UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

VITOR HUGO BALASCO SERRÃO

Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio de
Escherichia coli

São Carlos
2013

VITOR HUGO BALASCO SERRÃO

Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio 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 corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2013

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

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

Serrão, Vitor Hugo Balasco

Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio de *Escherichia coli* / Vitor Hugo Balasco Serrão; orientador Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2013.
187 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013.

1. Selenocisteínas. 2. Complexos macromoleculares.
3. Interação proteína-proteína. I. Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

Aos meus avós, meu pai e minha namorada.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus avôs, Dona Rita e Seu João, que com toda dificuldade do mundo, assumiram a responsabilidade de me criar, educar e estarem comigo até hoje, não à como agradecer, só dizer que os amo;

Ao meu Pai, que é para mim um exemplo de vida, no qual me espelho, e espero dar muito orgulho para ele ainda, e juntamente, à Maiza, pelo apoio e toda ajuda que tem me dado desde quando “virei bixo” em 2006;

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

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

Ao Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann pela orientação, amizade, companheirismo e por ter dado oportunidade a um aluno no início de um curso novo, porém, promissor;

Aos Drs. Fernando Alessandro e Marcel Nakahira, pela oportunidade de coorientar um aluno ainda no primeiro semestre, por todos os ensinamentos e amizade;

Ao Prof. Dr. Marin van Heel (*Faculty of Science – Universiteit Leiden – Holanda*) pela colaboração, discussões produtivas e oportunidade que me deu ao estagiar no NeCEN (*Netherlands Center of Eletron Nanoscopy*) sob sua supervisão. Ao Dr. Sacha de Carlo e Bart Alewijnse pela coleta, análise prévia de dados de Cryo-EM e ajuda durante esse tempo de

estágio;

Aos Drs. Rodrigo Villares Portugal e Jefferson Bettini, por todos os finais de semana de microscópio, análises dos dados, e-mails e por terem muita paciência comigo. As discussões que tivemos foram de grande valia para meu crescimento científico, vocês me ensinaram muito, e muito me alegra poder chamá-los de amigos. Além de agradecer ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano – CNPEM), onde passei inúmeros dias de trabalho e análise nos equipamentos de microscopia eletrônico de transmissão e de força atômica;

Aos Professores Mário Palma, Marinônio Cornélio, Alessandro Nascimento, Lucas Bleicher, Luis Maurício Lima, aos Drs. Daniel Saidemberg e Helton Wiggers e o aluno de mestrado Ícaro Caruso por todo auxílio e colaboração nesse projeto. Além de agradecer à infraestrutura do Departamento de Física (UNESP-São José do Rio Preto) e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS – UNESP-Rio Claro);

A Dra. Livia Regina Manzine (“chefe”), pela amizade, carinho e toda a ajuda que me ofereceu durante todos esses anos, não há como agradecer, essa dissertação é parte sua também;

Ao aluno de doutorado Ivan Rosa e Silva, por toda a colaboração nesse trabalho, pelas incontáveis viagens e sem sua participação, grande parcela desse trabalho não teria sido realizado;

Ao Dr. Marco Túlio Alves, que com vários cafés pós-almoço, permitiu com que várias ideias criativas surgissem, o que culminou em boa parte dos resultados desse trabalho e ao Dr. Humberto Pereira D'Muniz, por ser tão chato e ser meu amigo, por todos os ensinamentos e oportunidades concedidas;

A todos os Professores da Cristalografia e da Biofísica pelo apoio e colaboração em ideias para o andamento desse projeto, em especial ao Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo, pela ajuda e insistência nos dados cristalográficos, sabemos que não é nada trivial;

A todos os funcionários envolvidos com esse grupo de pesquisa, Rejane, Lu, Mari, Fernando Falvo, Su, Bel, Andressa, Júlia, Possato, Josimar, Maria, Gê, Augusto e sem esquecer-se de Kelven Ulisses, vocês foram fundamentais em toda ajuda fornecida, sem contar o pessoal da Graduação (Edvane, Bel e Beth) e da pós (Ricardo, Patrícia e Sylvio) que sempre foram solícitos e quebraram incontáveis “galhos”, obrigado. De um modo geral, a todos os

funcionários do IFSC, desde pessoas da infraestrutura e informática (Ivanzinho, João, Luciano e Sabá), como as meninas da biblioteca, dos laboratórios de ensino (Brêtas, Rafael, Seu Hélio, Ércio, Jae e Luciano), administrativos (Maurício e Ivani) e de todo campus: Luizão, Giba, Mi, Flavinho, Mario, Tia Celly e vários outros;

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

À FAPESP e CAPES pelos subsídios gastos para a realização desse projeto;

