</sup> delivery is not fully understood [21]. It is inferred that the SelB protein recognizes the acceptor arms and T $\psi$ C due to 8/5 structure of tRNA<sup>Sec</sup> regardless of their coding sequence.

In this study, we performed the characterization of SelB with tRNA<sup>Sec</sup> and 6 different tRNA<sup>Sec</sup> mutants from *Escherichia coli* to investigate their specificity and selectivity in solution. For these experiments, fluorescence anisotropy spectroscopy was used to determine the dissociation constants between the macromolecular complexes formed during Sec incorporation, and intrinsic fluorescence spectroscopy and differential scanning calorimetry further corroborated the formation of SelB.tRNA<sup>Sec</sup> complex. The formation of these complexes was corroborated by measurements of sedimentation velocity and equilibrium constants through analytical ultracentrifugation analysis. Subsequently, the formation of SelB.RNAs complexes as well their variable interactions with Sella and ribosome were

examined in relation to the sequence of formation of these complexes. Our results will improve the knowledge of the Sec incorporation into selenoproteins as well as elucidate the importance of tRNA structural elements for this specific biosynthesis pathway. Furthermore, we showed, for the first time, the binding constants between SelB and tRNA<sup>Sec</sup> mutants indicating the variable arm dependence and the event ordering to Sec delivery.

## **Results**

### ***SelB expression and purification***

SelB full-length sample was obtained from the previously described overexpression and purification methodologies were applied to a 15% SDS-PAGE gel to verify the presence of the recombinant protein of interest [22]. The gel revealed the presence of ~ 69 kDa corresponding to SelB (Theoretical Mass = 68.87 kDa), which was further confirmed by mass spectrometry analysis. These experiments were carried out by gel digestion with the addition trypsin (Sigma) after treatment with acetonitrile with the identification of peptides by mass spectrometry digestion gel with 52% coverage. Moreover, samples from SDS-PAGE were confirmed by western blot analysis using anti-His antibodies (Figure SI1).

### ***Determination of endogenous RNAs and nucleotides-free sample***

SelB can interact with RNAs [1,3], it is expected co-purification of this nucleotide with the protein. Then, Qubit® spectrophotometer was used to infer the amount of endogenous RNA present in the final purification product, as can be seen in Table SI1. Free-RNA protein samples are guaranteed after RNase (Promega) treatment.

In our analysis, it can be clearly seen that there is degradation since the RNA concentration measured 1 h after RNase treatment shows an RNA fraction of 70% and after either a 12 h or an overnight RNase treatment, the sample is completely free from endogenous RNAs. From these results, an overnight RNase treatment was added to the current expression and purification protocol for SelB in which the protein can be obtained free of endogenous RNA.

The GTP-free sample was observed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), where monitoring at 253 nm was not identified GTP or GDP nucleotides co-purified with SelB samples (Fig. SI 2A), such as an RNA and nucleotide-free sample, which allowed the binding experiments.

### ***Characterization of the mutants tRNAs and SECIS element***

The tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS element, and mutants tRNA<sup>Sec</sup> genes were first amplified by PCR and subsequently transcribed thereby obtaining the functional RNAs [23]. To ensure that the RNAs are properly coiled, circular dichroism experiments were performed, since these RNA have secondary structures resulting in characteristic curves in monitoring a function of temperature (Figure SI 3-A). The RNAs were used in the experiments interaction with SelB, and part was subjected to the labeling protocol. The label confirmation was performed by quantification of tRNA and measures in the previous fluorimeter to Fluorescence Anisotropy Spectroscopy (FAS) experiments with excitation at 480 nm and monitoring the wavelength range 510-530 nm.

### ***Binding constants of SelB complexes formation by fluorescence analysis***

As the previous know, the elongation factors (EFs) needs GTP to allow the interaction with the specific tRNA [11; 14; 24], therefore the GTP excess (1 mM) was used during all binding assays. The first methodology used was the interaction with specific tRNA<sup>Sec</sup> using Intrinsic Fluorescence Spectroscopy (IFS). The emission spectra of the tryptophan residues from SelB after RNase treatment are shown in Figure 1-A, the, increasing concentrations of tRNA<sup>Sec</sup> were titrated in SelB whose intrinsic fluorescence was monitored. The maximum emission shifted to lower wavelengths indicative of occlusion of tryptophan residues and exhibits a maximum in the emission values. Is notable that the wavelengths corresponding to the maximum emission indicate that the relative positions of the exposed tryptophan from protein. Correlating the maximum intensity values for the concentration was titrated tRNA<sup>Sec</sup> possible to obtain a binding curve which, by fitting the Hill function, it was possible to determine the value of  $K_D$  ( $248 \pm 59$ ) nM and cooperativeness index  $n = (1.7 \pm 0.7)$  may indicate non-cooperativity in the SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> ternary complex formation and low nanomolar interaction binding constant.

Moreover, we also applied Fluorescence Anisotropy Spectroscopy (FAS) assays to corroborate those results, where using tRNA<sup>Sec</sup> and its mutants and SECIS element covalently labeled with 5-maleimide-fluorescein at its 5' end, FAS experiments were conducted maintaining constant concentration tRNA present in saturating conditions GTP in the sample and the concentration of SelB it was increased by monitoring the anisotropy values of probe solution (Figure 1-B). The increase in anisotropy values indicates the formation of the complex in solution SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> and sigmoidal profile indicate a connection characteristic of biological molecules in solution. By Hill function fit was possible to

determine the values of  $K_D = (283 \pm 53)$  nM and  $n = (1.4 \pm 0.6)$  corroborating the results obtained for IFS analysis. The curve has two transitions that may be related to the fact SelB have two domains interacting with RNAs, and at high concentrations, lead to the interaction of the interaction domain to SECIS (C-terminal domain) interact with this tRNA solution.

In other analysis, the sequence ordering of SelB complexes was performed by the same method. The SelB.GTP.SECIS binding was observed using SECIS-fluorescein labeled and increasing the SelB concentration resulting in  $K_D = (57 \pm 13)$  nM and  $n = (2.6 \pm 1.5)$  (Figure 1-C). However, this binding constant might be affected, since when we evaluate the quaternary complex (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS), following a previously SelB.SECIS sample was prepared in equimolar ratio were carried out in tRNA<sup>Sec</sup>-fluorescein labeled sample following as described previously (Figure 1-D), results in  $K_D = (895 \pm 57)$  nM and  $n = (1.8 \pm 0.8)$  diverging with previous values obtained for the previous complex analyzed and presenting a higher binding constant in comparison with SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>. The reverse binding (e.g., SECIS-fluorescein labeled sample and performing SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> titrations) was also performed, which resulted in  $K_D = (77 \pm 3)$  nM and  $n = (7.3 \pm 2.5)$  (Figure 1-E). These result clearly show the tRNA<sup>Sec</sup>-dependence to SECIS binding during quaternary complex formation (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS), which was corroborated by quantitative electrophoretic mobility shift assays.

Furthermore, in order to determine the order of events, 50 nM SelA.tRNA<sup>Sec</sup> previously prepared in the cuvette received increasing titers of SelB and FAS was monitored by a mass increase for the formation of the ternary complex (Figure 1-F). The analysis of the curve settings reveal values of  $K_D = (72 \pm 14)$  nM lower than that observed for other complex  $n = (2.4 \pm 0.9)$  indicating cooperativeness, so it was possible to infer a hypothesis to the order of Sec incorporation via events when analyzing the constant data.

Finally, the ribosomes complexes were analyzed using the complexes previous established. The ribosome sample (NEB) was titrated in a solution containing the ternary SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> complex, which results in  $K_D = (84 \pm 6)$  nM and  $n = (7.3 \pm 3.2)$  (Figure 1-G). The same procedure was used to SelB.GTP.SECIS and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS complexes, resulting in  $K_D = (110 \pm 9)$  nM;  $n = (3.3 \pm 0.7)$  (Figure 1-H) and  $K_D = (21 \pm 2)$  nM;  $n = (2 \pm 1)$  (Figure 1-I), respectively. The tRNA<sup>Ala</sup> was used as negative control, whereas the acceptor and T $\psi$ C arms present distinguished pairing and a short variable arm, in addition to a specific anticodon to Alanine incorporation. All dissociation constants and cooperativity indexes are presented in Table 1.

### ***Isothermal Titration Calorimetry (ITC) to binding enthalpy determination***

The dissociation constants determined by FAS can be used to infer the Gibbs free energy change upon binding of the tRNAs to SelB. In order to characterize the full thermodynamics of the complexes formation, though, it is necessary the determination of the enthalpy changes and the entropy change of the interacting systems. Therefore, we measured the apparent molar enthalpy change ( $\Delta H_{app}$ ) by single-injection ITC experiments. First, GTP was titrated into a solution containing SelB and the determined  $\Delta H_{app}^{GTP}$  of GTP binding to SelB was  $-(8.40 \pm 0.03)$  kcal/mol (Fig. SI 4.A). Then, both tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS were subsequently titrated into a SelB.GTP solution to determine the enthalpy change of the ternary and quaternary complexes formation. The apparent  $\Delta H_{app}$  found for the formation of SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> was  $-(6.18 \pm 0.05)$  kcal/mol (Fig. SI 4.B) and that found for SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS was  $-(2.38 \pm 0.09)$  kcal/mol (Fig. SI 4.C). Combining the Gibbs free energy estimated by FAS and the apparent molar enthalpy obtained by ITC, it was possible to infer the full thermodynamics parameters of these complexes formation (Table 1). At experimental design is possible to infer that the quaternary complex formation has an important entropy contribution comparing with the other complexes previous measured, most probably by the solvation water exchange.

***Qualitative electrophoretic mobility shift assays at native conditions.***

The stoichiometry of SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> ternary complex and the tRNA<sup>Sec</sup>-dependence to SECIS binding were demonstrated by a qualitative electrophoretic mobility shift assays in agarose gel (Fig. SI 4.D). An increase of the SelB.GTP concentration results in higher molecular complexes in comparison with the standards RNAs used as controls (tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element), where the stoichiometric ratio 1 SelB.GTP : 1 tRNA<sup>Sec</sup> as possible observe the complexes with higher molecular mass in comparison with tRNA<sup>Sec</sup> used as a standard. Interestingly, the same stoichiometry ratio does not affect the SECIS element, unless in the presence of tRNA<sup>Sec</sup>. This result corroborates with the binding constants obtained by FAS, where the interaction of the ternary complex SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> with SECIS presents a low nanomolar  $K_D$  value.

***Dissociation constants of tRNAs mutants reveals the variable arm dependence***

Similarly to the previous section, we also performed FAS assays with the tRNAs mutants to investigate which part of the tRNA is important for complex formation. The dissociation constants determined from FAS experiments are presented in Table 2. From our analysis, we classify the interactions between SelB and tRNAs mutants into two distinct groups depending on the degree of alteration of the dissociation constant. The first group is represented by the

mutants that slightly altered  $K_D$ , i.e., the mutations in Anticodon and D-loop arms as well as the negative control, tRNA<sup>Ala</sup> [Figure 2A]. On the other hand, mutations in the acceptor, T $\psi$ C and variable arms considerably decrease the affinity for SelB. As expected, changes in acceptor and T $\psi$ C structures indeed should disturb the interaction [14, 21]. From our studies, we can further infer that the additional variable arm also decreases the affinity, indicating that it is involved in the interaction with SelB (Table 2).

To corroborate these data, analytical ultracentrifugation (AUC) experiments were performed to understand the formation of the SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> complex. For these analyses, we proceed with the investigation of fundamental structures of tRNA<sup>Sec</sup> for SelB recognition. Figure 2B shows the distribution of the sedimentation coefficients for SelB and its complexes with tRNAs, which is clearly seen only one peak centered at 4.770 S for SelBapo and two well-resolved peaks for the binary SelB.tRNAs complexes. The appearance of this additional peak at higher sedimentation coefficient is an evidence of complex formation. The sedimentation coefficient found for the canonical tRNA<sup>Sec</sup> bound to SelB (7.310 S), is smaller than those obtained for the other tRNAs, which suggests that the SelB.tRNA<sup>Sec</sup> complex exhibits a more compact structure. Interestingly, the second peak is absent in the case of SelB bound to the tRNA mutant with its arm variable deleted (var1) suggesting that this structure is essential for complex formation [Table SI 2]. These results agree with the conclusions reached by fluorescence.

The dissociation constants of SelB and tRNAs were also determined from the equilibrium experiment carried out with three distinct SelB:tRNAs molar ratios (Figure SI 5). The  $K_D$  values found were: 256.4 nM for SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, 623.5 nM for SelB. tRNA<sup>Ala</sup> (tRNA<sup>Ala</sup> took as a negative control), and 755.9 nM for the tRNA mutant with the deleted variable arm (Table 3). These results are in agreement with those obtained by fluorescence, confirming again the importance of the variable arm for the interaction with SelB, once tRNA<sup>Ala</sup> has a shorter variable arm if compared to tRNA<sup>Sec</sup>, behaving similarly to tRNA deleted arm (Tables 2 and 3).

### ***Protein thermal stability in the presence of nucleotides and complexes***

Once verified that SelB is purified as GTP-free samples, CD and DSC assays were employed to investigate the thermal stability of SelB in the presence of nucleotides.

Figure SI 6 shows the folded fraction of the protein as a function of temperature in the presence of GDP (left) or GTP (right). Fitting to the experimental data with a Boltzmann function allowed the determination of  $T_m$  values for SelB.GTP ( $50.3 \pm 0.2$ ) °C and SelB.GDP

( $49.1 \pm 0.1$ ) °C. These  $T_m$  values indicate the formation of a more thermally stable protein-nucleotide complexes as compared with the apo sample. The  $T_m$  difference between SelB in saturating conditions of nucleotides and SelB<sub>apo</sub> is 2.1 °C for GTP-bound form and 0.9 °C for GDP-bound form ( $T_m$  of SelB<sub>apo</sub> is ( $48.2 \pm 0.4$ ) °C). Thus, GTP promotes a more stabilizing effect on protein structure than GDP. DSC experiments were also carried out to verify the thermal stability of SelB in the presence of the nucleotides. In this experiment, the excess heat capacity of the protein is recorded over a temperature range from which the calorimetric enthalpy change ( $\Delta H_{cal}$ ) and the  $T_m$  of the protein unfolding transition can be obtained. Figure 3 shows representative DSC traces from nucleotide-bound (solid line) and nucleotide-free (dashed line) SelB. The thermal unfolding of the apo protein is characterized by an unfolding  $\Delta H_{cal}$  of ( $210 \pm 10$ ) kcal/mol and a  $T_m$  of ( $47.4 \pm 0.2$ ) °C, slightly different from that observed by CD. As can be observed, nucleotide binding to SelB does not significantly change  $\Delta H_{cal}$  of the binary systems and GTP do shift the thermograms to higher temperatures, which indicates higher thermal stability (Figure 3, Table 4).

DSC assays were also employed to evaluate the thermal stability of the ternary or quaternary complexes formed between the binary SelB.GTP and tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS, and tRNA<sup>Sec</sup> mutants. The  $T_m$  of SelB.GTP was used as a reference to calculate the  $\Delta T_m$  changes upon complex formation. From that analysis, it was possible to categorize the changes into two different groups: thermal stabilization ( $\Delta T_m > 0$ ) and thermal destabilization ( $\Delta T_m < 0$ ). The first group (tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS element and its complexes, and Tdom and Anticodon arms) contains the samples whose ternary or quaternary complexes are more thermally stable than SelB.GTP. On the other hand, the second group was formed by the others complexes (variable arm mutants, D-loop and acceptor arms, and the negative control tRNA<sup>Ala</sup>) and exhibited a negative displacement of the  $T_m$  peak, evidencing the formation of less stable complexes. All calorimetric parameters obtained from the analysis of the thermograms are shown in Table 4.

### ***Kinetics assays during complexes formation***

Analogous as previously described to GTP endogenous contamination measurements, the high-performance liquid chromatography was used to evaluate the stability of these complexes upon RNAs and Ribosome interaction, which is essential to validate the interaction constants previously obtained. The chromatogram is shown in Fig. SI 2B reveals the GTP stability during all complexes formation up to 60 minutes, allowing the interaction with tRNA<sup>Sec</sup>, SECIS element and ribosome at GTP saturating conditions, whereas is a fundamental binding condition as previous know [11; 14; 24].

### ***Evaluation of secondary structure changes by Infrared Spectroscopy (FTIR)***

As previously indicated by crystallography [19] and Cryo-Electron Microscopy (Cryo-EM) [14] studies, the secondary structure of SelB is changed during GTP-GDP conversion. Thus, FTIR assays were performed to calculate the percentage of secondary structure variation due to complexes formation. The secondary structure percentages obtained by FTIR spectra [Fig. SI 7] deconvolution are represented in Table 5. The SelB.GTP sample was used as our standard since previous studies inferred the secondary structure variation during GTP-GDP conversion [14, 19]. SelB.GTP present 42.8%  $\beta_{\perp}$  and 2.2%  $\beta_{\parallel}$  sheets, 15.6%  $\alpha$ -helix, 16.1% turns and 23.1% random structures. In contrast, the ternary complex SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> showed an important variation, where there was an accretion of  $\alpha$ -helix structures (37.2%) and consequently  $\beta$  sheets decreasing proportionally. Interestingly, the quaternary complex SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS do not present a considerable variation in secondary structures components, which indicates an important structure displacement to tRNA<sup>Sec</sup> recognition and consequently produce a good shape and conformation to SECIS interaction.

### ***Surface mapping of SelB.RNAs complexes by Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry (HDEx-MS) reveals the specific regions to RNAs interaction in solution***

HDEx-MS was applied to identify the solvent-accessible sites in SelB by comparing the exchange rates of H/D on the sample in the bound and unbound states. As shown by the coverage map (Fig. 4.A), 38 peptides corresponding to 52% of coverage of the SelB primary structure were observed. Analysis of the incorporation times reveals that the solvent accessible region is mostly located in the C-terminal domain (WHD3 and WHD4) likely due to its elongating conformation. No significant difference was observed in the deuterium stained samples between 5 and 30 minutes that is possible show in the plot performed in the 3D structural model (Fig. 4B).

Following the SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> binary model using 30 minutes of deuterium stain, the N-terminus (P37-L48) reduced drastically the deuterium incorporation. Also, the WHD2 (T184-L300) incorporated low deuterium (Fig.4C). This domain is responsible for tRNA<sup>Sec</sup> acceptor and T $\psi$ C arms recognition as previously inferred by crystallographic structures and Cryo-EM models [14, 19]. Interestingly, the WHD3 (T429-L480) and WHD4 (P481-K614) domains also reduced the stained. WHD3 was identified by Cryo-EM single particle analysis as fundamental to tRNA<sup>Sec</sup> incorporation only with SelB complexed with ribosome [14]. Although SelB recognition of the tRNA<sup>Sec</sup> acceptor and T $\psi$ C arms were identified since



beginning of 90's [8, 16] and by recent studies [11, 14, 19, 24], the interaction of the variable arm with SelB-WHD3 domain was elucidated only recently by Cryo-EM and the affinity constants are presented in previous sections and corroborated by the H/DEx surface mapping, which indicating the essential SelB-variable arm recognition to Sec-tRNA<sup>Sec</sup> delivery at ribosome A-site (Fig. 4D).

Finally, WHD4 presented a low incorporation in the presence of SECIS element as previously expected (Fig. 4C) [14, 25]. This domain is responsible for SECIS specific recognition and correct targeting to Sec-tRNA<sup>Sec</sup> delivery.

### ***Low-resolution model in solution by Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)***

For comparison with high-resolution structures for bacterial SelB, we strive to determine the low-resolution model by Small Angle X-Ray Scattering (SAXS). The scattering curves and Guinier plot are represented in Fig. SI 8. SAXS models were determined for SelB<sub>apo</sub> and the SelB.tRNA<sup>Sec</sup> and SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS complexes.  $D_{\max}$  of SelB<sub>apo</sub>, SelB.tRNA<sup>Sec</sup>, and SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS were, respectively, 14.65 nm, 15.0 nm, and 18.77 nm, which clearly highlights the complexes formation (Table SI 3). The low-resolution models calculated by distribution function [Figure 5A] were used to fitted the model obtained by modeling for *E. coli* SelB structure based on the structure solved by Itoh to *A. aeolicus* SelB [9]. From models obtained, it is observed that there is a presence of flexible regions, particularly to models that refer to complex with RNAs. These results suggest that the protein undergoes conformational changes due to interaction with RNAs, as shown by SAXS from heEFSec recently published [19] and by the high-resolution structures of SelB.RNAs complexes determined by Cryo-EM at 3.6 Å resolution [14]. The low-resolution models for SelB.GTP (Fig. 5B), SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> (Fig. 5C) and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (Fig. 5D) complexes are represented in transparent surface fitted with SelB model interacting with tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element.

### ***Discussion***

A new protocol for overexpression and purification of SelB full-length was established with increased yield compared with previously established [22]. The main change of this protocol was the inclusion of an additional step of degradation by RNase due to the observed co-purified endogenous nucleotide RNAs. The purification product was characterized by mass spectrometry and western blot ensuring the achievement of the required sample. Moreover,

the results at 25 °C demonstrated that we purify GTP-free SelB sample. The absence of co-purified nucleotides in the final purification product may not interfere in the binding constants between SelB and the nucleotides and should have been considered in previous studies [11, 24].