Sem deixar de esquecer, meus amigos para todas às horas.... seja para o futebol, “fazer gordice”, zoação, brincadeiras, truco na hora do almoço... os feras que sempre estão por perto, FOBão presente nesse trabalho como parte fundamental: Tazib (irmão do Antônio), Frodo, Frutigli, Ronaldo, Careta, Anderson, Link, Café, Coxinha, Sandy, Pudim, Nardão e Sombra, os que são agregados ao elenco estrelado, Zé, Panceta, Mama, Júlio e Antônio. A todos que participaram de projetos como a fundação da IFSC Jr. (Tássio, Fernando, Carlos, Marcelo, Pepê, Negão, Pizetta, Marília, e todos que fizeram parte desse desafio), a velha família GAPeria, a galera do MBA em “Relações Públicas” que sempre dão risada quando falo minha profissão, e sem esquecer aqueles que são amigos de longa data, Cauê, Ozzy, Hilde, Poli, Selvagem, Bessa, Álvaro, Felipe Lucas e Will, além do meu cachorro, “parcero pra todas as horas”;

E por fim, o mais importante, à Gladiane Volpi (Gladi), por todo carinho, amor, conselhos, companheirismo, amizade, ter ouvido minhas reclamações e sempre estar ao meu lado ao longo de todos esses anos. Sem você nada disso teria sido possível de ser realizado, só tenho a agradecer.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

*"Aperfeiçoar é pensar sem restrições.
Pensar sem restrições é pensar criativamente."*

Russell Lincoln Ackoff

12 de Fevereiro de 1919 – 29 de Outubro de 2009

Gestor Científico

RESUMO

SERRÃO, V.H.B. **Complexos macromoleculares da via específica de incorporação de selênio de *Escherichia coli***. 2013. 187p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

A existência de uma maior variedade de aminoácidos codificados pelo código genético tem estimulado estudos sobre os mecanismos de síntese, reconhecimento e incorporação desses resíduos nas cadeias polipeptídicas nascentes. Um exemplo é a via de incorporação de selenocisteína evento cotraducional dirigido pelo códon UGA. Em bactérias, essa via conta com uma complexa maquinaria molecular composta por: Selenocisteína Sintase (SelA), Fator de Elongação Específico de Reconhecimento (SelB), Selenofosfato Sintetase (SelD), tRNA específico (SelC ou tRNA^{sec}), sequência específica no mRNA (Sequência de Inserção de Selenocisteínas - SECIS) e Aminoacil tRNA Sintetase (aaRS). Pelo fato do selênio ter uma toxicidade elevada em ambientes celulares, é fundamental a compreensão do mecanismo catalítico e razão estequiométrica na formação dos complexos da via na etapa de incorporação junto ao tRNA^{sec}, bem como sua caracterização estrutural foram os objetivos deste trabalho. A proteína SelA foi expressa e purificada para utilização em análises envolvendo microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de transmissão com contraste negativo e em gelo vítreo foram realizadas nos complexos SelA e SelA-tRNA^{sec}, visando obter um modelo estrutural e a razão estequiométrica dos complexos. A fim de compreender o mecanismo de passagem do selênio, ensaios de anisotropia de fluorescência e de microcalorimetria, corroborados pelas análises de troca de hidrogênio-deutério acoplado a espectrometria de massa e espectroscopia de infravermelho, elucidaram a formação e estequiometria do complexo ternário SelA-tRNA^{sec}-SelD. Tentativas de cristalização e análises cristalográficas também foram realizadas, no entanto, sem sucesso. Com os resultados obtidos foi possível propor que o reconhecimento de SelD e, conseqüentemente, a entrega do selenofosfato, seja uma etapa crucial da via de incorporação de selenocisteínas.

Palavras-chaves: Selenocisteína. Complexos macromoleculares. Interação proteína-proteína.

ABSTRACT

SERRÃO, V.H.B. **Macromolecular assemblies of selenium incorporation specific pathway in *Escherichia coli***. 2013. 187p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