The RNAs elements (SECIS element, tRNA<sup>Sec</sup> and its different constructions) presented a correct fold during its production, which validate the binding assays. The tryptophan quenching was applied, since SelB has 11 tryptophan residues at RNA binding regions (WHD2 until WHD4 domains). The binding to ternary complex, with GTP excess, SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> reveals ( $248 \pm 59$ ) nM that corroborates with the binding constant obtained by fluorescence anisotropy spectroscopy using tRNA<sup>Sec</sup>-fluorescein-labeled ( $K_D = (283 \pm 53)$  nM). As the same, the cooperativity index for this ternary complex indicates a non-cooperativity interaction.

In order to understand the sequential of the event during how the Sec-tRNA<sup>Sec</sup> is delivered at ribosome A-site, others complexes were tested using the same methodology (fluorescence anisotropy spectroscopy). Based on results present in Table 1, is possible infer as a mechanism to Sec pathway in Bacteria (Fig. 6).

The interaction of SelB.GTP tRNA<sup>Sec</sup> is facilitated by the presence of Sela, given the low value obtained constant and cooperativity in interaction. The fact that biologically reasonable given that tRNA<sup>Sec</sup> is not abundant in the cell environment and the track must be extremely efficient due to the high toxicity of selenium compounds [4, 7, 22]. The interaction of the complex with SelB.GTP.SECIS.tRNA<sup>Sec</sup> revealed high constant value when compared with the other combinations tested, indicating that the mounting SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> complex is favorable when compared with the formation of the complex in the presence of SECIS. By combining this information, it is possible to infer a sequence order where SelB.GTP recognizes seal tRNA<sup>Sec</sup> for withdrawal resulting in SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> complex that subsequently recognizes the SECIS element for delivery to the ribosome. This hypothesis is based on the constant values of interaction and cooperativity index shown in Table 1 and it was corroborated by quantitative electrophoretic mobility shift assays, which shown the SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS quaternary complex formation in presence of both RNAs elements. The full thermodynamics parameters of these complexes were showed in Table 1, the apparent molar enthalpy determined ( $\Delta H_{app}$ ) for each complex allowed the thermodynamics interpretation, inferring the entropy for these complexes.

As previous known, GTP interacts to SelB by residues Asp119 (*Ec*Asp115), Lys117 (*Ec*Thr113), Ala151 (*Ec*Ala147) and Val152 (*Ec*Val152) [9]. The Domain II and III portions

consists of two  $\beta$ -barrel [19] and is responsible for the recognition of the acceptor and T $\Psi$ C arms of the specific tRNA [14, 19] by specific interaction with the 13-bp long acceptor-T $\Psi$ C helix with 8/5 bp in bacteria, which contribute to the exclusivity of Sec-tRNA compared to other RNAs [14, 19]. Only recently, the tRNA<sup>Sec</sup> variable arm dependence was determined by the single particle analysis Cryo-EM of the ribosome in complex with SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS [14], which directly corroborate with our in solution results. By fluorescence anisotropy spectroscopy and analytical ultracentrifugation, we report the binding constants of different tRNA<sup>Sec</sup> mutants, where we evaluate the binding constants and the importance of its specific interactions. The variables arms constructions indicate binding constants similar to our negative control (tRNA<sup>Ala</sup>) showing an inespificity for its interactions.

Furthermore, CD and DSC show that SelB interacts with either GTP or GDP in saturating conditions. The  $T_m$  of the nucleotide-bound forms is higher than the apo form. Also, the  $T_m$  of the GTP-bound form is approximately 1.2 °C higher than the  $T_m$  of SelB.GDP, indicating that SelB.GTP forms a more thermally stable binary complex than the GDP-bound SelB that is energetically more favorable to occur, revealing that SelB has GTPase function and possess a higher affinity for the GTP than GDP. The macromolecular complex in RNAs presence was also evaluated and we can distinguish in two different groups: a complex that present thermal stabilization ( $\Delta T_m > 0$ ) or thermal destabilization ( $\Delta T_m < 0$ ). The first group, which contains GTP; tRNA<sup>Sec</sup>; SECIS element and its complexes, also the T $\Psi$ C and Anticodon arms, were the samples that the complex is more stable than SelB<sub>apo</sub> sample indicating the stable complex and specific interaction when associated with the previous results showed by other methods. Also, the others complexes, e.g. variable arm mutants; D-loop and acceptor arms also the negative control tRNA<sup>Ala</sup>, showed a negative displacement of the  $T_m$  value, indicating non-stable complexes, agreeing with our previous binding data.

The kinetic assays and evaluation of secondary structure changes reveal the GTP stability during complexes formation, even in the ribosome presence. On the other hand, the secondary structure components of SelB changes during SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> complex formation, which is concordant with structures previous solved [9, 14, 19] and indicates an important structure displacement to tRNA<sup>Sec</sup> recognition and consequently produce a good shape and conformation to SECIS interaction.

Furthermore, the interactions points in SelB mapped by H/DEx confirms the WHD2, WHD3 and WHD4 specificity domains to RNAs interactions. The sequence of WHD2 (T184-L300) and the initial portion of WHD3 (T429-L450) are responsible to interact with the acceptor

and T $\psi$ C arms. Moreover, the WHD3 final sequence (P451-L480), responsible for variable arm recognition, is occluded during SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> complex formation, contributing to our interaction model based on variable arm specificity. The SECIS element, as previously expected, interacts at WHD4 domain, resulting in a decrease in deuterium incorporation on this portion. These interaction models also contributed with low-resolution models obtained by SAXS analysis, where the  $D_{\max}$  and interaction points (variable arm in tRNA<sup>Sec</sup> and WHD3 and WHD4 in SelB) helps to validate and understand this macromolecular complex in solution and show the specificity of tRNA as a recognition element in this specific biochemical pathway.

### ***Materials and Methods***

#### ***New expression and purification protocol of SelB full-length protein***

The vector containing the gene *selB*, referred to as pT7-6-SelBH6 (4523 pb) [21], was kindly provided by Prof. Dr. Marina Rodnina (Department of Physical Biochemistry - Max Planck Institute for Biophysical Chemistry – Göttingen - Germany) and transformed into *E. coli* BL-21 ( $\lambda$ -DE3). The cells were grown in agitation at 37 °C, 150 rpm during 6 h in Luria Broth (LB) medium containing ampicillin (25  $\mu$ g/mL) until the optical density D.O.<sub>600nm</sub> 1.0. Then, were induced by addition of 0.5 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 h under the same conditions and were centrifuged at 4,500 rpm for 45 min at 4 °C. The pellet was suspended in buffer A (200 mM boric acid pH 7.0, 10 mM magnesium chloride) as previously established by Thanbichler & Böck [22] and then submitted to centrifugation at 13,000 rpm for 45 min at 4 °C to wash the cell and to retrieve medium contaminations.

The pellet was suspended in buffer B (200 mM boric acid pH 7.0, 10 mM magnesium chloride, 1 M sodium chloride, 200  $\mu$ g/ $\mu$ L phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM 2-mercaptoethanol) in the proportion of 1 mL per gram of dry cells. The cell lysis was performed by lysozyme (50  $\mu$ g/mL) addition during 30 min on ice and, subsequently, disrupted by sonication pulses followed by centrifugation at 13,500 rpm for 30 min at 4 °C.

The brute extract was filtered using 0.22  $\mu$ m cellulose filter and submitted to affinity chromatography using cobalt resin (Talon), which was previously equilibrated with buffer B. The sample was washed in buffer C (200 mM boric acid pH 7.0, 10 mM magnesium chloride, 1 M sodium chloride, 200  $\mu$ g/ $\mu$ L PMSF, 1 mM 2 mercaptoethanol with 10 mM imidazole) and then was eluted with of buffer D (200 mM boric acid pH 7.0, 10 mM magnesium chloride, 1 M sodium chloride, 200  $\mu$ g/ $\mu$ L PMSF, 1 mM 2-mercaptoethanol with 100 mM

imidazole) as previous established [22].

As additional step was introduced on the purification protocol, a treatment to endogenous RNAs degradation that may eventually be co-purified. The RNase A (Life Technologies) was added in a proportion of 10 µg/mL per milliliter of eluted protein and incubation at 4 °C for 12 h. Then, SelB sample was dialyzed in buffer E (100 mM potassium phosphate pH 7.0, 5 mM magnesium sulfate, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 150 mM sodium chloride), to submitted to size-exclusion chromatography (SEC) using a Superdex 75 (10/30) column (GE) coupled to AKTA system(GE).

All the steps were confirmed by electrophoresis analysis in a polyacrylamide gel (SDS-PAGE 15%) resulting in a specific band. The band was extracted from the SDS gel and treated with acetonitrile (ACN) 50% in 100 mM ammonium bicarbonate and after dehydrated with ACN 100%. Then, 1 µg of trypsin (Sigma) was added in 50 mM ammonium bicarbonate, leaving to dry at 37 °C for 16 h. Thereafter, formic acid 5% was added to the dried sample and incubated for 10 min at room temperature. The sample was centrifuged for 10 min at 10,000 g and the supernatant was transferred to another tube with the addition of formic acid 5% in ACN 50%, once again centrifuged for 10 min at 10,000 g. Finally, the sample was transferred again to another tube, allowed to dry at 37 °C until the volume of 50 µL and injected into the mass spectrometer. A microTOF QII (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker Company, USA) was employed for the analysis of sample protein and data was processed by Biotoools 3.2 (Bruker) software.

#### ***Western Blotting confirmation of EcSelB purification***

Samples from size-exclusion chromatography were subjected to SDS-PAGE 15% gel and posteriorly to electrotransfer to nitrocellulose membrane was performed using a Trans-Blot Transfer System Turbo (Bio-Rad) for 30 min, 20 V, 2.5 A. Subsequently, the membrane was stained with 1% Ponceau for 2 min and destained with distilled water. After bleaching the membrane, the sample was held in lock-step using Phosphate Buffered Saline with Tween (PBST) + 5% dried milk at room temperature under stirring for 1 h. Then, the membrane was incubated with the primary antibody (Sigma) against the His-TAG, (1:3000 mouse monoclonal) in PBST with 1% dried milk for 2 h. The membrane was washed with PSBT and then incubated with secondary antibody (Sigma, anti-mouse IgG peroxidase conjugated in a titration of 1:5000) in PBST for 1 h 30 min. The complex protein-antibody conjugated to peroxidase was treated with a chemoluminescence solution containing 0.3 % of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 min. and visualized with the Image Studio Digits (Li-COR, Biosciences).

### ***Determination of the presence of endogenous RNAs in SelB sample***

Detection of endogenous co-purified RNAs from the purification process of SelB sample was analyzed by Qubit fluorometer (Invitrogen) using the Quant-iT RNA assay [16]. For this analysis, Qubit reagents kit was prepared with working solution by diluting in Qubit buffer. Tubes were vortexed and incubated at room temperature prior to measurements [26].

### ***Determination of nucleotides-free samples and GTP kinetics assays by High-Performance Liquid Chromatography***

Since SelB is a GTPase enzyme like all elongation factors, it is expected the presence of the endogenous nucleotides in the final purification product. Thus, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was required as a sensitive technique to detect the presence of endogenous nucleotides as followed previous GTPase assays established [27]. In these experiments, an HPLC - Waters 2695/2487 was operated using ion exchange column Protein Pack DEAE 5 PW, 7.5 mm x 7.5 cm (Waters) and the nucleotides absorbance at 253 nm was monitored. To proceed with these analyses, 20  $\mu$ M of SelB was conducted in addition of cold 1.5 M HClO<sub>4</sub> and incubated for 10 min at 4 °C. Denatured proteins were precipitated by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4 °C. Then, 100  $\mu$ L KOH [3 M], 80  $\mu$ L acetic acid [5 M], and 100  $\mu$ L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [1M] were added in 600  $\mu$ L of supernatant collected and stored overnight at -20 °C [31]. Before injecting into the HPLC, samples were quickly thawed and centrifuged at 13,500 rpm for 1 h at 4 °C.

The reaction was monitored for 60 min at 25 °C after the addition of 100  $\mu$ M GTP and 200  $\mu$ L fractions were collected at the following times: 0, 5, 10, 15, 30, 45, and 60 min. After the fractions were frozen in liquid nitrogen, those collected samples were thawed in a thermal bath at 65 °C (temperature above the SelB  $T_m$ ) to denaturation and inhibition of the reaction and, posteriorly, were injected. The same protocol was repeated subsequently, with the difference that the monitoring was done at 37 °C, thus covering a condition in which hydrolysis is being performed.

The column was previously equilibrated with 90% HPLC-buffer A (100 mM potassium phosphate pH 7.0) and 10% HPLC-buffer B (100 mM potassium phosphate pH 7.0 and 1 M sodium chloride).

For each condition, 200  $\mu$ L of samples were subjected to ion exchange chromatography with a 1 mL/min flow with a perceptual variation of HPLC-buffer A and HPLC-buffer B linearly for 10 min and further increased HPLC-buffer B up to 100% up to 12 min total. Finally, returning

to initial conditions gradient to proceed with the next injection.

We also analyzed the GTP-GDP kinetics in presence of tRNA<sup>Sec</sup>; SECIS and Ribosome. SelB in presence of 100  $\mu$ M GTP was previously incubated at the same times analyzed (0, 5, 10, 15, 30, 45, and 60 min) with 20  $\mu$ M tRNA<sup>Sec</sup>. The same procedure was employed to prepare the sample to inject in HPLC. The other complexes (SelB.GDP; SelB.GTP.SECIS; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.Ribosome) also were prepared at the same experimental conditions and the chromatograms were analyzed using Origin 8.5 (OriginLab) software.

### ***Obtaining specific RNAs***

In order to elucidate which regions of tRNA<sup>Sec</sup> are determinant for the interaction with SelB protein, several mutant tRNAs have been synthesized and subjected to Fluorescence Anisotropy Spectroscopy (FAS) assays. The *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> and its mutants were amplified by PCR, *in vitro* transcribed and, subsequently, labeled with fluorescein maleimide as prescribed [23, 28]. The oligonucleotides of mutants from tRNA<sup>Sec</sup> were designed with specific replacements corresponding to similar regions present in amino acid serine tRNA (tRNA<sup>Ser</sup>) from *E. coli* as described by Silva and collaborators [28]. The regions of tRNA<sup>Sec</sup> that acquired a replacement for the similar nucleotides present in tRNA<sup>Ser</sup> are acceptor arm, anticodon arm, D-loop arm, variable arm and T $\psi$ C arm [28].

In addition, the tRNA<sup>ala</sup> amplified using these oligonucleotides: ***ala-Forward*** 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGATGTAGCTCAGATGGTAGAGCGCCCGCTTAGCATGCG3' and ***ala-Reverse*** 5'-TTGTGGAGAAGTTGGGTATCGATCCCAATACCTCCCGCATGCTAAGCGGGCGCTC-3' was used as negative control of the specific interaction. The same procedure was used to obtain the *E. coli* SECIS element from ***secis-Forward*** 5'-GCTAATACGACTCACTATAGGGAGCAGCAGGAUGAGGGC3' and ***secis-Reverse*** 5'-CTTGCGGTGCAGACCTGCAACCGCCCTCATCCTGCTGC-primers.

### ***Characterization of secondary folding of tRNAs and SECIS by circular dichroism***

For Circular Dichroism (CD) measurements was used J-715 spectropolarimeter (JASCO Corporation, Japan). The thermal variation assays were applied to RNAs samples in order keep up with changes in secondary structure [29]. For these experiments, 20  $\mu$ M of RNA were employed in RNase-free water with the addition of 20 mM MgCl<sub>2</sub> and registered the change of ellipticity. The setup for CD assays consists in the wavelength range of 210-320 nm with an

average of 8 scans with a resolution of 1 nm acquired at 50 nm/min with temperature range from 10 °C to 90 °C at a rate of 1 °C/min. The minimum at 222 nm and maximum at 268 nm from CD data were monitored in order to evaluate the state of folding as a function of increasing temperature. Since the unfolding process is a reversible process for tRNAs, the data set from CD analysis was processed through the fitting given by the Boltzmann function to obtain the Melting temperature ( $T_m$ ) using the Origin 8.5 program with the appropriate contributions of buffer was subtracted [29-30].

### ***Expression and Purification of SelA***

The SelA expression and purification protocol used in this study were previously established by Manzine *et al.* [26]. The *selA* gene was constructed in pET29a (+) vector and transformed into in *E. coli* WL81640 ( $\lambda$ -DE3). Briefly, cells were grown for 3 h until D.O<sub>600nm</sub> 1.0 and induced with 0.1 mM IPTG. After cell lysis by ultrasound, the protein extract was purified using 25% ammonium sulfate precipitation followed by size exclusion chromatography in buffer 20 mM potassium phosphate (pH 7.5), 100 mM sodium chloride, 5% glycerol, 2 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 10  $\mu$ M PLP. The sample purification was confirmed by SDS-PAGE 15%.

### ***Tryptophan fluorescence quenching during SelB.tRNA interaction***

Intrinsic Fluorescence Spectroscopy (IFS) experiments were performed with 1 mg/mL of SelB sample using ISS-PC spectrofluorimeter (ISS, Champaign, IL, USA). Experiments were carried out at 25 °C using 295 nm as excitation wavelength and a 295-nm filter at the detector was used to avoid interference from scattered photons. The emission band was monitored in the range of 305-510 nm using quartz cuvette of 1-cm optical path. The maximum emission was observed for SelB protein in function of titrating of specific tRNA<sup>Sec</sup> at a concentration rate of 10-2000 nM in order to analyze the occlusion of tryptophan residues in the catalytic sites where the protein-RNA interaction occurs [31]. The data set was processed using the Origin 8.5 (OriginLab) software from the emission spectra and  $K_a$  values were calculated by Stern-Volmer model as demonstrated by Eq. (1)

$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{f_a k_a c} + \frac{1}{f_a} \quad (1)$$

where  $I_0$  are the intensities from quenching of tryptophan residues and  $\Delta I$  is its relative difference ( $\Delta I = I - I_0$ ),  $f_a$  corresponds to the fraction that is accessible for tryptophan,  $c$  is the concentration of quencher and  $K_a$  is the association constant.



### ***Binding assays by Fluorescence Anisotropy Spectroscopy (FAS)***

For fluorescence anisotropy interaction assays, tRNA<sup>Sec</sup> from *E. coli* and its mutants as well as SECIS element were labeled with fluorescein maleimide using 5' EndTag™ Nucleic Acid Labeling System kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) [23, 28]. Since the fluorophore is covalently attached to the 5' extremity of nucleotide, folding was reclaimed through of heating to 80 °C and slowly cooled to 35 °C with the addition of MgCl<sub>2</sub> [20 mM] [28].

The FAS measurements were performed in ISS-PC spectrofluorometer (ISS, Champaign, IL) in "L" geometry with single channel monitoring the emission at 515 nm. For anisotropy measurements, the RNAs labeled with diacetate fluorescein 5' maleimide was used as a marker that has an absorption maximum at 420 nm and emission in the 520-530 nm range. The experiment was conducted using 49 nM unlabeled tRNA and 1 nM fluorescein labeled-tRNA incubated in a quartz cuvette of 1 cm path at 25 °C for 10 minutes with 100 mM GTP. Subsequently, increasing concentrations of SelB were titrated with intensity and anisotropy measurements collected obtaining an average value of 5 interactions varying the positions of the input polarizer and output to the optical system. All the titrations were homogenized and equilibrated for 10 min at 25 °C prior to anisotropy measurements respecting the maximum limit of 20% dilution. The results were processed by Origin 8.5 software and fitting with the Hill equation in order to obtain the apparent dissociation constant ( $K_d$ ) and the Hill constant ( $n$ ) [32] according to Eq. (2)

$$r = r_0 + (r_f - r_0) \times \frac{([SelB])^n}{(K_d)^n + ([SelB])^n} \quad (2)$$

where,  $r$  is the anisotropy value ( $r_0$  and  $r_f$  correspond to start and end values, respectively) and  $[SelB]$  is the concentration of SelB titrated.

Furthermore, analysis of SelB interaction with binary complex SelA-tRNA<sup>Sec</sup> was performed similarly where a sample of 50 nM SelA previous incubated at 25 °C with 50 nM tRNA<sup>Sec</sup> containing 1 nM fluorescein labeled-tRNA as protocol previously described [23,28].

The FAS experiments were also performed with the SelB titration in SECIS-fluorescein labeled [1 nM] in presence of SECIS element [49 nM] and GTP [1 mM] saturating system. The same procedure was applied in order to monitor the possible interaction and formation of a SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS quaternary complex using SelB.GTP.SECIS ternary complex previous incubated at 25 °C. In addition, the interaction with ribosome was performed by

increase concentration of *E. coli* ribosome complex (NEB) prepared in buffer E (100 mM potassium phosphate pH 7.0, 5 mM magnesium sulfate, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 150 mM sodium chloride), properly standardized and characterized by transmission electron microscopy using negatively stained sample preparation, showing the formation of a macromolecular complex SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS.ribosome using different titration ordering, using SECIS or tRNA<sup>Sec</sup>-fluorescein labeled. All average values and standard deviations were calculated by experimental performed in biological triplicates using GTP excess.

### ***Isothermal Titration Calorimetry to binding enthalpy determination***

To determine the apparent molar enthalpy ( $\Delta H_{app}$ ) of the RNAs element with SelB, isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were employed and the titration experiments were carried out with a VP-ITC calorimeter [33].

The  $\Delta H_{app}$  determination experiments were performed by single injection of 20  $\mu$ L of GTP [1 mM] and each RNA sample (tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element at 268.8  $\mu$ M and 148  $\mu$ M, respectively) were injected and monitored the heat exchange for 1200 seconds. After the heat dilution subtracts, the apparent molar enthalpy ( $\Delta H_{app}$ ) was obtained using the dialysis buffer at 25 °C and a stirring speed of 300 rpm. The results were processed using Origin 7.0 software, which was included with the microcalorimeter, and the integral of the curve obtained reflects the heat variation in the system.

### ***Qualitative electrophoretic mobility shift assays at native conditions.***

To corroborate with the SelB interacting with tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element were performed a qualitative electrophoretic mobility shift assay at native conditions. The 2% agarose gel RNA-free was stained with 10% SyBr Safe (Thermofisher) and the RNAs fluorescein-labeled samples at 1  $\mu$ M and the SelB.GTP was titrated in stoichiometric ratios (1:0.5; 1:1 and 1:2), when was applied 80 V, 400 mA during 120 minutes at 4 °C. The results were observed using Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ Gel documentation system (BioRad) using 470 nm.

### ***Analysis of the tRNA<sup>Sec</sup> mutant's complexes formation by analytical ultracentrifugation***

To analyze the stoichiometry of interaction and to check the dissociation constants values obtained by fluorescence technique was used analytical ultracentrifugation. The analytical ultracentrifugation (AUC) experiments were performed in Beckman Coulter Proteome Lab XL-I (Beckman Coulter) with a Proteome Lab XL-I (220-240 VAC, 50 Hz) rotor in the

Spectroscopy and Calorimetry Laboratory (LEC) of The Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM). For AUC analyses were selected 5 different tRNAs with most relevant contributions to the SelB interaction: acceptor, D-loop, T $\psi$ C, variable arms and tRNA<sup>Ala</sup> as a negative control. SelB<sub>apo</sub> and the SelB-tRNAs complexes were tested at a concentration of 9.8  $\mu$ M and 3.5  $\mu$ M, respectively. The sedimentation velocity experiments were performed at 40,000 rpm at 25 °C. The monitoring of sedimentation has conducted a total of 1,000 scans being taken during 26 h at a wavelength of 280 nm with buffer E as a reference. The theoretical values for the constants related to the density and viscosity from experimental buffer were calculated by Sednterp program [34]. For interpretation of radial absorption, the resulting curves were fitting by SEDFIT program [35] using the Lamm equation with a continuous distribution  $c(S)$  model.

The sedimentation equilibrium measures were carried out in steps of 8,000 rpm; 12,000 rpm; 15,000 rpm and 18,000 rpm, with all stages kept in rotation for 12 hours to ensure the equilibrium, also at 25 °C monitoring in 280 nm. The mutants of tRNA<sup>Sec</sup> were held constant at 23 ng/L and varying amounts of SelB were added to give the final molar ratio of 0.5:1, 1:1 and 2:1 of protein:tRNA, respectively. For the treatment of equilibrium experiment data set the SEDPHAT software was employed using the model  $A + B = AB$ , quantified the effects of the presence of RNA for interaction with the protein.

### ***Thermal stability analysis by Circular Dichroism (CD) and Differential Scanning Calorimetry (DSC)***

In order to evaluate the thermal stability of the SelB complexes, Circular Dichroism (CD) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) measurements were performed. To CD assays were used J-715 spectropolarimeter (JASCO Corporation, Japan). The thermal variation assays were applied to SelB nucleotides (GTP and GDP) samples. 7  $\mu$ M of SelB in complex with GTP or GDP (1 mM) were monitored using CD in the wavelength range of 195-320 nm with an average of 8 scans with a resolution of 1 nm acquired at 50 nm/min with temperature range from 10 °C to 90 °C at a rate of 1 °C/min. After buffer subtracts, the minimum at 222 nm from CD data was monitored and fitted by Boltzmann function to determine the melting temperature ( $T_m$ ) using the Origin 8.5 program [36].

Besides that, the Differential Scanning Calorimetry (DSC) was also employed to characterize the stability of SelB and its complexes with nucleotides (GTP and GDP) and, furthermore, the RNAs through the determination of the unfolding transition temperature,  $T_m$ , and the associated unfolding enthalpies. Experiments were carried out on a VP-DSC MicroCal

MicroCalorimeter (Microcal, Northampton, MA, USA) with a heating rate of 63.4 °C/h in a temperature range from 10 °C to 65 °C and at a constant pressure of 1 atm. Instrumental buffer E baselines were recorded prior to the protein unfolding experiments to register the thermal history of the calorimeter. DSC thermograms of SelB protein and SelB complexed with RNAs samples were recorded only during the first heating scan after 15 min of sample equilibration at the starting temperature, since protein aggregates after unfolding. The concentration of SelB was 7 μM, the concentration of GTP, GDP, tRNA<sup>Sec</sup> and others mutants tRNAs was 14 μM, and SECIS concentration was 12 μM. After instrumental buffer subtraction and baseline correction, the resulting thermograms were normalized to the protein molar concentration and deconvoluted using Microcal Origin DSC software. Independent analysis of the resulting molar heat capacity profiles was performed using a statistical mechanical two-state model with DSCFit [37]. It is worth mentioning that since SelB and its complexes undergo irreversible denaturation during heating, the derived parameters cannot be considered as true thermodynamic constants.

#### **Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectroscopy**

In solution protein samples infrared spectra were collected using Spectrum Two IR spectrometer with DTGS detector by 10 accumulations at 25 °C during 300 seconds using Perkin Elmer Spectrum software (Perkin Elmer). This data have 2 cm<sup>-1</sup> of resolution and a wavenumber range of 4000-400 cm<sup>-1</sup>. The buffer spectrum was subtracted from the samples datasets. The samples SelB.GTP; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS were used at 10 μM SelB; 12 μM to RNAs and 100 μM GTP. The second derivative was used to identify the peak positions of the amide I band on the protein vibrational spectra average. The secondary structure percentage was obtained by Gaussian fitting performed in 1700-1600 cm<sup>-1</sup> range [28]. The difference infrared spectra were used to monitor the difference between SelB bound and unbound states with RNAs during complexes formation, subtracting the complex spectra from isolated SelB.GTP [28, 38].

#### **Molecular Modeling of *E.coli* SelB**

The structural model of *E. coli* SelB was obtained using I-TASSER webserver [39], where was applied multiple threading and homology modeling rounds using the *A. aeolicus* crystallographic structure as a template (PDB.ID 4ZU9, 9). The SelB interacting with tRNA<sup>Sec</sup> model was obtained by rigid body superposition using the crystallographic tRNA<sup>Sec</sup> structure (PDB. ID 3A3A) and the SelB interacting with both RNAs (SECIS element

addition) was obtained using structural alignment with the C-terminal domain in complex with SECIS element (PDB.ID 2PJP). These models were used to display the Hydrogen-Deuterium incorporation regions (H/DEX) and to fit the molecular envelope obtained by Small-Angle X-ray Scattering (SAXS).

### ***Hydrogen-Deuterium Exchange analyzed by Mass Spectrometry (H/DEX)***

The Hydrogen-Deuterium Exchange coupled with Mass Spectrometry was applied to map the surface of SelB when interacting with GTP; tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element. The samples were prepared as followed the protocol previous established [28]. The samples were labeled by the dilution in 75% D<sub>2</sub>O solution using 2 different incubation times (5 and 30 minutes). The SelB sample [0.18 mg/mL] was diluted in 20 mM potassium phosphate pH 2.0 formic acid added and sequentially incubated with 0.038 mg/mL pepsin (Sigma-Aldrich) for 10 minutes at room temperature. Then, the sample was applied by direct injection (240  $\mu$ L/h) in a Mass Spectrometer (Bruker). The SelB.GTP; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS complexes were prepared using 1 mM GTP and 10  $\mu$ M of both RNAs (tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element). The same procedure was applied and the spectrum was analyzed using DataAnalysis 4.3 software (Bruker) by peak comparison and identified the peak mass displacement comparing the theoretical mass determined by PeptideCutter webserver [40]. The results were plotted on molecular model previous obtained by molecular modeling using Pymol version 1.3 software (Schrodinger, LLC).

### ***In solution model using Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)***

Small Angle X-Ray Scattering analysis: SAXS data were collected in SAXS1 beamline at National Synchrotron Laboratory (LNLS/CNPEM - Campinas, Brazil), using  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$  and detector distance of 1033 mm with bi-dimensional MarCCD detector (MarResearch, USA). The SAXS analyses of SelB were performed in three different conditions: SelB apo, SelB.tRNA<sup>Sec</sup> and SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS at final concentrations of 2.2 mg/mL and 1.0 mg/mL of protein and equimolar concentration of RNAs, it all in buffer E at 25 °C. The proteins samples and buffer were exposed in frames of 30 seconds and the parasitic scattering was subtracted from samples scatterings and the data treatment was performed through the ATSAS program package [41]. The radii of gyration (R<sub>g</sub>) and the distance distribution function p(r) were obtained by GNOM [41]. Furthermore, theoretical molecular weight was calculated by SAXSMoW webserver [42]. From the scattering curves were generated low-resolutions envelope models *ab initio* through DAMMIF [41]. SUPCOMB program was used to perform

the superposition of these ab initio models with high-resolution structures models obtained by x-ray crystallography [41]. Lastly, CRY SOL program was used to generate the theoretical SAXS curves to compare with the experimental results. The SAXS envelopes figures from SelB and complexes were generated in the PyMOL version 1.3 (Schrodinger, LLC).

### ***Acknowledgments***

We would like to thank Professor Marina Rodnina (Max Planck Institute) for kindly provide the plasmid containing the *selbH6-pT7* vector that made possible the realization of this study. This work was supported by the research grants from FAPESP (1998/14138-2; 2013/17791-0; VHBS - 2012/23730-1; LGMB – 2014/00206-0; JFS – 2012/15777-8 and 2014/16005-4); CNPq (550514/2011-2; AFF – 134013/2015-8; VHBS - 232251/2014-2 and 140636/2013-7) and CAPES. We also acknowledge Dr. Fernanda A. H. Baptista and Dr. Ana Carolina M. Figueira from National Laboratory of Biosciences (LNBio/CNPq) for the AUC measures; Prof. Dr. Júlio César Borges from Sao Carlos Chemistry Institute (IQSC/USP) for AUC data analysis and ITC experiments, Prof. Dr. Mário de Oliveira Neto from Sao Paulo State University (UNESP) and the National Laboratory of Synchrotron Radiation (LNLS/CNPq) for SAXS measures and analysis, and Ana Laura Lima (LBEst) for art design.

### References:

- [1] Lu, J. & Holmgren, A. (2009). Selenoproteins; *The Journal of Biological Chemistry* 284, 723-727.
- [2] Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. & Khanna, K. K. (2007). From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling*. 9, 775-806.
- [3] Yoshizawa, S. & Böck, A. (2009). The many levels of control on bacterial selenoprotein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790, 1404–1414.
- [4] Forchhammer, K. & Bock, A. (1991). Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci*. 16, 463-467.
- [5] Moras, D. (1992). Aminoacyl-tRNA synthetases. *Current Opinion in Structural Biology*. 2, 138–142.
- [6] Itoh, Y., Brocker, M. J., Sekine, S., Hammond, G., Suetsugu, S., Soll, D. & Yokoyama, S. (2013). Decameric SelA•tRNA<sup>Sec</sup> Ring Structure Reveals Mechanism of Bacterial Selenocysteine Formation. *Science*. 340, 75-78.
- [7] Forchhammer, K. & Böck, A. (1991). Selenocysteine Synthase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 266, 6324-6328.
- [8] Hilgenfeld, R., Böck, A. & Wilting, R. (1996). Structural model for the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Biochimie*. 78: 971–978.
- [9] Itoh, Y., Sekine, S. & Yokoyama, S. (2015). Crystal structure of the full-length bacterial selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Nucleic Acids Res*. 43, 9028-38.
- [10] Leibundgut, M., Frick, C., Thanbichler, M., Böck, A. & Ban, N. (2005). Selenocysteine tRNA-specific elongation factor SelB is a structural chimaera of elongation and initiation factors. *The EMBO Journal*. 24, 11-22.
- [11] Paleskava, A., Konevega, A. L., Rodnina, M. V. (2012). Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB. *J Biol Chem*. 287, 27906-12.
- [12] Yuan, J., Hohn, M. J., Sherrer, R. L., Palioura, S., Su, D., & Söll, D. (2010). A tRNA-dependent cysteine biosynthesis enzyme recognizes the selenocysteine-specific tRNA in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 584, 2857–2861.
- [13] Klug, S. J., Hüttenhofer, A., Kromayer, M., & Famulok M. (1997). *In vitro* and *in vivo* characterization of novel mRNA motifs that bind special elongation factor SelB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94, 6676–6681.
- [14] Fischer, N., Neumann, P., Bock, L. V., Maracci, C., Wang, Z., Paleskava, A., Konevega, A. L., Schröder, G. F., Grubmüller, H., Ficner, R., Rodnina, M. V. & Stark, H. (2016). The pathway to GTPase activation of elongation factor SelB on the ribosome. *Nature*.
- [15] Clementi, N. & Polacek, N. (2010). Ribosome-associated GTPases: the role of RNA for GTPase activation. *RNA Biology*. 7, 521-527.
- [16] Baron, C. & Böck, A. (1991). The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA(Sec) of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. *The Journal of Biological Chemistry*. 266, 20375-20379.
- [17] Ose, T., Soler, N., Rasubala, L., Kuroki, K., Kohda, D., Fourmy, D., Yoshizawa, S. & Maenaka, K. (2007). Structural basis for dynamic interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Structure*. 5, 577-586.
- [18] Squires, J. E. & Berry, M. J. (2008). Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. *IUBMB Life*. 60, 232-235.
- [19] Dobosz-Bartoszek, M., Pinkerton, M. H., Otwinowski, Z., Chakravarthy, S., Söll, D., Copeland, P. R. & Simonović, M. (2016). Crystal structures of the human elongation factor eEFSec suggest a non-canonical mechanism for selenocysteine incorporation. *Nat. Commun*.

7, 12941.

- [20] Zinoni, F., Heider, J. & Bock, A. (1990) Features of the formate dehydrogenase mRNA necessary for decoding of the UGA codon as selenocysteine. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4660–4664.
- [21] Mukai, T., Englert, M., Tripp, H. J., Miller, C., Ivanova, N. N., Rubin, E. M., Kyrpides, N. C. & Söll, D. (2016). Facile recoding of selenocysteine in nature. *Angew Chem Int Ed Engl.* 55, 5337-41.
- [22] Thanbichler, M. & Böck, A. (2003). Purification and characterization of hexahistidine-tagged elongation factor SelB. *Protein Expression and Purification* 31, 265–270.
- [23] Manzine, L. R., Serrão, V. H. B., Lima, L. M. T. R., Souza, M. M., Bettini, J., Portugal, R. V., van Heel, M. & Thiemann, O. H. (2013). Assembly stoichiometry of bacterial selenocysteine synthase and SelC (tRNA<sup>Sec</sup>). *FEBS Lett.* 587, 906-11.
- [24] Paleskava, A. L., Konevega, A. L. & Rodnina, M. V. (2010). Thermodynamic and kinetic framework of selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> recognition by elongation factor SelB. *J. Biol. Chem.* 285, 3014-20.
- [25] Soler, N., Fourmy, D. & Yoshizawa, S. (2007). Molecular switch in tandem winged-helix motifs of elongation factor SelB. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 51, 377-8.
- [26] Manzine, L. R., Cassago, A., da Silva, M. T. & Thiemann, O. H. (2013). An efficient protocol for the production of tRNA-free recombinant Selenocysteine Synthase (SELA) from *Escherichia coli* and its biophysical Characterization. *Protein Expr Purif.* 88, 80-4.
- [27] Serrão, V. H. B., Alessandro, F., Caldas, V. E. A., Marçal, R. L., Pereira, H. M., Thiemann, O. H. & Garratt, R. C. (2011). Promiscuous interactions of human septins: The GTP-binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. *FEBS Letter* 585, 3868-3873.
- [28] Silva, I. R., Serrão, V. H. B., Manzine, L. R., Faim, L. M., da Silva, M. T. A., Makki, R., Saidemberg, D. M., Cornélio, M. L., Palma, M. S. & Thiemann, O. H. (2015), Formation of a Ternary Complex for Selenocysteine Biosynthesis in Bacteria. *The Journal of Biological Chemistry.* 290, 29178–29188.
- [29] Moulton, V., Gardner, P. P., Pointon, R.F., Creamer, L. K., Jameson, G. B. & Penny, D. (2000). RNA folding argues against a hot-start origin of life. *J Mol Evol.* 2000 51, 416-21.
- [30] Wienken, C. J., Baaske, P., Duhr, S. & Braun, D. (2011). Thermophoretic melting curves quantify the conformation and stability of RNA and DNA. *Nucleic Acids Res.* 39, e52.
- [31] Robinson, K. E., Orans, J., Kovach, A. R., Link, T. M. & Brennan, R. G. (2014). Mapping Hfq-RNA interaction surfaces using tryptophan fluorescence quenching. *Nucleic Acids Research*, 42, 2736-49.
- [32] Lima, L. M. T. R. & Lima, J. (2004). Positive Contribution of Hydration on DNA Binding by E2c Protein from Papillomavirus. *The Journal of Biological Cchemistry* 279, 47968–47974.
- [33] Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal. Biochem.* 179, 131-7.
- [34] Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M. & Pelletier, S. L. (1992). Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science. Royal Society of Chemistry. 90-125.
- [35] Brown, P. H. & Schuck, P. (2006). Macromolecular size-and-shape distributions by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Biophysical Journal* 90, 4651-4661.
- [36] Freire, E. & Biltonen, R. L. (1978). "Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems." *Biopolymers* 17, 463-479.
- [37] Grek, S., Davis, J. & Blaber, M. (2001). An Efficient, Flexible-Model Program for the



Analysis of Differential Scanning Calorimetry Data. Protein and Peptide Letters 6, 429-436.

[38] Fabian, H., Mantsch, H. H. & Schultz, C. P. (1999) Two-dimensional IR correlation spectroscopy: Sequential events in the unfolding process of the I Cro-V55C repressor protein. PNAS. 96, 13153-58.

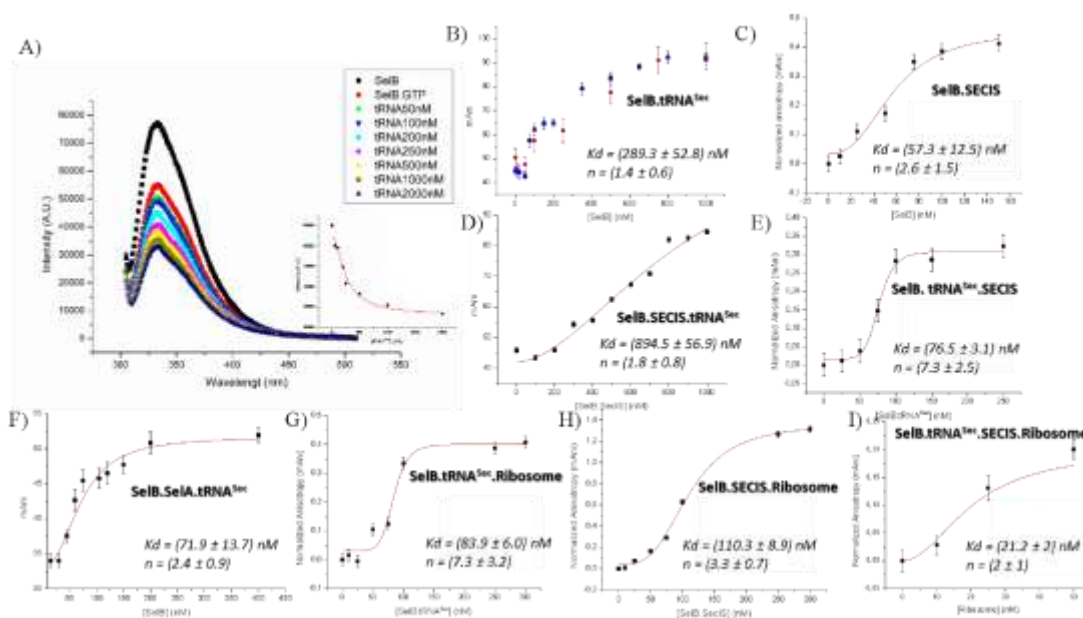
[39] Roy, A., Kucukural, A. & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. Nature Protocol. 5, 725-38.