The existence of a greater variety of amino acids encoded by the genetic code has stimulated the study of the mechanisms of synthesis, recognition and incorporation of these residues in the nascent polypeptide chains. An example of genetic code expansion is the selenocysteine incorporation pathway an event cotraducional by the UGA codon. In bacteria, this pathway has a complex molecular machinery comprised: Selenocysteine Synthase (SelA), Specific Elongation Factor (SelB), Selenophosphate Synthetase (SelD), tRNA-specific (SelC or tRNA^{sec}), Specific mRNA Sequence (SElenocysteine Insertion Sequence - SECIS) and Aminoacyl tRNA Synthetase (aaRS). Because selenium has high toxicity in cellular environments; it is essential for cell survival the association of this compound with proteins, in this case, selenoproteins and the associated proteins involved in the selenocysteine synthesis. Therefore the understanding of the catalytic mechanism, stoichiometric ratio, protein complex formation with the tRNA^{sec}, and its structural characterization were the objectives of this work. The SelA protein was expressed and purified to used in analyzes involving atomic force microscopy, transmission electron microscopy with negative stain and in vitreous ice were performed in the complex SelA and SelA-tRNA^{sec} in order to obtain a structural model of the complex and the stoichiometric ratio of its components. To study the selenium association with protein of the synthesis pathway, fluorescence anisotropy assays and isothermal titration calorimetry corroborated by the analysis hydrogen-deuterium exchange coupled to mass spectrometry and infrared spectroscopy were employed. Crystallization attempts were made and preliminary crystallographic analyzes were also performed, however, so far unsuccessfully. The results obtained were possible to develop the hypothesis about the SelD recognition and, consequently, the selenophosphate delivery, a crucial stage of the selenocysteine incorporation pathway.

Keywords: Selenocysteine. Macromolecular assemblies. Protein-protein interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelos de complexos macromoleculares presentes nas células	32
Figura 2 -	Exemplos de complexos proteicos	33
Figura 3 -	Exemplos de proteínas interagentes com ácidos nucleicos	34
Figura 4 -	Comparação entre os aminoácidos cisteína e selenocisteína	36
Figura 5 -	Comparação entre as diferentes estruturações do elemento SECIS	37
Figura 6 -	Esquema da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em bactérias.	39
Figura 7 -	Esquema da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em arqueas.	40
Figura 8 -	Esquema da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em eucariotos.	41
Figura 9 -	Mecanismo de conversão em <i>E. coli</i> de seril-tRNA ^{sec} para selenocisteil-tRNA ^{sec} pela enzima Selenocisteína Sintase (SelA).	42
Figura 10 -	Modelo de entrega do selênio e interação postulada por Böck e colaboradores em 1991.	43
Figura 11 -	Estrutura cristalografia da enzima putativa SelA de <i>Methanocaldococcus jannaschii</i> .	43
Figura 12 -	Imagens de projeção da enzima Selenocisteína Sintase (SelA) de <i>E. coli</i> obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) utilizando preparo com <i>negative stain</i> (recobrimento com acetato de uranila).	44
Figura 13 -	Imagens de projeção da enzima Selenocisteína Sintase (SelA) de <i>E. coli</i> .	45
Figura 14 -	Análise estatística multivariada.	46
Figura 15 -	Micrografias obtidas por preparo em gelo vítreo.	46
Figura 16 -	Caracterização da partícula de SelA.	47
Figura 17 -	Comparação entre as estruturas secundárias dos tRNAs Sec de <i>E. coli</i> .	48
Figura 18 -	Estrutura cristalográfica da enzima dimérica SelD de <i>E. coli</i> (PDB.ID: 3U0O)	49
Figura 19 -	Ciclo de PCR utilizado, em termociclador, para a amplificação do DNA molde do <i>selC</i> de <i>Escherichia coli</i> .	68

	Gráfico ilustrativo do processo de cristalização de uma biomolécula em função de um dos parâmetros (concentração do agente precipitante) dentro os inúmeros possíveis.	70
Figura 20 -		
Figura 21 -	Metodologia de difusão de vapor.	71
Figura 22 -	Esquemas representativos sobre microscopia eletrônica.	73
Figura 23 -	Esquema da sequência de eventos da coleta e processamento de experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.	75
Figura 24 -	Preparos de amostras para TEM.	78
Figura 25 -	Esquema representativo dos experimentos de HDEx.	81
Figura 26 -	Esquema representativo das análises de complexos por HDEx.	83
Figura 27 -	Modos vibracionais das Amidas I e II, regiões de estiramento das ligações C=O e N-H das presentes nas ligações peptídicas.	84
Figura 28 -	Esquema dos experimentos de AFM.	86
Figura 29 -	Esquema funcional do DLS.	88
Figura 30 -	Representação do desing experimental utilizando nos experimentos de anisotropia de fluorescência.	89
Figura 31 -	Janela experimental do posicionamento da configuração dos polarizadores no decorrer das medidas.	90
Figura 32 -	As etapas de purificação monitoradas pelas cromatografias.	98
Figura 33 -	Gel resultado da eletroforese desnaturante. SDS-PAGE 15% das etapas de purificação.	99
Figura 34 -	Amplificação e produtos da reação de transcrição.	100
Figura 35 -	Cristais obtidos da proteína Sela.	101
Figura 36 -	Cristais obtidos da proteína Sela em complexo com o tRNA ^{sec} .	102
Figura 37 -	Micrografias eletrônicas obtidas em Microscópio JEOL 2100 operando em 200 kV.	104
Figura 38 -	Micrografias da amostra Sela com preparo NS-EM.	105
Figura 39 -	Análise de microscopia eletrônica das amostras do complexo em <i>negative stain</i> .	106
Figura 40 -	Esquema representativo dos eixos de simetria de ordem cinco e de ordem dois para as diferentes orientações.	108
Figura 41 -	Modelo tridimensional do monômero de Sela utilizando o programa MODELLER 9.0 e obtido pelo Dr. Alexandre Cassago	109