[40] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. The Proteomics Protocols Handbook.

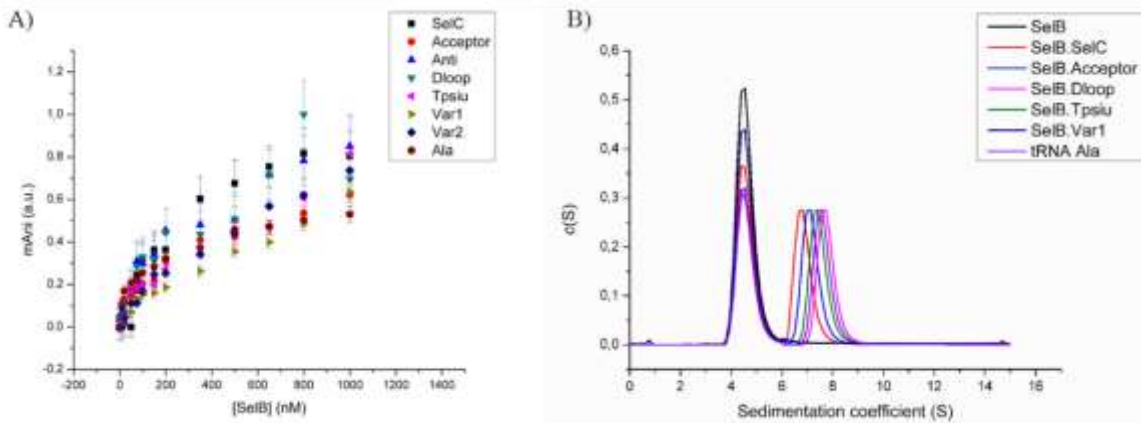
[41] Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V. & Svergun, D.I. (2012). New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. J. Appl. Cryst. 45, 342-350.

[42] Fischer, H., Neto, M. O., Napolitano, H. B., Craievich, A. F. & Polikarpov, I. (2010). The molecular weight of proteins in solution can be determined from a single SAXS measurement on a relative scale. J. Appl. Cryst. 43, 101-109.

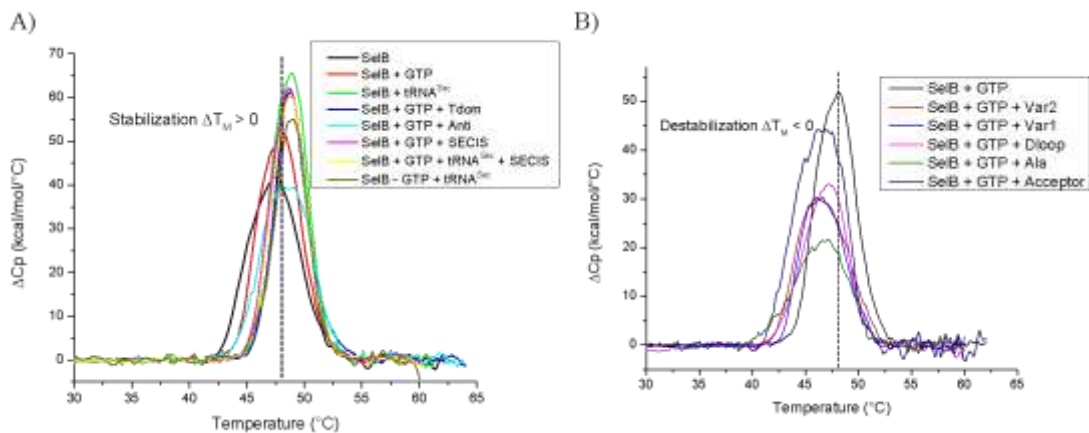
### Figure captions



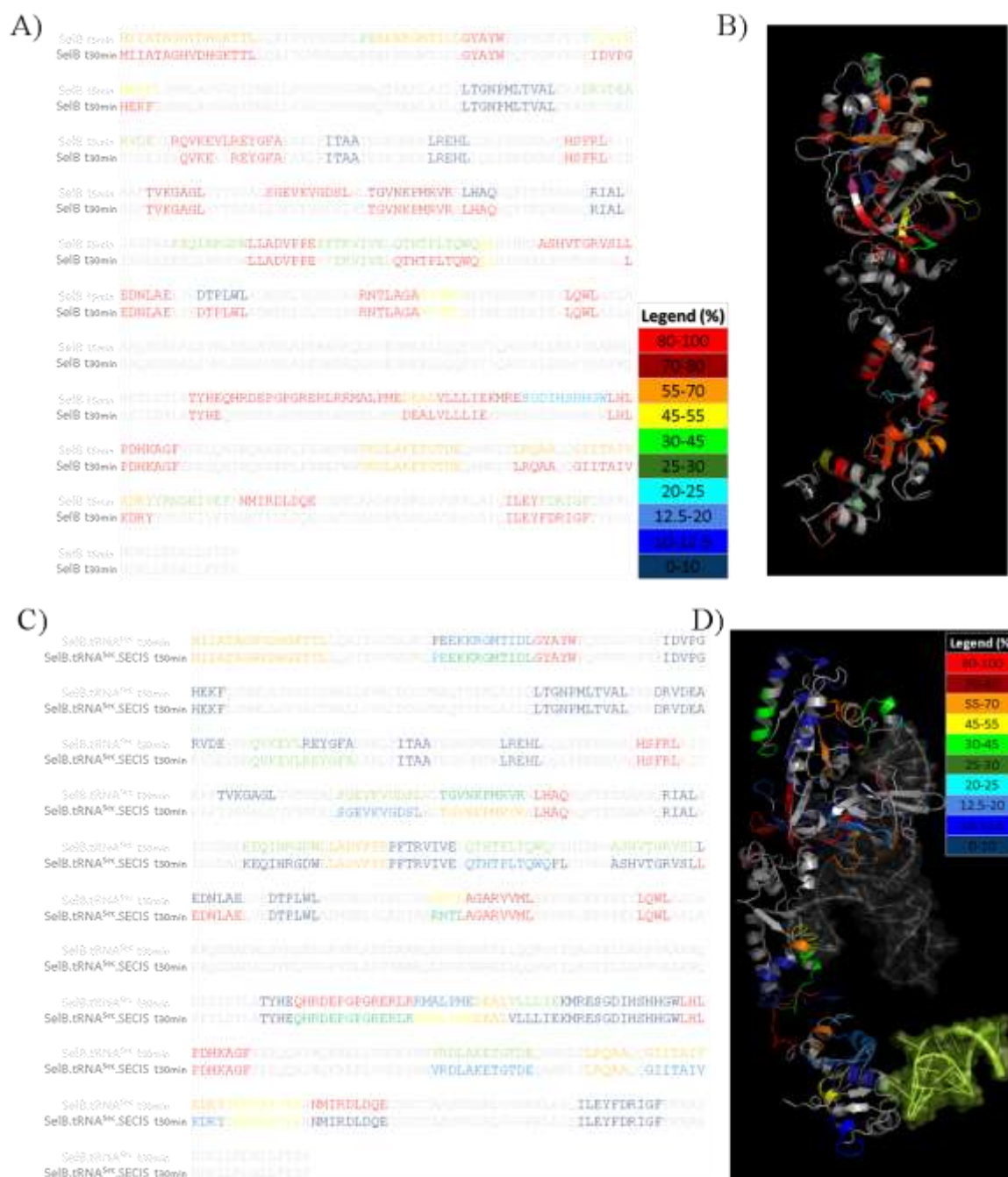
**Figure 1: Binding constants of SelB and its Sec pathway partners.** (A) Tryptophans quenching using tRNA<sup>Sec</sup> titration. Inset: Maximum intensity emission against tRNA<sup>Sec</sup> concentration. (B) Fluorescence anisotropy spectroscopy (FAS) using tRNA<sup>Sec</sup>-fluorescein labeled increasing SelB concentration (C) FAS assay using SECIS-fluorescein labeled increasing SelB concentration (D) SelB.SECIS complex titrated in tRNA<sup>Sec</sup>-labeled (E) SelB.tRNA<sup>Sec</sup> titrated in SECIS-labeled (F) SelB titrations in SelA-tRNA<sup>Sec</sup> binary complex previously bounded. (G) Ribosome titration in SelB.SECIS binary complex (SECIS-labeled) (H) Ribosome titration in SelB.tRNA<sup>Sec</sup> (tRNA<sup>Sec</sup>-labeled) (I) Ribosome titration in SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS ternary complex. All experiments were performed in biological triplicate and using GTP concentration of 1 mM.



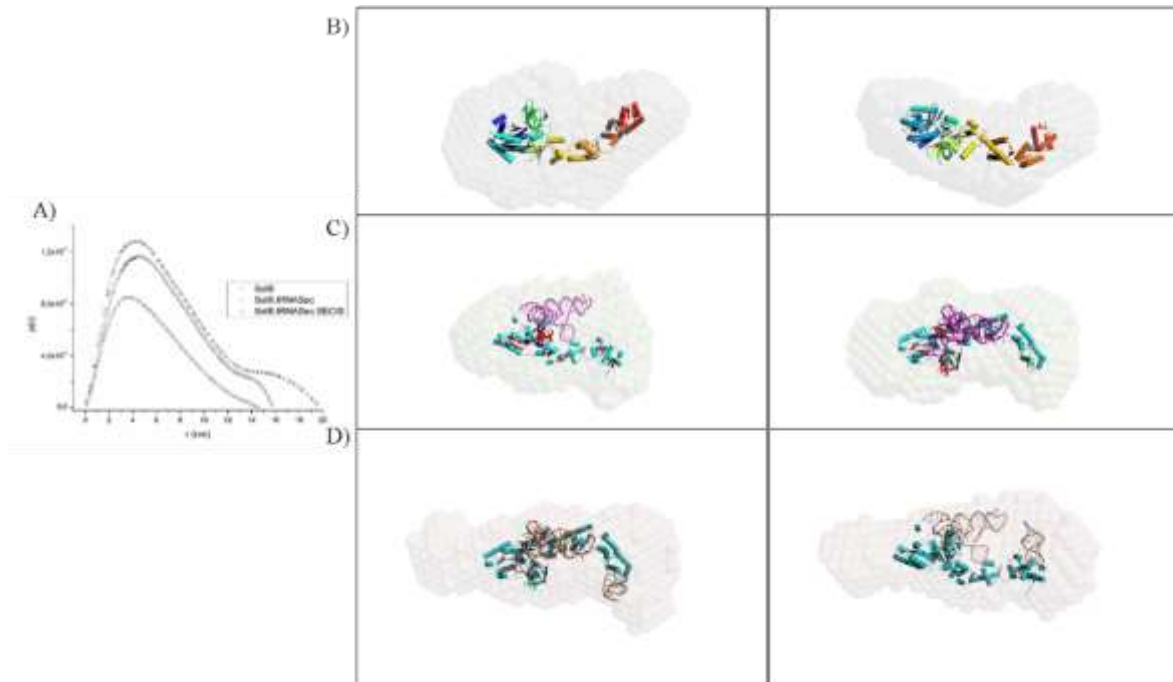
**Figure 2: Binding of tRNA<sup>Sec</sup> mutants and tRNA<sup>Ala</sup> by fluorescence anisotropy and analytical ultracentrifugation.** (A) Binding assays performed by fluorescence anisotropy spectroscopy (FAS) assays using tRNAs-fluorescein labeled with sequentially SelB titrations. (B) Ultracentrifugation analysis in sedimentation velocity.



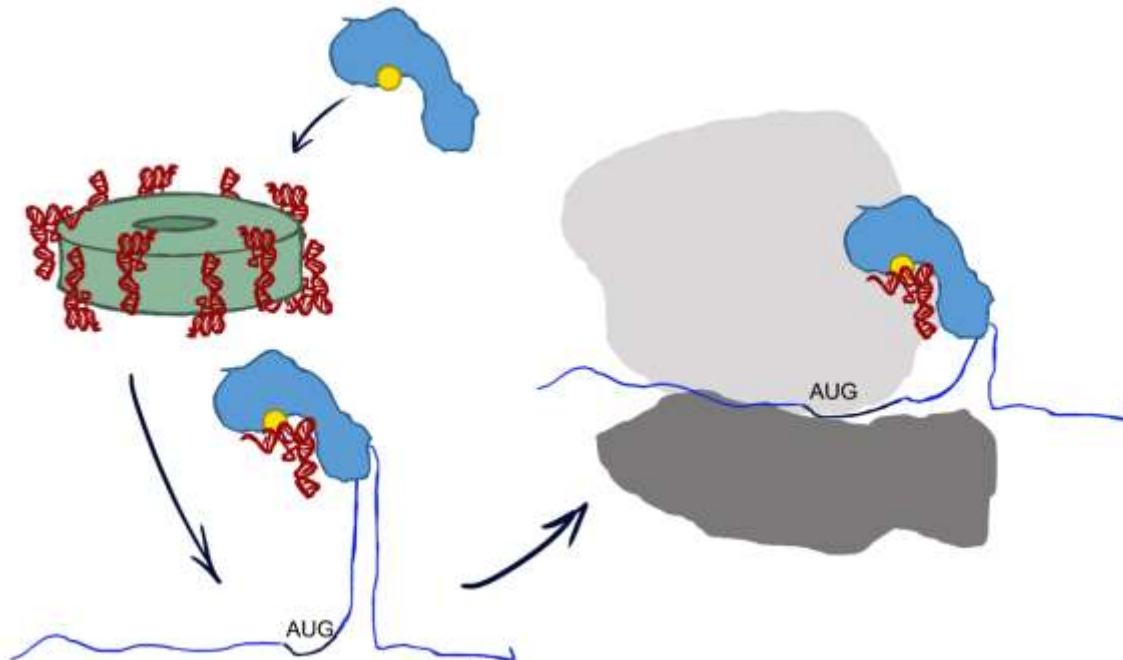
**Figure 3: Thermal stability of SelB in presence of Sec pathway partners and tRNA<sup>Sec</sup> mutants.** (A) Thermograms that show a positive displacement of  $T_m$  variation (GTP; tRNA<sup>Sec</sup>; Tdom; Anticodon; SECIS element; tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element) indicating a stabilization of SelB in complex with these molecules. (B) Thermograms that result in a negative displacement of  $T_m$  variation, such as, a destabilization of SelB (both variables mutants, Dloop, Acceptor and tRNA<sup>Ala</sup>).



**Figure 4: Surface mapping by H/DEx in complexes formation.** (A) H/D exchange representation at primary structure of SelB using 15 and 30 minutes of deuterium staining. (B) Tridimensional representation for 30 minutes of deuterium incorporation using SelB homology model (C) H/D exchange representation at primary structure of SelB using 30 minutes of deuterium staining in presence of tRNA<sup>Sec</sup> and SECIS element (D) Tridimensional representation for 30 minutes of deuterium incorporation using SelB homology model. Deuterium incorporation percentage legend: Dark blue (0-10%) Blue (10-12.5%) Light blue (12.5-20%) Cyan (20-25%) Dark green (25-30%) Green (30-45%) Yellow (45-55%) Orange (55-70%) Dark red (70-80%) and Red (80-100%).



**Figure 5: Low-resolution model of SelB by SAXS.** (A) Distribution function of SelB, SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS. Molecular envelope fitted with molecular models obtained by homology modeling SelB (B), SelB.tRNA<sup>Sec</sup> (C) and SelB.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS (D).



**Figure 6: Interaction model for SelB.tRNA<sup>Sec</sup> recognition in Sec pathway.** SelB is represented in blue, GTP in yellow, SelA in green, tRNA<sup>Sec</sup> in red, mRNA in light blue, 60 S and 40 S ribosome subunits in light and dark grey, respectively.

## Tables

Table 1: Thermodynamics parameter of Sec interacting pathway.

Sample	Kd (nM)	n	$\Delta G = RT\ln(Kd)$ (kcal/mol)
SelB.GTP	740*	-	-3.92
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup>	248 ± 59	1.7 ± 0.7	-9.01 ± 0.14
	283.3 ± 53	1.4 ± 0.6	-8.93 ± 0.11
SelB.GTP.SECIS.tRNA <sup>Sec</sup>	895 ± 57	1.8 ± 0.8	-8.25 ± 0.04
SelB.GTP.SelA.tRNA <sup>Sec</sup>	72 ± 14	2.4 ± 0.9	-9.74 ± 0.11
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .SECIS	77 ± 3	7.3 ± 2.5	-9.70 ± 0.02
SelB.GTP.SECIS	57 ± 13	2.6 ± 1.5	-9.87 ± 0.13
SelB.GTP.tRNA <sup>Sec</sup> .ribosome	84 ± 6	7.3 ± 3.2	-9.65 ± 0.04
SelB.GTP.SECIS.ribosome	110 ± 9	3.3 ± 0.7	-9.49 ± 0.05
SelB.GTP.SECIS.tRNA <sup>Sec</sup> .ribosome	21 ± 2	2.0 ± 1.0	-10.48 ± 0.06

Table 2: tRNA<sup>Sec</sup> mutants binding constants by fluorescence anisotropy spectroscopy.

	K <sub>D</sub> (nM)	n	r <sup>2</sup>
tRNA <sup>Sec</sup>	266.8 ± 27.5	1.4 ± 0.2	0.95
Acceptor	583.6 ± 88.7	0.8 ± 0.1	0.91
Anti	269.4 ± 28.8	0.9 ± 0.1	0.96
Dloop	284.7 ± 42.4	0.9 ± 0.1	0.92
TψC	500.7 ± 69.3	1.0 ± 0.1	0.91
Var1	720.7 ± 90.2	1.1 ± 0.2	0.90
Var2	491.1 ± 43.7	1.2 ± 0.1	0.95
tRNA <sup>Ala</sup>	645.8 ± 129.4	0.6 ± 0.1	0.91

**Table 3: Equilibrium results of tRNA<sup>Sec</sup> variable arm deletion compared with tRNA<sup>Sec</sup> and tRNA<sup>Ala</sup> binding constants.**

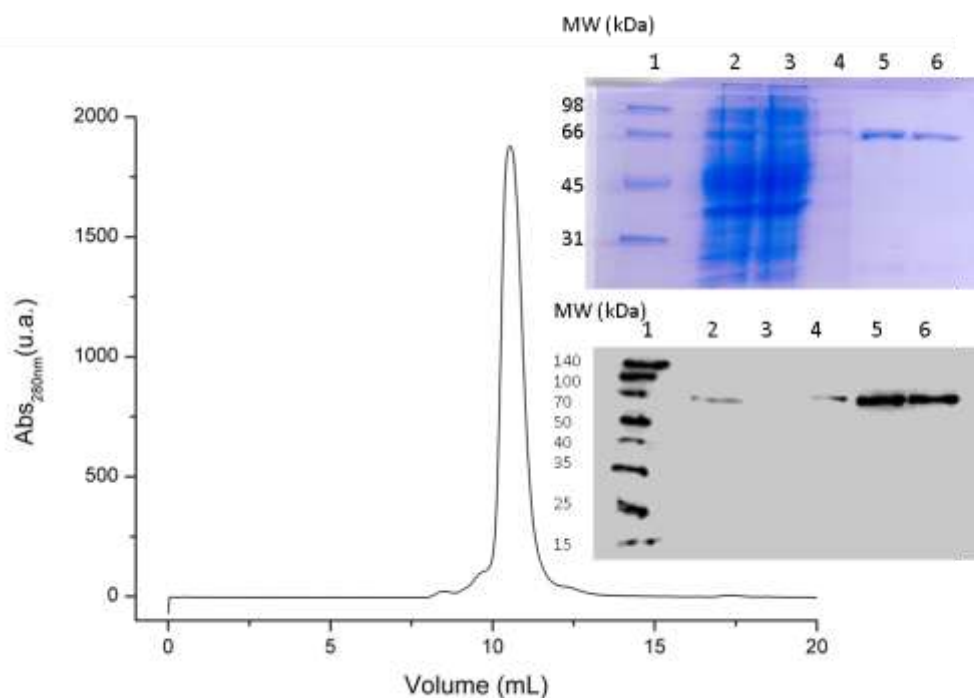
Sample	K <sub>D</sub> (nM)	rmsd
0.5 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	230.21	0.02
1 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	261.03	0.04
2 SelB : 1 tRNA <sup>Sec</sup>	277.93	0.04
<b>K<sub>D</sub> avg = 256.39</b>		
0.5 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	610.93	0.03
1 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	629.74	0.01
2 SelB : 1 tRNA <sup>Ala</sup>	629.92	0.05
<b>K<sub>D</sub> avg = 623.53</b>		
0.5 SelB : 1 tRNA <sup>var1</sup> mutant	794.33	0.02
1 SelB : 1 tRNA <sup>var1</sup> mutant	700.12	0.05
2 SelB : 1 tRNA <sup>var1</sup> mutant	773.19	0.02
<b>K<sub>D</sub> avg = 755.88</b>		

**Table 4: Transition thermodynamics parameters obtained by DSC experiments.**

Sample	T <sub>max</sub> (°C)	C <sub>Pmax</sub> (kcal/mol/°C)	ΔT <sub>1/2</sub> (°C)
SelB.Blank	47.4 ± 0.2	43 ± 3	4.7 ± 0.6
+ GTP	48.1 ± 0.1	55 ± 3	3.8 ± 0.6
+ tRNA	49.0 ± 0.1	55 ± 2	3.3 ± 0.2
+ GTP + tRNA <sup>Sec</sup>	48.9 ± 0.1	65 ± 2	3.8 ± 0.2
+ GTP + SECIS	48.7 ± 0.1	63 ± 2	3.7 ± 0.2
+ GTP + SECIS + tRNA <sup>Sec</sup>	48.7 ± 0.2	61 ± 2	3.7 ± 0.2

**Table 5: Secondary structure variation during complexes formation.**

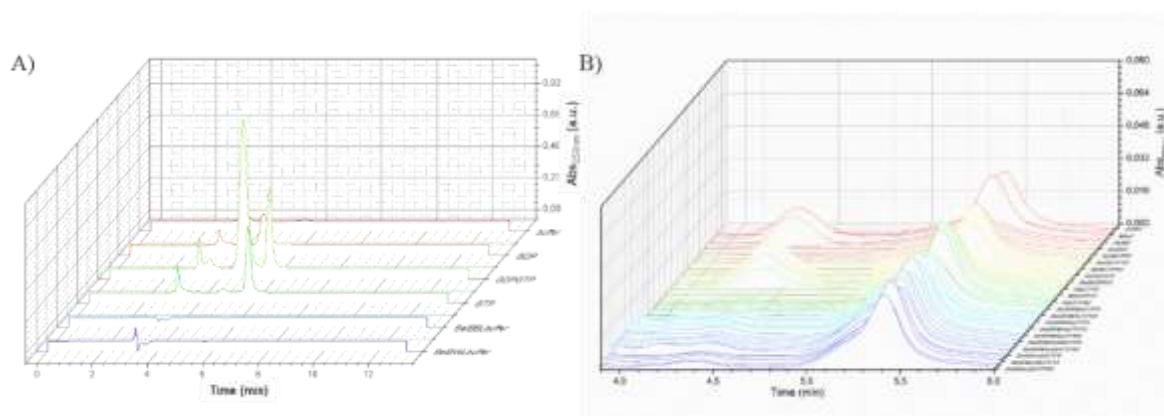
Motif/Protein	SelB	SelB.tRNA <sup>Sec</sup>	SelB.SECIS	SelB.tRNA <sup>Sec</sup> .SECIS
$\beta$ (1690 cm <sup>-1</sup> )	2.9	2.3	2.3	2.1
Turn (1674 cm <sup>-1</sup> )	16.1	11.6	11.5	9.8
$\alpha$ (1654 cm <sup>-1</sup> )	15.6	37.2	33.3	39.9
Rnd (1644 cm <sup>-1</sup> )	23.1	22.4	5.4	11.3
$\beta$ (1633 cm <sup>-1</sup> )	29.9	1.7	42.3	24.6
$\beta$ (1623 cm <sup>-1</sup> )	2.2	22.8	1.6	10.0
$\beta$ (1610 cm <sup>-1</sup> )	10	1.8	3.6	2.2

**Supplemental data**

**Figure S11: SelB purification.** SelB chromatogram using Superdex 75 (10/300) size exclusion column. Inset: SDS-PAGE 15% and His-tag Western blot from: (1) Molecular weight (kDa); (2) Cell lysate; (3) Ni-TALON affinity column flow through; (4) Ni-TALON affinity column wash with 20 mM imidazole; (5) Ni-TALON affinity elution; (6) SEC chromatography peak from Superdex 75 (10/300).

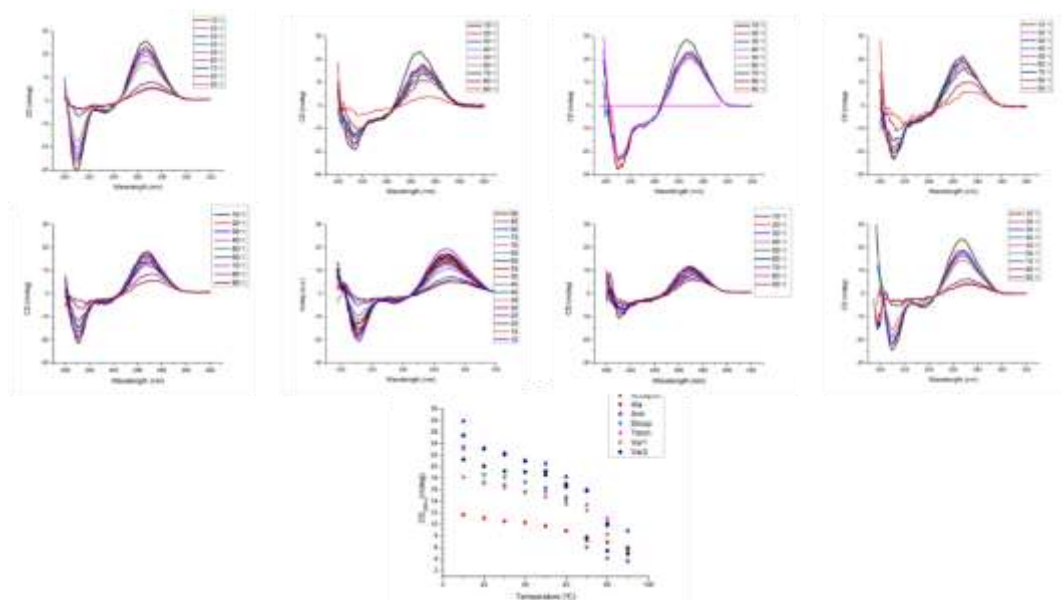
Table SI1: Endogenous RNAs quantification.

	[RNA] (ng/ $\mu$ L)	$\frac{[\text{RNA}_{\text{final}}]}{[\text{RNA}_{\text{initial}}]}$
<i>E. coli</i> BL21 strain (Before treatment with RNase A)	1416	100%
<i>E. coli</i> BL21 strain (Treatment with RNase A – Over Night)	0	0
<i>E. coli</i> WL81640 strain (Before treatment with RNase A)	1198	100%
<i>E. coli</i> WL81640 strain (Treatment with RNase A - Over Night)	0	0

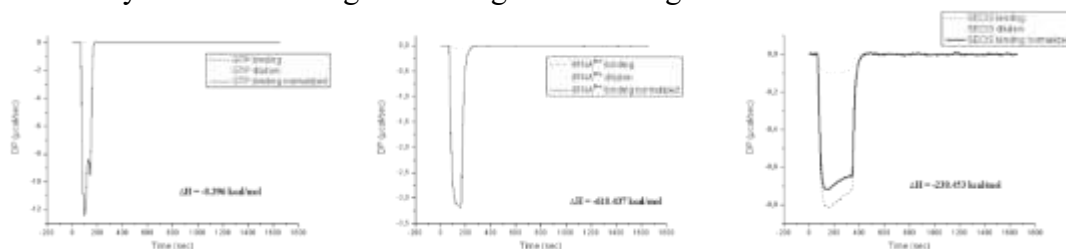


**Figure SI2: Nucleotides evaluation by high performance liquid chromatography (HPLC).** (A) Quantification of endogenous nucleotides reveals the GTP/GDP absence. (B) GTPase activity assays showing the GTP conservation during complexes formation monitored at time function (0-60 minutes).





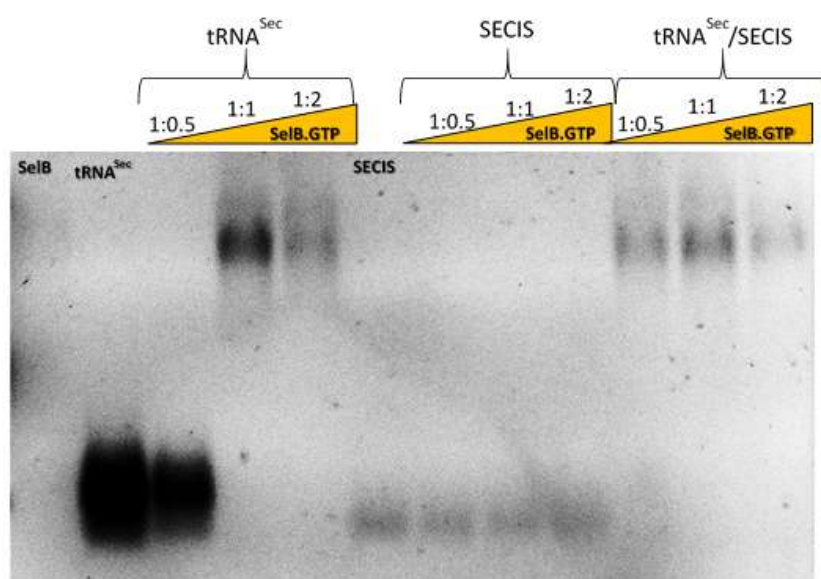
**Figure SI3: tRNAs folding during thermal variation monitored by circular dichroism (CD).** CD spectrum of (A) tRNA<sup>Sec</sup> (B) Acceptor arm mutant (C) Anticodon mutant (D) D-loop mutant (E) T $\psi$ C arm mutant (F) Variable arm deletion (Var1) (G) Variable arm substitution (Var2) (H) tRNA<sup>Ala</sup> (I) Thermal variation monitored by 268 nm showing the folding and allowing the T<sub>m</sub> determination.



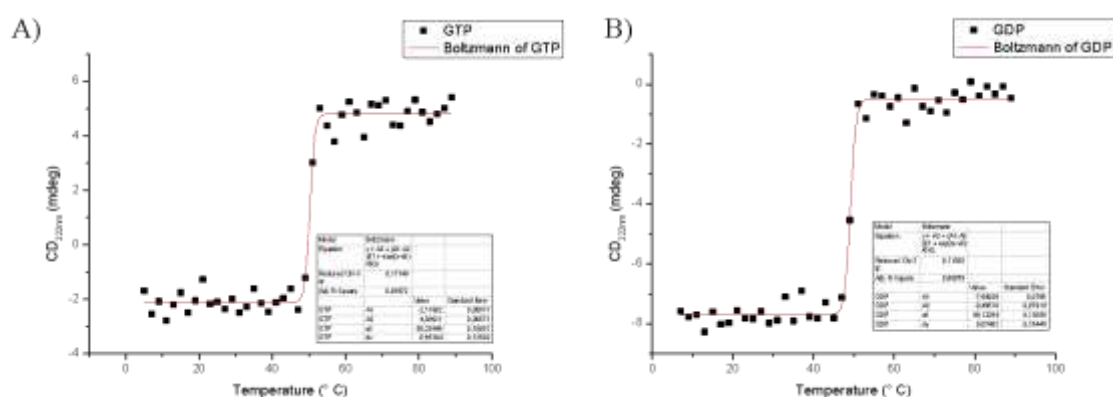
**Figure SI4: Isothermal titration calorimetry (ITC) assays and qualitative electrophoretic mobility shift to determine the enthalpy variation by single injection.** (A) GTP titration on SelB. (B) tRNA<sup>Sec</sup> titration on SelB.GTP. (C) SECIS titration on SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> ternary complex. (D) Qualitative electrophoretic mobility shift assays in agarose gel (2%) increasing the SelB.GTP concentration.

**Table SI2: Analytical ultracentrifugation results in sedimentation experiments.**

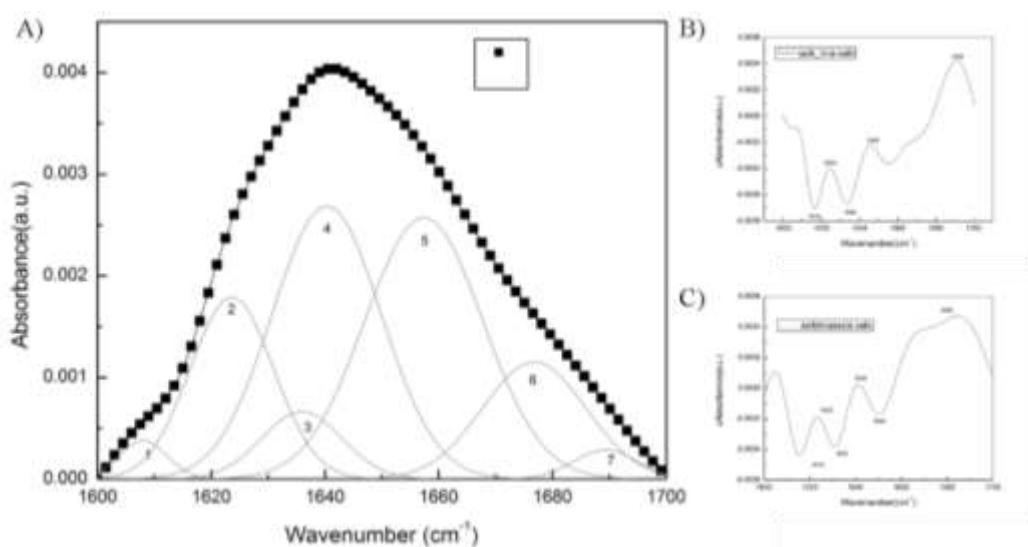
Sample	sw (S)	sw(20,w) (S)	MW (Da)
SelB	4.507	4.779	63,426
SelB.tRNA <sup>Sec</sup>	6.894	7.310	119,984
SelB.Acceptor arm mutant	7.147	7.579	126,656
SelB.Dloop arm mutant	7.671	8.134	140,830
SelB.TψC arm mutant	7.252	7.690	129,467
SelB.Var1 arm mutant	4.674	4.957	66,994
SelB.tRNA <sup>Ala</sup>	7.556	8.012	137,671



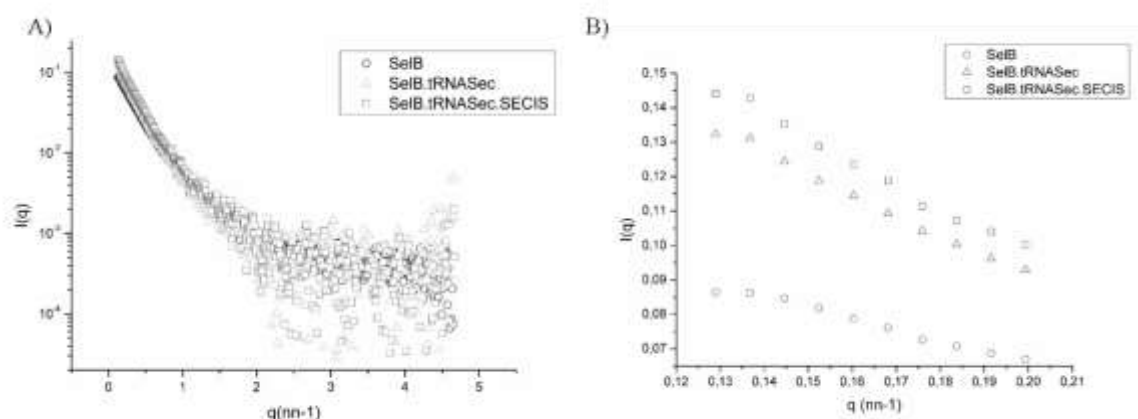
**Figure SI5: Equilibrium assays.** (A) Positive binding control SelB.tRNA<sup>Sec</sup> using 3 different stoichiometry ratios (0.5; 1 and 2 SelB) comparing with tRNA<sup>Sec</sup>. (B) Negative binding control SelB.tRNA<sup>Ala</sup> at the same experimental design (C) SelB.tRNA<sup>var1</sup> mutant showing the loss of specificity and the Variable arm dependence to SelB.tRNA<sup>Sec</sup> interaction. All experiments were performed using 1 mM GTP.



**Figure SI6: SelB thermal variation monitored by circular dichroism (CD) in presence of nucleotides.** CD spectrum of (A) SelB.GTP (B) SelB.GDP showing the  $T_m$  variation in presence of this nucleotides.



**Figure SI7: Secondary structures variation monitored by Infrared.** (A) Infrared spectrum of SelB.GTP sample fitted with Gaussian functions resulting in a secondary structure determination (42.8%  $\beta_{\perp}$  and 2.2%  $\beta_{\parallel}$  sheets, 15.6%  $\alpha$ -helix, 16.1% turns and 23.1% random structures). (B) Difference spectrum between SelB.GTP and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> reveals the secondary structure variation during ternary complex formation. (C) Difference spectrum between quaternary complex (SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS) with ternary complex previous measured.



**Figure SI8: SAXS analysis.** (A) X-ray scattering profiles for SelB.GTP; SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup> and SelB.GTP.tRNA<sup>Sec</sup>.SECIS complexes. (B) Guinier approximation to estimate the gyration radius of these complexes.

**Table SI3: In solution parameters obtained by SAXS analysis.**

	SelB	SelB.tRNA <sup>Sec</sup>	SelB.tRNA <sup>Sec</sup> .SECIS
<b>MW (discrepancy) (kDa)</b>	91.9 (0.34)	135.6 (0.358)	-
<b>Dmax (nm)</b>	14.65	15.0	18.77
<b>Gyration radius (nm)</b>	4.37	4.82	5.56
<b>Porod volume (nm<sup>3</sup>)</b>	150.51	228.92	244.97

**ANEXO 3 The selenocysteine incorporation pathway in *Escherichia coli***  
**ARTIGO A SER PUBLICADO**

**Vitor Hugo Balasco Serrão<sup>1</sup>, Ivan Rosa Silva<sup>1</sup>, Jéssica Fernandes Scortecci<sup>1</sup>, Adriano de Freitas Fernandes<sup>1</sup>, Marco Tullio Alves da Silva<sup>1</sup> and Otavio Henrique Thiemann<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup> São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, Brazil; E-Mail:; vitor.serrao@usp.br (V.H.B.S.); ivan.usp@hotmail.com (I.R.S.); adriano.fernandes@usp.br (A.F.F.); jessica.scortecci@usp.br (J.F.S.); silvamta@gmail.com (M.T.A.S.); thiemann@ifsc.usp.br (O.H.T.).

<sup>2</sup> Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, Brazil; e-mail: thiemann@ifsc.usp.br (O.H.T.).

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: thiemann@ifsc.usp.br; Tel.: +55-16-3373-8089; Fax: +55-3373-9881.

---

**Abstract**

Selenium (Se) is an essential trace element for several organisms and is present in proteins as selenocysteine (Sec, or U). Sec is synthesized in specific Ser-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> to produce Sec-tRNA<sup>Sec</sup> molecules by a specific selenocysteine synthesis machinery and incorporated into selenoproteins at an in-frame UGA codon specified by a mRNA stem-loop structure called the SElenoCysteine Insertion Sequence (SECIS). Selenoproteins are present in all domains of life, but are not found in all organisms, however the Sec incorporation pathway was extensively characterized. Here, we discuss structural and biochemical aspects of Sec-tRNA<sup>Sec</sup> and its role in selenocysteine synthesis as well as its incorporation into selenoproteins in *Escherichia coli* in comparison with other bacterias.

**Keywords:** Selenocysteine; Selenoproteins and Sec-tRNA<sup>Sec</sup>

---

## 1. Overview

In the course of protein biosynthesis, each mRNA codon is recognized by a specific anticodon at the cognate tRNA molecule previously aminoacylated in a reaction catalyzed by a specific aminoacyl tRNA synthetase [1]. A polymer of amino acid residues is then formed as the ribosome progresses along the mRNA until a termination (stop) codon (UAG – amber, UAA – ochre or UGA – opal) is reached (reviewed in [2, 3]). The efficiency of translation has been correlated, in some instances, to the availability of specific tRNAs. Such association correlates with tRNA genes copy number in the genome (recently reviewed in [4]). Considering the wobble effect, described by Francis Compton Crick in the late 1960s, the genetic code is degenerate and 20 naturally occurring amino acids are decoded by 2, 4 or 6 codon combinations, except for Met and Trp [3, 5] encoded by single codons, AUG and UGA respectively. Francis and Crick proposed in 1966 that the wobble hypothesis does not permit UGA codon to code for any amino acid but cysteine or tryptophan [5]. Later, the opal codon was shown to code for tryptophan [6] and cysteine [7]. Furthermore, the frozen accident theory stated that the genetic code is also universal and any change would be strongly selected against [8].

However, Diamond and collaborators described, in 1981, an unusual seryl-tRNA<sub>UCA</sub> (now known as seryl-tRNA<sup>Sec</sup>) suppressor of the UGA stop codon in chicken [9]. Over more than three decades of extensive research, this unusual RNA molecule was shown to function as a carrier molecule in which the 21<sup>st</sup> amino acid selenocysteine (Sec, or U) is synthesized from serine and incorporated in a nascent selenoprotein (reviewed in different perspectives in [10-14]). Selenocysteine differs chemically from serine and cysteine by a single atom (Se instead of O or S, respectively, in its side chain). Compared to cysteine, free selenocysteine has a lower pK<sub>a</sub> for the selenolate and is also more nucleophilic, conferring its unique properties when found in a microenvironment of a selenoprotein [15].

Selenocysteine specific incorporation into selenoproteins at a UGA codon is due to selenocysteinyl-tRNA<sup>Sec</sup> anticodon recognition that is an exception to the wobble effect and is inconsistent with the frozen accident theory [16]. This intricate process requires a complex selenocysteine-specific machinery that has been extensively studied in *Escherichia coli*.

In the late 1980s and the early 1990s, four *Escherichia coli sel* genes (previously *fdh* genes) named *selA*, *selB*, *selC* and *selD* were identified as responsible for selenocysteine biosynthesis and incorporation in selenoproteins in initial studies on formate metabolism [13, 17]. Specifically, bacterial *selC* gene mutation was observed to affect selenium incorporation into molybdo-seleno formate dehydrogenase (FDH) selenoproteins, but not in selenouridine-containing tRNAs [17]. Further characterization demonstrated that *selC* gene is monocistronic and codes to tRNA<sup>Sec</sup> in *E. coli* chromosome [17, 18]. On the other hand, the other *sel* genes code to proteins involved in serine-selenocysteine conversion and UGA-Sec decoding to selenocysteine in *E. coli*. These genes are organized in the *selAB* operon and the *selD-topB* operon (*topB* gene codes to topoisomerase III) in the *E. coli* genome [18, 19]. Leinfelder and collaborators [17, 19] also showed that *selC* gene complements tRNA<sup>Sec</sup> deficient *E. coli* strain leading to active FDH-H (associated with hydrogen production) and FDH-N (induced in the presence of nitrogen) selenoproteins [17, 19].

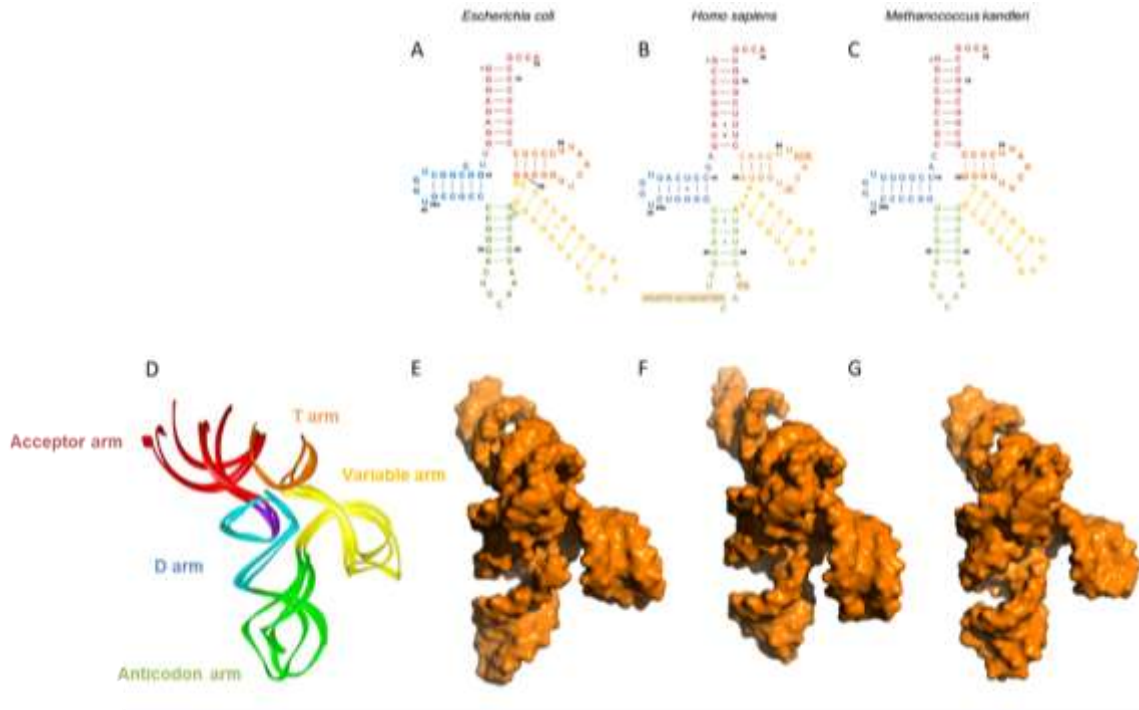
## 2. *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> gene: transcription and maturation

Bacterial tRNA genes are distributed throughout the genome as part of rRNA operons [20] or with protein coded sequence(s) in the form of a polycistronic transcript [21]. For other tRNA genes, the transcription initiation is controlled by the interaction of RNA polymerase with promoter sequences located at the 5'-end of the initiation site [22], which is the case for *E. coli selC* gene, being preceded by classical -10 and -35 promoter sequences [17] involving the  $\sigma$ -subunit of RNA polymerase interaction [23]. Bacterial *selC* transcription termination has not been described yet as rho-dependent or rho-independent of other genes [24]. Interestingly, former Northern blotting experiments showed that *selC* gene is transcribed at equivalent levels in both aerobically and anaerobically growing cells [18], indicating a lack of transcription regulation by the cellular redox state.

In *Bacteria*, tRNA precursors are processed in their 5' and 3'-terminal extensions by nucleolytic cleavage [25]. RNaseP endonucleolytic activity generates the mature 5'-terminus and RNaseD generates the 3'-terminus, upstream to the CCA addition site by tRNA adenosyl transferase [26]. *E. coli in vitro* RNaseP processing of two tRNA<sup>Sec</sup> precursors confirmed that both were cleaved at the nucleotide site immediately upstream of the tRNA<sup>Sec</sup> coding sequence (position -1) [27]. Additionally, *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> contains a gene-coded 3'-terminal CCA sequence, which probably interacts with RNaseP, contributing to its efficient 5'-processing [27]. Besides, no intron is observed in the *E. coli selC gene* as in the majority of bacterial tRNAs [27]. Furthermore, post-transcriptional modification was observed in *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup>, although methylations and isopentenylation of eukaryotic tRNA<sup>Sec</sup> have been described to contribute to tRNA-ribosome as well as to codon-anticodon interactions [28-34].

## 3. The unique structure of tRNA<sup>Sec</sup>

Initial biochemical analysis of the 95 nucleotides long *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> revealed that its unique secondary structure presents 8 base pair aminoacyl acceptor stem and a 5 base pair T $\Psi$ C arm, besides a 22 nucleotide long variable arm [35]. Moreover, tRNA<sup>Sec</sup> is the longest tRNA in *E. coli* [35]. Type II tRNAs, such as tRNA<sup>Ser</sup> and tRNA<sup>Leu</sup>, also have characteristic long variable arm, however their conserved '7+5' cloverleaf structure differs from the '8+5' secondary structure of tRNA<sup>Sec</sup> [35]. In addition, *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> dihydrouridine arm (D arm) is composed of a 6-bp stem and a 4-nucleotide loop, in contrast to the 3-4-bp D stem and 7-12-nucleotide D loop of the canonical tRNAs [35] (Figure 1). The analysis of its primary and secondary structure also reveals a G at position 8 and an A at position 14, a pyrimidine-purine (Y-R) base pair at the 10-25 sites and R-Y base pair at 11-24 positions. All other *E. coli* tRNA molecules show a G15:C48 or an A15:U48 tertiary interaction known as the Levitt base pairs stabilizing the stacking interaction of the D and T $\Psi$ C stems, therefore missing in *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> [35].



**Figure 1:** Comparative structures of tRNA<sup>Sec</sup> of A and E) Bacteria (*Escherichia coli*), B and F) Eukaryotes (*Homo sapiens*) and C and G) Archea (*Methanococcus kandleri*). A to C is shown the schematic representation of the structure of the tRNA<sup>Sec</sup>. In E to G the structural model of the corresponding tRNA<sup>Sec</sup>. D) representative domains of tRNA<sup>Sec</sup> structure.

The crystal structure of *Aquifex aeolicus* tRNA<sup>Sec</sup> [36] confirmed the bacterial tRNA<sup>Sec</sup> L-shaped structure and its tertiary structure interactions, previously identified [36, 37] (Figure 1). *A. aeolicus* tRNA<sup>Sec</sup> presents a U20:G19:C56 triple base interaction contributing to the D-T $\Psi$ C loops interactions together with the universal G18:U55 bp and the tRNA<sup>Sec</sup>-specific U16:U59 bp [37]. In addition, there is a linker between the acceptor stem and the D stem (AD linker) which is composed of U8 and U9. U8 is involved in a triple interaction with G14:C21 and U9 is stacked on the first base pair of the extra arm stem. The G48 linker between the extra stem and the T $\Psi$ C stem is stacked on U8 and interacts with G20 to form the unique C15:G20a:G48 base triple [36]. These unusual sequence and structural properties are conserved in the sequence of other bacterial tRNA<sup>Sec</sup> species [36]. Curiously, *Moorella thermoacetica* tRNA<sup>Sec</sup> is the longest known tRNA molecule with 100 bases in length [37].

Canonical tRNA molecules, which are 75 nucleotides long on average, form a tight tertiary core of conserved U8:A14, R15:Y48 base pairs and additional D stem base triples between positions 45:10:25, 12:23:9 and 13:22:46 (or 12:23:9 for a tRNA with long extra arm) [36]. On the other hand, bacterial tRNA<sup>Sec</sup> tertiary core is composed of the weaker G14:C21:U8 and C15:G20a:G48 triple base pairs that contribute to maintain its overall structure [36]. Recent biochemical data showed that these additional base pairs in the D-stem were not required for the *E. coli* tRNA<sup>Sec</sup> function, except at high temperatures [38]. However, Ishii and collaborators argued that flexibility of tRNA<sup>Sec</sup> tertiary structure is essential for its function and it would be helpful for the simultaneous accommodation of the anticodon loop and of the CCA terminus at proper places on the ribosome surface [38].

The structure of eukaryotic tRNA<sup>Sec</sup> molecules from human [39, 40] mouse [41], and the archaeal tRNA<sup>Sec</sup> from *Methanococcus* structure have been reported [42-44]. The main difference between the eukaryotic and archaeal tRNA<sup>Sec</sup> compared to the bacterial tRNA<sup>Sec</sup> (Figure 1) are the unique '9+4' acceptor



arm-T $\Psi$ C arm fold in comparison to the '8+5' structure of bacterial tRNA<sup>Sec</sup> and '7+5' structure of canonical tRNAs [39, 42-44] (Figure 1). An unusual D stem similar to that observed in *A. aeolicus* tRNA<sup>Sec</sup> was also found in eukaryotic and archaeal tRNA<sup>Sec</sup> tertiary structures [39, 42-44]. It is surprising that the overall structure of these tRNA<sup>Sec</sup> molecules are similar, since their primary and secondary structures are divergent [41]. Conservation of the D arm conformation, the D-T $\Psi$ C loops interaction, the total length of the acceptor-T $\Psi$ C arm and the orientation of the long extra arm contributes to such similarity [36, 41].

#### 4. Sec-tRNA<sup>Sec</sup> aminoacylation, the first recognition point

The first step of Sec incorporation is the aminoacylation of the tRNA<sup>Sec</sup>. Differing from other canonical amino acids, Sec does not have a specific aminoacyl-tRNA synthetase enzyme (aaRS). First, tRNA<sup>Sec</sup> is misacylated with L-serine with ATP consumption and then requires a specific correction mechanism [45]. Usually, the recognition of the specific tRNA by the correct aaRS employs two recognition determinants: the acceptor arm size and a specific interaction region, normally the anticodon [45]. The dimeric seryl-tRNA synthetase enzyme (SerRS, E.C. 6.1.1.11), a class II synthetase with an anti-parallel beta-sheet fold flanked by alpha-helices, is responsible for the specific recognition of tRNA<sup>Sec</sup> without the use of the anticodon sequence as a recognition point [46, 47], but use the acceptor and variable arms to recognize the correct tRNA to proceed with aminoacylation. On the other hand, it has acquired a unique N-terminal coiled-coil domain for variable arm recognition [47].

Comparing to other canonical tRNAs, tRNA<sup>Ser</sup> and tRNA<sup>Sec</sup> presents a long variable arm structure, characteristic of class II tRNAs, conveying specificity for tRNA aminoacylation with L-serine [47]. Despite the sequences divergences, tRNA<sup>Ser</sup> and tRNA<sup>Sec</sup> have an overall similar folding and the structural models of SerRS-tRNA complex corroborate with a specific recognition mechanism [11].

The tRNA<sup>Sec</sup> aminoacylation occurs in two steps: activation by adenylation and the transfer of the aminoacyl group to the specific tRNA. The first step is the formation of L-seryl-adenylate from L-serine and ATP [48]. L-seryl-adenylate is a mixed anhydride in which the carboxyl group of the amino acid is linked to the phosphoryl group of AMP; hence, it is also known as L-seryl-AMP [36]. The second step is the transfer of the L-seryl group to the 3'-OH binding site in tRNA<sup>Ser</sup> or tRNA<sup>Sec</sup> to form L-seryl-tRNA<sup>Ser</sup> or L-seryl-tRNA<sup>Sec</sup> [11,36].

Recently, the full-length structure of human SerRS was determined by x-ray diffraction [49]. Wang *et al* determined that *H. sapiens* SerRS-tRNA<sup>Sec</sup> specific interaction occur between the flexible coiled-coil region N-terminal of SerRS and regions of the variable arms, D-loop and the T $\Psi$ C of tRNA<sup>Sec</sup>. The N-terminal consists of a coiled-coil region that is exposed by the domain aminoacylation [49]. SerRS present N-terminal conserved in all organisms with exception of methanogens [49]. The two long  $\alpha$ -helices of N-terminal tRNA-binding domain provides flexible catalytic site for tRNA recognition and its aminoacylation. It was observed that co-exist in solution the interaction of SerRS-tRNA<sup>Sec</sup> at proportions of 2:1 and 2:2. This is because the dimeric protein SerRS makes most contacts with the variable arm and T $\Psi$ C domain of tRNA<sup>Sec</sup> with one of its monomers and interacts with the acceptor arm using the other monomer (Figure 2) [49].

From the recent determinations of crystallographic structures of this aminoacyl, it is possible to infer the conservation of recognition site and charging mechanism by the folding conservation of tRNA<sup>Sec</sup> and SerRS, including the specific recognition regions like the longer variable arm and the coiled-coil N-terminal domain, respectively [11].

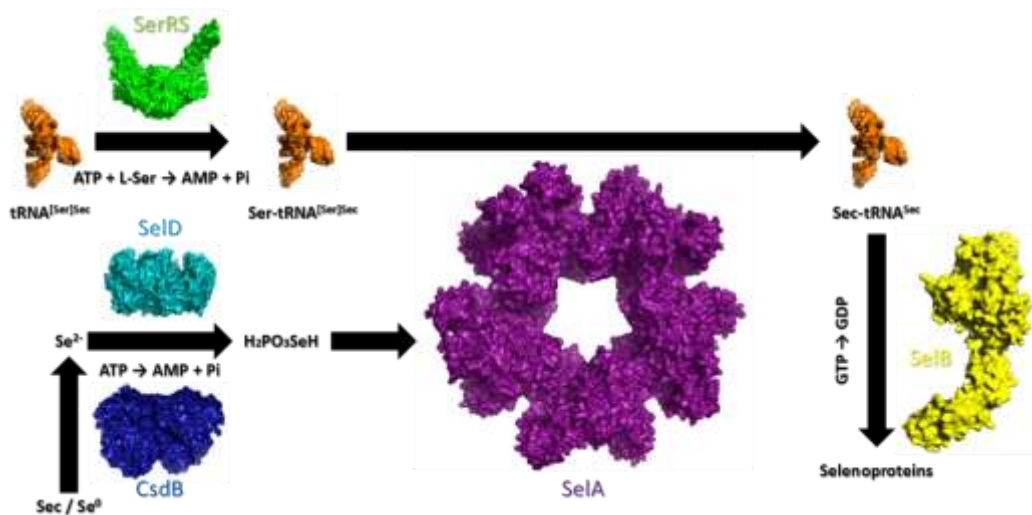
The aaRS presents extremely conserved function and folding when compare various organisms, which helps to understand the mechanism and biochemistry of this enzyme in the different domains.

### 5. Ser-to-Sec conversion, where the divergence begins.

The conversion from L-seryl to L-selenocysteyl tRNA<sup>Sec</sup> diverges in the different domains of life [50].

In Bacteria, the reaction is catalyzed by a homodecameric with ~500 kDa and piridoxal-5' phosphate (PLP) dependent enzyme, Selenocysteine synthase (SelA, E.C. 4.2.1) [45, 50] (Figure 2). This enzyme was previously described in the 1990's in *E. coli* [50, 51] and participates in the Ser-Sec conversion reaction in two steps. The first step is the Schiff's base formation between the  $\alpha$ -amino group of L-serine with the formyl group of a covalently bound PLP in the catalytic lysine residue of SelA. This reaction results in the dehydration of Ser and the formation of the intermediate state denominated aminoacrylyl-tRNA<sup>Sec</sup> (Figure 3) covalently bound to SelA [45, 51] at the acceptor stem (Figure 2). The second step is the selenium transfer by nucleophilic substitution, resulting in the formation of selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> or Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, where the selenium utilized is delivered by Selenophosphate Synthetase (SelD or SPS, E.C. 2.7.9.3) in selenophosphate form [51, 52] (Figure 3).

At beginning of the 90's, the binary complex SelA-Sec-tRNA<sup>Sec</sup> was shown to form a heterocomplex with 1 SelA decamer interacting with 5 Sec-tRNA<sup>Sec</sup> or 10 SelA monomers interacting with 5 Sec-tRNA<sup>Sec</sup> [45, 53-55].



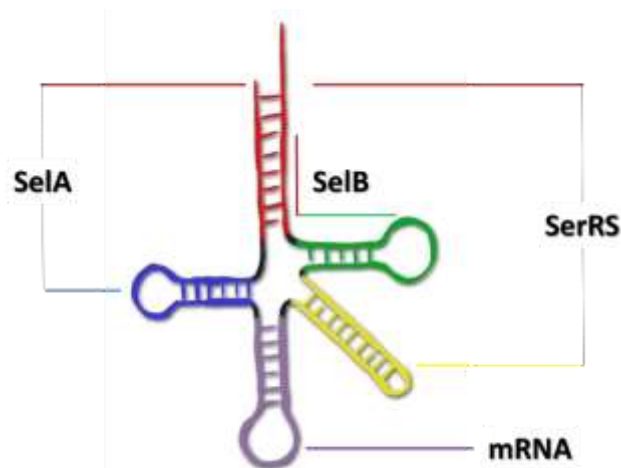
**Figure 2:** The selenocysteine synthesis pathways in Bacteria, the SelA route is exclusive to Bacteria.

However, recent study proved that the stoichiometry ratio between *E. coli* SelA and the specific tRNA<sup>Sec</sup> in solution is 1SelA<sub>decamer</sub>:10tRNA<sup>Sec</sup> [55], corroborating with the crystallographic structure of bacterial SelA resolved by Itoh and collaborators [45], which reveals the D-arm recognition to correct binding. Moreover, the authors shown which the acceptor arm size is crucial to enable the distance to catalytic site where the PLP is covalently bound to lysine residue to perform the reaction previous described. *E. coli* SelA presents 30% of identity with *A. aeolicus* SelA, which showed a presence of two domains: N-terminal domain, unique to Bacteria, a three-helix bundle responsible to interacts with tRNA<sup>Sec</sup> specific D-arm and the SelA domain

responsible to covalently bound between Lys235-PLP and the tRNA<sup>Sec</sup> 5' acceptor arm to Ser-Sec conversion as previous described [45, 50].

The SelA decamer presence is unique in bacterial selenocysteine biosynthesis pathway as compared with Archaea or Eukarya [50, 54-57], and its N-terminal domain is essential to tRNA<sup>Sec</sup> recognition by the specific interaction with the D-arm (Figure 3) [45]. Furthermore, this domain is responsible to maintain the oligomerization as a decamer [53] allowing the functional state, whereas the SelA dimer is a non-function enzyme [54]

Recently, the transient ternary complex to selenium compound delivery was characterized, showing the interaction between the binary complex SelA-tRNA<sup>Sec</sup> with SelD [58], resulting in a complex with nanometric dimensions and ~1.3 MDa. In addition, the SelD N-terminal catalytic domain is important to the interaction and, consequently, functionality. The truncated enzyme, ΔN-SelD, reveals the importance to interaction by biophysical and functional experiments, inasmuch as the catalytic cysteine residue is included in this domain.



**Figure 3:** Schematic representation of tRNA<sup>Sec</sup> recognition structures: (A) SelA, SelB and SerRS interaction in bacterias.

In general, the Ser to Sec conversion and tRNA<sup>Sec</sup> recognition in Archaea is similar to that of Eukarya where the Sec-biosynthesis is composed by the same three steps. [59, 60, 61]. The first step is analogous to that of Bacteria and the second step is the phosphorylation of the  $\gamma$ -hydroxyl group of seryl-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> to obtain Sep-tRNA<sup>[Sep]Sec</sup> with the expense of ATP by the dimeric O-phosphoseryl-tRNA kinase (PSTK, E.C. 2.7.1.164) [59]. The 3'OH end in acceptor arm is charged with the L-seryl group, resulting in an O-phosphoseryl tRNA<sup>[Sep]Sec</sup> covalently bound (Sep-tRNA<sup>[Sep]Sec</sup>) is the substrate for the third reaction step [45, 62]. Finally, the Sep to Sec conversion is mediated by SepSecS (O-phosphoseryl-selenocysteyl Synthase, E.C. 2.9.1.2) [63]. In the SepSecS PLP-dependent tetrameric enzyme, the O-phosphoseryl group is hydrolyzed using the monoselenophosphate delivered by selenophosphate synthetase-2 (SPS2, E.C. 2.7.9.3), with PLP as co-factor, to obtain selenocysteyl covalently bonded in tRNA<sup>Sec</sup> (Sec-tRNA<sup>Sec</sup>) [39, 63]. However, there are still open gaps for the complete characterization of the selenocysteine biosynthesis pathway in Eukarya and Archaea.

## 6. Where does the selenium come from?

Ser to Sec conversion is a selenophosphate ( $\text{PSeO}_3^{3-}$ ) dependent process [10, 50] though selenophosphate is not the main form of selenium in the cells [64]. Usually, cells obtain this essential element from the environment as inorganic selenium ( $\text{Se}^0$ ) before converting into the biological intermediate used in selenocysteine and selenomethionine biosynthesis [64]. Other route to obtain biological selenium is from L-selenocysteine deselenation, in which the Sec residue is recycled to  $\text{Se}^0$  and alanine by selenocysteine lyase (NifS-like protein), allowing the re-use of this  $\text{Se}^0$  in Sec-biosynthesis [65] (Figure 3). Studies involving the uptake of inorganic selenium by cell diet have been performed; however, there are just speculations of the action of lyases to obtain  $\text{Se}^0$  form from selenate or other selenium forms [66].

Previous studies [67] indicate that NifS-like protein plays a role in selenocysteine pathway and in sulfur pathway in Bacteria. There is one cysteine-conserved residue – Cys364 in *E.coli* - demonstrated to function in the decomposition of L-cysteine, revealing different mechanisms for L-cysteine decomposition and L-selenocysteine deselenation [67]. For L-cysteine, the residue Cys364 makes a nucleophilic attack during the desulfurization reaction and for L-Sec, the  $\text{Se}^0$  is released spontaneously from the intermediate formed during the deselenation reaction. Thus, this residue is not totally essential for the L-Sec degradation, however if the position of this residue in the active site is not properly for the desulfurization reaction, the NifS-like protein can act as a selenocysteine lyase.[67, 68]. In *E. coli*, the specific activity of selenocysteine lyase is higher for L-Sec than for L-Cys (Figure 2)[65].

Recently, NifS-like proteins, commonly called selenocysteine reductase or selenocysteine beta-lyase, were characterized in some bacteria [65, 66] and identified as being essential to cell metabolism as candidates for the control of free selenium levels *in vivo* [61, 64-69] (Figure 3). Three NifS-like proteins were identified in *Bacteria* [70] and the Selenocysteine Lyase (CsdB, E.C. 4.4.1.16) from *E. coli* was proposed to deliver selenium to Selenophosphate Synthetase (SelD or SPS, E.C. 2.7.9.3) [71] (Figure 3). Due to the high toxicity of selenium, the interaction model between *E. coli* CsdB and SelD was proposed by different researchers [36, 52, 70] but it has not been demonstrated yet. However, the *in vitro* SelD activity was intrinsically related to the amount of CsdB available [71]. The CsdB enzyme is a PLP-dependent dimer with a SelA-like fold [71]. For *E. coli*, CsdB has a 300-fold higher affinity for L-Sec than for L-Cys, showing the specificity in Sec- $\text{Se}^0$  degradation pathway (Figure 2) [70].

A model of CsdB.SelD interaction was proposed by Itoh and collaborators [72] using a SPS protein of *A. aeolicus* and CsdB from *E. coli*. In this model the interaction probably occurs by the linking of Cys13 (SPS - *A. aeolicus*) and Cys364 (CsdB). The SPS catalytic residue in *E. coli* is Cys17. For the model proposed, the selenosulfide group is bounded into Cys364 of CsdB and the Cys13 of SPS can make a link to the group selenosulfide-Cys364. Besides that, there is high complementarity between the surfaces areas surrounding the active site of both proteins [72]. Noinaj and colleagues also proposed a model for SPS mechanism [52], where suggested that the interaction for selenium transfer occurs through the CsdB.selenium complex and SPS Cys17.

Upon delivery of selenium to SPS, the selenide ( $\text{Se}^{2-}$ ) and ATP are consumed in selenophosphate synthesis. Selenide is provided by selenite reduction, from converted methylated selenium compounds (inorganic selenium) or through selenium removal from selenoprotein degradation (NifS-like proteins product) [70] (Figure 3). Studies on *in vitro* activity of *Azotobacter vinelandii* NifS and SPS proteins corroborate that this class of NifS

enzymes acts in the delivery  $\text{Se}^0$  to SPS, where NifS activity promote a higher rate of selenophosphate formation by SPS than for free selenide in solution [73].

During selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> biosynthesis, selenophosphate is delivered to Ser-Sec conversion catalytic complex. Silva and collaborators performed studies of the ternary complex – SPS.SelA.tRNA<sup>Sec</sup> – formation, as previous mentioned [58]. The selenophosphate is transferred to the binary complex SelA.tRNA<sup>Sec</sup> and after the delivery of selenophosphate, SelA catalyzes the Ser-Sec conversion as previously described on section 7.

In Archaea, the NifS-like protein homologue was identified and characterized [74, 75]. Eukaryotic selenophosphate synthetase enzymes comprise two different isoforms where the SPS2 presents the Sec catalytic residue located in its N-terminal domain [52]. One is named SPS2 and contains Sec or Cys at the active site. The selenophosphate is produced in two steps: first, the selenide is phosphorylated by the  $\gamma$ -phosphate of ATP and then ADP is hydrolyzed, releasing selenophosphate, AMP and O-phosphate [72, 73, 76]. After selenophosphate is synthesized, it remains bound to the active site of selenophosphate synthetase until ADP hydrolysis occurs and the product release is completed [72]. Curiously, in *E. coli* the  $K_m$  for selenide is 20  $\mu\text{M}$  [72], which is a toxic concentration for the cell. This suggest that free selenium cannot be the physiological donor for SPS2. The other isoform, named SPS1, was identified exclusively in some eukaryote organisms [77], which also contain SPS2, with neither Sec not Cys at the active site. Interestingly, Bacteria and Archaea possess only SPS2 homologues [78].

## 7. The specific elongation factor and the translation process

The next step in the selenocysteine pathway after Sec-tRNA<sup>Sec</sup> synthesis is its incorporation in the nascent polypeptide chain during translation [79]. The aminoacyl-tRNA delivery involves a GTPase protein class called elongation factors (EFs). The EFs have different structural architectures varying the number of domains [80-83], however, the N-terminal domain is always a GTPase [84], usually denominated as Domain I.

Recently, the full-length bacterial SelB structure from *A. aeolicus* (PDB ID 4ZU9) was resolved by X-ray crystallography [85]. In their model, Itoh *et al* characterize SelB dividing it into three main regions: the N-terminal, C-terminal and a linker consisting of two alpha helices that separate the N-C terminal regions (NC-linker) which gives flexibility between the N and C portion.

In his study, Itoh *et al* suggest that GTP binds to SelB by residues Asp119 (*Ec*Asp115), Lys117 (*Ec*Thr113), Ala151 (*Ec*Ala147) and Val152 (*Ec*Val152) that belonging to a high conserved folding,  $\alpha/\beta$  topologies, with five sequential conserved small GTP binding regions [86] and undergo conformational change during GTP hydrolysis in the presence of magnesium (Figure 4-A) [86-88].

On the other hand, the C-terminal portion (Domain II and III) is a tRNA recognition domain [89]. These domains are responsible to interact with the acceptor and T $\Psi$ C arms of the specific tRNA, and despite its specificity, the folding is well conserved with two  $\beta$ -barrel [90]. The two  $\beta$ -barrel domains are also presented, specific to the 13-bp long acceptor-T $\Psi$ C helix with 8/5 bp in bacteria, what differs tRNA<sup>Sec</sup> from all other tRNAs [91, 92]. By co-crystallize with L-Cys SelB simulating an analogue to L-sec, it is suggested that the SelB interaction region with the tRNA is the interface of the domains D1 and D2. The Arg198 residue (*Ec*Thr192) and Arg241 (*Ec*Arg235) in D1 domain interact with the thiol group of Cys and L-His229 (*Ec*His223) residues interact with the amino group. These residues makes D1 and D2 domain essential to the recognition of the

acceptor arm tRNA<sup>Sec</sup> while the TΨC arm is recognized by D3 domain (Figure 3). However, there are exceptions like in mitochondria EFs-tRNAs recognition [85, 93].

SelB N-terminal domain share sequence similarity to EF-Tu and IF2 [94]. The N-terminal portion of SelB has composed for four winged-helix: WHD1, WHD2, WHD3 and WHD4. It is observed a flexible portion that connects the WHD2 and WHD3 portions providing greater freedom conformational for domain composed by WHD3 and WHD4 winged-helices, which in turn interact with the SECIS while WHD1 and WHD2 domains interact with the ribosome. This repositioning can adjust SelB to relative entry site of ribosome for different mRNAs that encoding Sec [85]. Although, it is already known the structures of the elements involved in the recognition of Sec-tRNA<sup>Sec</sup> for subsequent delivery to the ribosome, most of the interactions are performed only by modeling since not all structural complexes were resolved.

Recently, new recombinant selenoproteins were obtained by high efficiency suppression of amber stop codons in bacterial system making compatible with the canonical molecular machinery [95]. Furthermore, new constructions using chimaera from the canonical EF-Tu by engineering orthogonal translation system allowed the Sec incorporation in deficiency strains showing the molecular possibilities to Sec incorporation [96]. For Sec insertion at an UGA codon (Sec-UGA) is necessary a specific mechanism to recognition as no a Stop-codon (Stop-UGA). Sec-UGA is distinguished from Stop-UGA by the presence of a hairpin sequence structure denominated SECIS (SElenoCysteine Insertion Sequence) [10]. In Bacteria, this structure element is immediately downstream of the UGA codon. Sec-tRNA<sup>Sec</sup> forms a ternary complex with SelB.GTP and the SECIS element [97], and the SelB.SECIS binding occurs directly via the SelB C-terminal extension [90, 97, 98]. The bacterial EF to Sec incorporation has an extra domain in its C-terminal region (WHD 4 domain), which is accounted to recognize a special structural element in the mRNA, SECIS element [97, 98]. The structure of this unique bacterial WHD4 IV was resolved in complex with the SECIS element and in full-length protein [85, 94, 98].

The SelB-GTP interaction is stimulated by the presence of the 70S ribosomal complex and SECIS element [99]. Thermodynamic experiments have demonstrated that SelB has higher GTP affinity than GDP, with a  $K_D$  of 3.7  $\mu$ M and 20  $\mu$ M, respectively [100, 101].

In eukaryotic and archaeal, domains, the SECIS element occurs in the untranslated region of the mRNA immediately follows the translation termination codon called 3'-UTR [91]. The Sec elongation factor from Archaea and Eukarya have not a C-terminal extension to SECIS recognition like bacterial SelB domain IV, unique with this domain, therefore, eukaryotes can be recognize the SECIS element is mediated by an isolated protein, the SECIS binding protein 2 (SBP2) [91, 92]. In Archaea, a SBP ortholog has not been identified, the closest homologous being ribosomal protein S30, although there is no conclusive evidence until now (Figure 4-B) [102, 103].

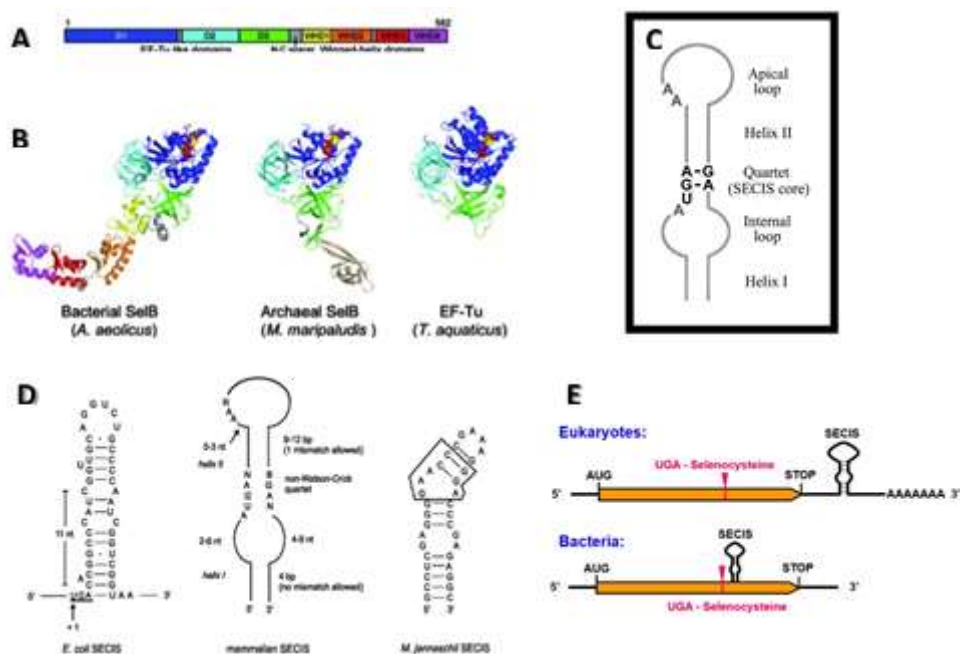


Figure 4: The SelB and SECIS comparison. (A) Schematic representation of SelB sequence [85] and (B) The comparison between structures of Bacterial SelB and archaeal, also the canonical EF-Tu [85]. (C) The canonical SECIS conformation and (D) the comparison between SECIS elements in *E. coli*, mammalian and Archaeal, respectively [118]. (E) The eukaryotes and bacteria SECIS element position to Sec incorporation [14]. 8. How to distinguish the UGA-Sec codon to Stop-codon.

To differentiate the UGA-Sec codon from UGA-stop codon, there is an mRNA element, denoted by SECIS, that directs Sec insertion into polypeptide chains [104]. As previously mentioned, the SECIS element presents a hairpin conformation folded by a stem-loop structure (Figure 4-C) [10; 97, 98, 105], usually, the canonical SECIS is composed of five structural elements: Helix I, located near of stop-codon for bacteria; Internal loop; SECIS core named non-Watson-Crick quartet, formed by double asymmetric A-G stems; Helix II and Apical loop, which differs in its consensus sequence, shape and position in the gene. Moreover, the Helix II have a conserved shape [106]. It might be variations on the conformation of various SECIS elements [105]. Bacterial SECIS element is found immediately downstream to Sec-UGA where UGA adenosine is part of the SECIS element [106, 107]. In addition, there is no overlap with the ribosomal binding site [108]. In *Bacteria*, the distance between the stop codon UGA and SECIS apical loop is about 20-25 nucleotides [104]. The location of SECIS element may indicate evolutionary predilection since it differs in the three domains of life. For bacteria, the events of translation and transcription are connected, thus if the element on mRNA is distant to the stop codon, SECIS probably will not be transcribed with high efficiency once the upstream codon is translated [104].

Previous studies have demonstrated that only the upper stem loop of SECIS (apical loop) is required for the interaction with SelB domain IVb. Consequently, this interaction region will be responsible to conduct the selenocysteine incorporation in bacteria. [105, 109] A complex containing SECIS, SelB, GTP and Sec-tRNA<sup>Sec</sup> is formed to guide the translation of selenocysteine into the ribosome [105]. This complex and the translation is explained on section 9. Therefore, the selenocysteine insertion sequence is essential to the incorporation of selenocysteine into selenoproteins polypeptide chains (Figure 4-D).

Archaeal and eukaryotic SECIS element are present at the 3'-UTR (3'-untranslated region) and can direct multiple UGA codons to code for selenocysteine amino acid [106]. Recently, SECIS element located in 5'-UTR in Archaea was identified, but this finding is currently an exception (Figure 4-E) [106, 107].





**Acknowledgments**

This work was supported in part by the research grants 1998/14138-2 and 2013/17791-0 (FAPESP), 550514/2011-2 (CNPq). Acknowledgment to Ana Laura Lima from Structural Biology Laboratory (LBest – IFSC/USP) by the tRNAs cartoons design. M.T.A.S. was supported by FAPESP fellowship (2011/24017-4), and V.H.B.S. was supported by FAPESP fellowship (2012/23730-1).

**Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

**References**

- [1] Woese, C.R., Olsen, G.J., Ibba, M., Soll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 202-+.
- [2] Agris, P.F. (2008) Bringing order to translation: the contributions of transfer RNA anticodon-domain modifications. *Embo Reports*, 9(7), 629-635.
- [3] Agris, P.F. (2004) Decoding the genome: a modified view. *Nucleic Acids Research*, 32(1), 223-238.
- [4] Maraia, R.J., Iben, J.R. (2014) Different types of secondary information in the genetic code. *RNA-A Publication of the Rna Society*, 20(7), 977-984.
- [5] Crick, F.H.C. (1966) codon-anticodon pairing - wobble hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, 19(2), 548-&.
- [6] Macino, G., Coruzzi, G., Nobrega, F.G., Li, M., Tzagoloff, A. (1979) Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(8), 3784-3785.
- [7] Meyer, F., Schmidt, H.J., Plumper, E., Hasilik, A., Mersmann, G., Meyer, H.E., Engstrom, A., Heckmann, K. (1991) UGA is translated as cysteine in pheromone-3 of *euplotes-octocarinatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3758-3761.
- [8] Crick, F.H.C. (1968) Origin of genetic code. *Journal of Molecular Biology*, 38(3), 367-&.
- [9] Diamond, A., Dudock, B., Hatfield, D. (1981) Structure and properties of a bovine liver UGA suppressor serine tRNA with a tryptophan anticodon. *Cell.*, Aug,25(2), 497-506.
- [10] Xu, X-M., Carlson, B.A., Mix, H., Zhang, Y., Saira, K., Glass, R.S., Berry, M.J., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. (2007) Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *Plos Biology*, 5(1), 96-105.
- [11] Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Baron, C. (1991) Selenoprotein synthesis - an expansion of the genetic-code. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(12), 463-467.
- [12] Rother, M., Resch, A., Wilting, R., Bock, A. (2001) Selenoprotein synthesis in Archaea. *Biofactors*, 14(1-4), 75-83.
- [13] Bock, A., Forchhammer, K., Heider, J., Leinfelder, W., Sawers, G., Veprek, B., Zinoni, F. (1991) Selenocysteine - the 21st amino-acid. *Molecular Microbiology*, 5(3), 515-520.
- [14] Donovan, J., Copeland, P.R. (2010) Threading the needle: getting selenocysteine into proteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(7), 881-892.
- [15] Arner, E.S.J. (2010) Selenoproteins - what unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Experimental Cell Research*, 316(8), 1296-1303.
- [16] Soll, D., RajBhandary, U.L. (2006) The genetic code - thawing the 'frozen accident'. *Journal of Biosciences*, 31(4), 459-463.
- [17] Leinfelder, W., Zehelein, E., Mandrandberthelot, M.A., Bock, A. (1988) Gene for a novel transfer-RNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. *Nature*, 331(6158), 723-725.

- [18] Sawers, G., Heider, J., Zehelein, E., Bock, A. (1991) Expression and operon structure of the sel genes of *Escherichia coli* and identification of a 3rd selenium-containing formate dehydrogenase isoenzyme. *Journal of Bacteriology*, 173(16), 4983-4993.
- [19] Leinfelder, W., Forchhammer, K., Zinoni, F., Sawers, G., Mandrandberthelot, M.A., Bock, A. (1988) *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. *Journal of Bacteriology*, 170(2), 540-546.
- [20] Jinksrobertson, S., Gourse, R.L., Nomura, M. (1983) Expression of ribosomal-RNA and transfer-RNA genes in *Escherichia coli* - evidence for feedback-regulation by products of ribosomal-rna operons. *Cell*, 33(3), 865-876.
- [21] Ilgen, C., Kirk, L.L., Carbon, J. (1976) Isolation and characterization of large transfer ribonucleic-acid precursors from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 251(4), 922-929.
- [22] Siebenlist, U., Simpson, R.B., Gilbert, W. (1980) *Escherichia coli* RNA-polymerase interacts homologously with 2 different promoters. *Cell*, 20(2), 269-281.
- [23] Browning, D.F., Busby, S.J.W. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(1), 57-65.
- [24] Henkin, T.M. (2002) Transcription termination control in bacteria. *Signals, Switches, Regulons and Cascades: Control of Bacterial Gene Expression*, 61, 169-181.
- [25] Schurer, H., Schiffer, S., Marchfelder, A., Morl, M. (2001) This is the end: Processing, editing and repair at the tRNA 3'-terminus. *Biological Chemistry*, 382(8), 1147-1156.
- [26] Kazantsev, A.V., Pace, N.R. (2006) Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nature Reviews Microbiology*, 4(10), 729-740.
- [27] Burkard, U., Soll, D. (1988) The unusually long amino-acid acceptor stem of *Escherichia coli* selenocystein transfer-RNA results from abnormal cleavage by RNase P. *Nucleic Acids Research*, 16(24), 11617-11624.
- [28] Lamichhane, T.N., Mattijssen, S., Maraia, R.J. (2013) Human Cells Have a Limited Set of tRNA Anticodon Loop Substrates of the tRNA Isopentenyltransferase TRIT1 Tumor Suppressor. *Molecular and Cellular Biology*, 33(24), 4900-4908.
- [29] Diamond, A.M., Choi, I.S., Crain, P.F., Hashizume, T., Pomerantz, S.C., Cruz, R., Steer, C.J., Hill, K.E., Burk, R.F., McCloskey, J.A. *et al* (1993) Dietary selenium affects methylation of the wobble nucleoside in the anticodon of selenocysteine transfer RNA Ser Sec. *Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 14215-14223.
- [30] Xu, X.M., Mix, H., Carlson, B.A., Grabowski, P.J., Gladyshev, V.N., Berry, M.J., Hatfield, D.L. (2005) Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. *Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41568-41575.
- [31] Barroso, M., Florindo, C., Kalwa, H., Silva, Z., Turanov, A.A., Carlson, B.A., de Almeida, I.T., Blom, H.J., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. *et al* (2014) Inhibition of cellular methyltransferases promotes endothelial cell activation by suppressing glutathione peroxidase 1 protein expression. *Journal of Biological Chemistry*, 289(22), 15350-15362.
- [32] Yarham, J.W., Lamichhane, T.N., Pyle, A., Mattijssen, S., Baruffini, E., Bruni, F., Donnini, C., Vassilev, A., He, L., Blakely, E.L., Griffin, H., Santibanez-Koref, M., Bindoff, L.A., Ferrero, I.,

- Chinnery, P.F., McFarland, R., Maraia, R.J., Taylor, R.W. (2014) Defective i6A37 modification of mitochondrial and cytosolic tRNAs results from pathogenic mutations in TRIT1 and its substrate tRNA. *PLoS Genet.* 10(6), e1004424.
- [33] Carlson, B.A., Xu, X.M., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L. (2005) Um34 in selenocysteine tRNA is required for the expression of stress-related selenoproteins in mammals. *Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing*, 12, 431-438.
- [34] Janas, T., Janas, T., Yarus, M. (2012) Human tRNA(Sec) associates with HeLa membranes, cell lipid liposomes, and synthetic lipid bilayers. *RNA-A Publication of the Rna Society*, 18(12), 2260-2268.
- [35] Baron, C., Westhof, E., Bock, A., Giege, R. (1993) Solution structure of selenocysteine-inserting transfer RNA(sec) from *Escherichia coli* - comparison with canonical transfer RNA(Ser). *Journal of Molecular Biology*, 231(2), 274-292.
- [36] Itoh, Y., Sekine, S-I., Suetsugu, S., Yokoyama, S. (2013) Tertiary structure of bacterial selenocysteine tRNA. *Nucleic Acids Research*, 41(13), 6729-6738.
- [37] Tormay, P., Wilting, R., Heider, J., Bock, A. (1994) Genes coding for the selenocysteine-inserting trna species from *Desulfomicrobium baculatum* and *Clostridium thermoaceticum*: structural and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 176(5), 1268-1274..
- [38] Ishii, T.M., Kotlova, N., Tapsoba, F., Steinberg, S.V. (2013) The long D-stem of the Selenocysteine tRNA Provides Resilience at the Expense of Maximal Function. *Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13337-13344.
- [39] Palioura, S., Sherrer, R.L., Steitz, T.A., Soell, D., Simonovic, M. (2009) The Human SepSecS-tRNA(Sec) Complex Reveals the Mechanism of Selenocysteine Formation. *Science*, 325(5938), 321-325.
- [40] Itoh, Y., Chiba, S., Sekine, S-I., Yokoyama, S. (2009) Crystal structure of human selenocysteine tRNA. *Nucleic Acids Research*, 37(18), 6259-6268.
- [41] Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A. (1993) Unique secondary and tertiary structural features of the eucaryotic selenocysteine tRNA(Sec). *Nucleic Acids Research*, 21(5), 1073-1079.
- [42] Hubert, N., Sturchler, C., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A. (1998) The 9/4 secondary structure of eukaryotic selenocysteine tRNA: More pieces of evidence. *RNA*, 4, 1029-1033+.
- [43] Ganichkin, O.M., Anedchenko, E.A., Wahl, M.C. (2011) Crystal structure analysis reveals functional flexibility in the selenocysteine-specific tRNA from mouse. *Plos One*, 6(5).
- [44] Araiso, Y., Palioura, S., Ishitani, R., Sherrer, R.L., O'Donoghue, P., Yuan, J., Oshikane, H., Domae, N., DeFranco, J., Soell, D. *et al* (2008) Structural insights into RNA-dependent eukaryal and archaeal selenocysteine formation. *Nucleic Acids Research*, 36(4), 1187-1199.
- [45] Itoh, Y., Bröcker, M. J., Sekine, S., Hammond, G., Suetsugu, S., Söll, D., Yokoyama, S. (2013) Decameric SelA•tRNA(Sec) ring structure reveals mechanism of bacterial selenocysteine formation. *Science*, 340(6128), 75-78.
- [46] Commans, S., Böck, A. (1999) Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(3), 335-351.
- [47] Schimmel, P. R., Söll, D. (1979) Aminoacyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 48, 601-648.

- [48] Härtle, M., Cusack, S. (1995) Structure, function and evolution of seryl-tRNA synthetases: implications for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetases and the genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, 40(5), 519-530.
- [49] Wang, C., Guo, Y., Tian, Q., Jia, Q., Gao, Y., Zhang, Q., Zhou, C., Xie, W., (2015) SerRS-tRNA<sup>Sec</sup> complex structures reveal mechanism of the first step in selenocysteine biosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 43(21), 10534-45.
- [50] Forchhammer, K., Böck, A. (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(10), 6324-6328.
- [51] Engelhardt, H., Forchhammer, K., Müller, S., Goldie, K. N., Böck, A. (1992) Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA<sup>Sec</sup>-enzyme complex. *Molecular Microbiology*, 6(23), 3461-3467.
- [52] Noinaj, N., Wattanasak, R., Lee, D. Y., Wally, J. L., Piszczek, G., Chock, P. B., Stadtman, T. C., Buchanan, S. K. (2012) Structural insights into the catalytic mechanism of *Escherichia coli* selenophosphate synthetase. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 499-508.
- [53] Itoh, Y., Bröcker, M. J., Sekine, S., Söll, D., Yokoyama, S. (2014) Dimer-dimer interaction of the bacterial selenocysteine synthase SelA promotes functional active-site formation and catalytic specificity. *Journal of Molecular Biology*, 426(8), 1723-1735.
- [54] Kaiser, J. T., Gromadski, K., Rother, M., Engelhardt, H., Rodnina, M. V., Wahl, M. C. (2005) Structural and functional investigation of a putative archaeal selenocysteine synthase. *Biochemistry*, 44(40), 13315-13327.
- [55] Manzi, L. R., Serrão, V. H., da Rocha e Lima, L. M., de Souza, M. M., Bettini, J., Portugal, R. V., van Heel, M., Thiemann, O. H. (2013) Assembly stoichiometry of bacterial selenocysteine synthase and SelC (tRNA<sup>Sec</sup>). *FEBS Letters*, 587(7), 906-911.
- [56] Hohn, M. J., Palioura, S., Su, D., Yuan, J., Söll, D. (2011) Genetic analysis of selenocysteine biosynthesis in the archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Molecular Microbiology*, 81(1), 249-258.
- [57] Turanov, A. A., Xu, X. M., Carlson, B. A., Yoo, M. H., Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (2011) Biosynthesis of selenocysteine, the 21st amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. *Advances in Nutrition*, 2(2), 122-128.
- [58] Silva, R.S., Serrão, V.H.B., Manzi, L.R., Faim, L.M., Silva, M.T.A., Makki, R., Saidenberg, D.M., Cornelio, M.L., Palma, M.S., Thiemann, O.H. (2015) Formation of a ternary complex for selenocysteine biosynthesis in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 29178-.
- [59] Chiba, S., Itoh, Y., Sekine, S-I., Yokoyama, S. (2010) Structural Basis for the Major Role of O-Phosphoseryl-tRNA Kinase in the UGA-Specific Encoding of Selenocysteine. *Molecular Cell*, 39(3), 410-420.
- [60] French, R. L., Gupta, N., Copeland, P. R., Simonović, M. (2014) Structural asymmetry of the terminal catalytic complex in selenocysteine synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(42), 28783-28794.
- [61] Schmidt, R.L. and Simonovic M. (2012) Synthesis and decoding of selenocysteine and human health. *Croat Med J*, 53(6), 535-550.

- [62] Sherrer, R. L., Ho, J. M., Söll, D. (2008) Divergence of selenocysteine tRNA recognition by archaeal and eukaryotic O-phosphoseryl-tRNA<sup>Sec</sup> kinase. *Nucleic Acids Research* (6), 1871-1880.
- [63] Ganichkin, O. M., Xu, X., Carlson, B. A., Mix, H., Hatfield, D. L., Gladyshev, V. N., Wahl, M. C. (2007) Structure and catalytic mechanism of eukaryotic selenocysteine synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 5849-5865.
- [64] Hatfield, D. L., Berry, M. J., Gladyshev, V. N. (2006) Selenium: its molecular biology and role in human health. Springer Science + Business Media, LLC, 2ed:1-411.
- [65] Mihara, H., Maeda, M., Fujii, T., Kurihara, T., Hata, Y., Esaki, N. (1999) A nifS-like gene, csdB, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 14768-14772.
- [66] Mihara, H., Esaki, N. (2002) Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Applied Microbiology Biotechnology*, (1-2), 12-23.
- [67] Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (2000) Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J Biochem.*, 127(4), 559-67.
- [68] Mihara, H., Fujii, T., Kato, S., Kurihara, T., Hata, Y., Esaki, N. (2002) Structure of External Aldimine of *Escherichia coli* CsdB, an IscS/NifS Homolog: Implications for Its Specificity toward Selenocysteine. *The Journal of Biochemistry*, 131(5), 679-685.
- [69] Poliak, P., Van Hoewyk, D., Oborník, M., Zíková, A., Stuart, K. D., Tachezy, J., Pilon, M., Lukes, J. (2010) Functions and cellular localization of cysteine desulfurase and selenocysteine lyase in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Journal*, 277(2), 383-393.
- [70] Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T., Esaki, N. (2000) 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*, 127(4), 559-567.
- [71] Lima, C. D. (2002) Analysis of the *E.coli* NifS CsdB protein at 2.0 Å reveals the structural basis for perselenide and persulfide intermediate formation. *Journal of Molecular Biology*, 315(5), 1199-1208.
- [72] Itoh, Y., Sekine, S., Matsumoto, E., Akasaka, R., Takemoto, C., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2009) Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs. *Journal of Molecular Biology*, 385(5), 1456-1469.
- [73] Ogasawara, Y., Lacourciere, G. M., Ishii, K., Stadtman, T. C. (2005) Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate synthetase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 25,102(4), 1012-1016.
- [74] Stadtman, T. (2004) *Methanococcus vannielii* selenium metabolism: purification and N-terminal amino acid sequences of a novel selenium-binding protein and selenocysteine lyase. *IUBMB Life*, 56(7), 427-431.
- [75] Fukunaga, R., Yokoyama, S. (2007) Structural insights into the first step of RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(4), 272-279.
- [76] Lacourciere, G. M., Stadtman, T. C. (2001) Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis. *BioFactors*, 14, 69-74.

- [77] Wang, K. T., Wang, J., Li, L., Su, X. (2009) Crystal structures of catalytic intermediates of human selenophosphate synthetase 1. *Journal of Molecular Biology*, 390(4), 747-759.
- [78] Guimaraes, M. J., Peterson, D., Vicari, A., Cocks, B. G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Ferrick, D. A., Kastelein, R. A., Bazan, J. F., Zlotnik, A. (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(26), 15086-15091.
- [79] Petrov, A., Kornberg, G., O'Leary, S., Tsai, A., Uemura, S., Puglisi, J. D. (2011) Dynamics of the translational machinery. *Current Opinion on Structural Biology*, 21(1), 137-145.
- [80] Agirrezabala, X., Frank, J. (2009) Elongation in translation as a dynamic interaction among the ribosome, tRNA, and elongation factors EF-G and EF-Tu. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 42(3), 159-200.
- [81] Mitra K, Frank J. (2006) Ribosome dynamics: insights from atomic structure modeling into cryo-electron microscopy maps. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, 35, 299-317.
- [82] Holtkamp, W., Wintermeyer, W., Rodnina, M. V. (2014) Synchronous tRNA movements during translocation on the ribosome are orchestrated by elongation factor G and GTP hydrolysis. *Bioessays*, 36(10), 908-918.
- [83] Wohlgenuth, I., Pohl, C., Mittelstaet, J., Konevega, A. L., Rodnina, M. V. (2011) Evolutionary optimization of speed and accuracy of decoding on the ribosome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1580), 2979-2986.
- [84] Laalami, S., Grentzmann, G., Bremaud, L., Cenatiempo, Y. (1996) Messenger RNA translation in prokaryotes: GTPase centers associated with translational factors. *Biochimie*, 78(7), 577-589.
- [85] Itoh, Y., Sekine, S., Yokoyama, S. (2015) Crystal structure of the full-length bacterial selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Nucleic Acids Res.*, 43(18), 9028-38.
- [86] Clementi, N., Polacek, N. (2010) Ribosome-associated GTPases: the role of RNA for GTPase activation. *RNA Biology*, 7(5), 521-527.
- [87] Spiegel, J., Cromm, P. M., Zimmermann, G., Grossmann, T. N., Waldmann, H. (2014) Small-molecule modulation of Ras signaling. *Nature Chemical Biology*, 10(8), 613-622.
- [88] Serrão, V. H., Alessandro, F., Caldas, V. E., Marçal, R. L., Pereira, H. D., Thiemann, O. H., Garratt, R. C. (2011) Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. *FEBS Letters*, 585(24), 3868-3873.
- [89] Ose, T., Soler, N., Rasubala, L., Kuroki, K., Kohda, D., Fourmy, D., Yoshizawa, S., Maenaka, K. (2007) Structural basis for dynamic interdomain movement and RNA recognition of the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Structure*, (5), 577-586.
- [90] Baron, C., Böck, A. (1991) The length of the aminoacyl-acceptor stem of the selenocysteine-specific tRNA(Sec) of *Escherichia coli* is the determinant for binding to elongation factors SELB or Tu. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(30), 20375-20379.
- [91] Berry, M. J., Tujebajeva, R. M., Copeland, P. R., Xu, X. M., Carlson, B. A., Martin, G. W., Low, S. C., Mansell, J. B., Grundner-Culemann, E., Harney, J. W., Driscoll, D. M., Hatfield, D. L. (2001) Selenocysteine incorporation directed from the 3'UTR: characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications. *Biofactors*, 14(1-4), 17-24.

- [92] Squires, J. E., Berry, M. J. (2008) Eukaryotic selenoprotein synthesis: mechanistic insight incorporating new factors and new functions for old factors. *IUBMB Life*, 60(4), 232-235.
- [93] Liu, T., Yu, R., Jin, S. B., Han, L., Lendahl, U., Zhao, J., Nistér, M. (2013) The mitochondrial elongation factors MIEF1 and MIEF2 exert partially distinct functions in mitochondrial dynamics. *Experimental Cell Research*, 319(18), 2893-2904.
- [94] Ganichkin, O., Wahl, M. C. (2007) Conformational switches in winged-helix domains 1 and 2 of bacterial translation elongation factor SelB. *Acta Crystallographica D Biological Crystallography*, 63, 1075-1078.142.
- [95] Thyer, R., Robotham, S.A., Brodbelt, J.S., Ellington, A.D. (2015) Evolving tRNA<sup>Sec</sup> for efficient canonical incorporation of Selenocysteine. *J. Am. Chem. Soc.*, 137, 46-49.
- [96] Haruna, K., Alkazemi, M.H., Liu, Y., Soll, D., Englert, M. (2014) Engineering the elongation factor Tu for efficient selenoprotein synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 42(15), 9976-83.
- [97] Soler, N., Fourmy, D., Yoshizawa, S. (2007) Structural insight into a molecular switch in tandem winged-helix motifs from elongation factor SelB. *Journal of Molecular Biology*, 370(4), 728-741.
- [98] Hilgenfeld, R., Böck, A., Wilting, R. (1996) Structural model for the selenocysteine-specific elongation factor SelB. *Biochimie*, 78(11-12), 971-978.
- [99] Paleskava, A., Konevega, A. L., Rodnina, M. V. (2010) Thermodynamic and kinetic framework of selenocysteyl-tRNA<sup>Sec</sup> recognition by elongation factor SelB. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3014-3020.
- [100] Thanbichler, M., Bock, A., Goody, R. S. (2000) Kinetics of the interaction of translation factor SelB from *Escherichia coli* with guanosine nucleotides and selenocysteine insertion sequence RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20458-20466.
- [101] Paleskava, A., Konevega, A. L., Rodnina, M. V. (2012) Thermodynamics of the GTP-GDP-operated conformational switch of selenocysteine-specific translation factor SelB. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27906-27912.
- [102] Kossinova, O., Malygin, A., Krol, A., Karpova, G. (2014) The SBP2 protein central to selenoprotein synthesis contacts the human ribosome at expansion segment 7L of the 28S rRNA. *RNA*, (7), 1046-1056.
- [103] Bifano, A.L., Atassi, T., Ferrara, T., Driscoll, D. M. (2013) Identification of nucleotides and amino acids that mediate the interaction between ribosomal protein L30 and the SECIS element. *BMC Molecular Biology*, 14:12.
- [104] Su, D., Li, Y., Gladyshev, V.N. (2005) Selenocysteine insertion directed by the 3'-UTR SECIS element in *Escherichia coli*. *Nucleic Acid Research*, 33(8), 2486-2492.
- [105] Thanbichler, M., Böck, A. (2002) The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, 21(24), 6925-6934.
- [106] Kossinova, O., Malygin, A., Krol, A., Karpova, G. (2013) A novel insight into the mechanism of mammalian selenoprotein synthesis. *RNA*, (8), 1147-1158.
- [107] Walczak, R., Westhof, E., Carbon, P., Krol, A. (1996) A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA*, 2, 367-379.
- [108] Allmang, C., Krol, A. (2006) *Selenium: its molecular biology and role in human health*. Springer



- Science + Business Media, LLC, 2ed:51-61.
- [109] Engelberg-Kulka, H., Liu, Z., Li, C., Reches, M., (2001) An extended *Escherichia coli* “Selenocysteine Insertion Sequence” (SECIS) as a multifunctional RNA structure. *BioFactors*, 14, 61–68.
- [110] Driscoll, D.M., Copeland, P.R., (2003) Mechanism and regulation of selenoprotein synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23, 17-40.
- [111] Mansell, J.B., Guévremont, D., Poole, E.S., Tate, W.P. (2001) A dynamic competition between release factor 2 and the tRNA<sup>Sec</sup> decoding the UGA at the recoding site of *Escherichia coli* formate dehydrogenase H. *The EMBO Journal*, 20, 7284-7293.
- [112] Tetteh, A.Y., Sun, K.H., Hung, C., Kittur, F.S., Ibeanu, G.C., Williams, D., Xie, J., (2014) Transcriptional Response of Selenopolypeptide Genes and Selenocysteine Biosynthesis Machinery Genes in *Escherichia coli* during Selenite Reduction. *International Journal of Microbiology*, 2014, 394835-.
- [113] Tormay, P., Sawers, A., Bock, A. (1996) Role of stoichiometry between mRNA, translation factor SelB and selenocysteyl-tRNA in selenoprotein synthesis. *Mol. Microbiol.* 21, 1253–59.
- [114] Arner, E.S., Sarioglu, H., Lottspeich, F., Holmgren, A. and Bock, A. (1999) High-level expression in *Escherichia coli* of selenocysteine containing rat thioredoxin reductase utilizing gene fusions with engineered bacterial-type SECIS elements and co-expression with the selA, selB and selC genes. *J. Mol. Biol.*, 292, 1003–1016.
- [115] Arner, E.S. (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases — important selenoproteins with versatile functions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 495–526.
- [116] Engelberg-Kulka, H. (1981) UGA suppression by normal tRNA<sup>Trp</sup> in *Escherichia coli*: codon context effects. *Nucleic Acids Research*, 9(4), 983-991.
- [117] Xu, J., Croitoru, V., Rutishauser, D., Cheng, Q., Arner, E.S. (2013) Wobble decoding by the *Escherichia coli* selenocysteine insertion machinery. *Nucleic Acids Research*, 41(21), 9800-11.
- [118] Birringer, M., Pilawa, S., Flohé, L. (2002) Trends in selenium biochemistry. *Nat. Prod. Rep.*, 19, 693-718.