Figura 42 -	Sobreposição entre o modelo de <i>EcSelA</i> (verde) e <i>MjSelA</i> (azul).	109
Figura 43 -	Construção do modelo tridimensional.	110
Figura 44 -	Ajuste do modelo do decâmero gerado na densidade de Cryo-EM obtida em colaboração com resolução de $\sim 20\text{\AA}$.	111
Figura 45 -	Modelo das estruturas supramoleculares.	111
Figura 46 -	Construção do modelo tridimensional.	112
Figura 47 -	Modelo estrutural do domínio N-terminal.	113
Figura 48 -	Espectro deconvoluído da espectrometria de massas da amostra de SelA intacta.	114
Figura 49 -	Análise das taxas de incorporação de deutério.	115
Figura 50 -	Comparativo dos tempos de incorporação de deutério.	116
Figura 51 -	Plote das taxas de incorporação nos modelos estruturais.	117
Figura 52 -	Comparativo dos tempos de incorporação de deutério para o complexo binário SelA-tRNA ^{sec} .	118
Figura 53 -	Plote das taxas de incorporação do complexo binário SelA-tRNA ^{sec} nos modelos estruturais de SelA.	118
Figura 54 -	Comparativo dos tempos de incorporação de deutério para o complexo SelA e para o complexo binário SelA-tRNA ^{sec} .	119
Figura 55 -	Comparativo dos modelos estruturais em tempo de incorporação de deutério fixo em 30 minutos do complexo SelA e do complexo binário SelA-tRNA ^{sec} na estrutura do decâmero.	120
Figura 56 -	Espectro de FTIR.	121
Figura 57 -	Análises de AFM realizadas no IFSC.	124
Figura 58 -	Análises de AFM realizadas no LNNano.	125
Figura 59 -	Representação esquemática das mudanças das dimensões.	126
Figura 60 -	Análise de DLS.	128
Figura 61 -	Comparativo entre SelA e o complexo binário.	129
Figura 62 -	Construção do modelo tridimensional.	131
Figura 63 -	Curva de interação utilizando anisotropia de fluorescência.	133
Figura 64 -	Curva estequiométrica.	134
Figura 65 -	Experimentos de ITC.	136
Figura 66 -	Experimentos de DSC para as amostra de SelA e SelD.	138
Figura 67 -	Experimentos de DSC para os complexos.	139

Figura 68 -	Micrografia da amostra do complexo ternário.	141
Figura 69 -	Gel de SDS-PAGE 5% dos resultados de <i>crosslinking</i> químico.	142
Figura 70 -	Micrografias do complexo ternário <i>crosslinker</i> .	143
Figura 71 -	Sequência SelA com plote da incorporação do complexo ternário.	144
Figura 72 -	Plote das taxas de incorporação do complexo ternário nos modelos estruturais de SelA e seu N-terminal.	145
Figura 73 -	Comparativo dos tempos de incorporação de deutério para o complexo SelA, para o complexo binário SelA-tRNA ^{sec} e para o complexo ternário SelA-tRNA ^{sec} -SelD.	146
Figura 74 -	Comparativo dos modelos estruturas de SelA e de seu domínio N-terminal para o tempo de 30 minutos de incorporação de deutério.	147
Figura 75 -	Espectro de FTIR.	148
Figura 76 -	Espectro de diferença.	149
Figura 77 -	Representação esquemática da hipótese gerada. SelD pode ser compreendida como uma dímero que possui três domínio globulares ligados por uma α -hélice e uma volta.	150
Figura 78 -	Análises de AFM realizadas no LNNano.	151
Figura 79 -	Micrografias eletrônicas obtidas em Microscópio JEOL 2100 operando em 200 kV. Amostra de Cryo-EM de SelA, possível determinação de polidispersividade	152
Figura 80 -	Micrografias eletrônicas obtidas em Microscópio Titan Krios - NeCEN.	153
Figura 81 -	Amplificação do gene <i>sela</i> de <i>Escherichia coli</i> visualizado em gel de agarose 1%	179
Figura 82 -	Etapas de expressão da proteína SelA anteriormente a sua aplicação em coluna aniônica <i>DEAE Sepharose Fast Flow</i> , visualizada em SDS-PAGE.	180
Figura 83 -	Resultados de SAXS com a imposição do eixo de ordem 5 da molécula SelA.	180
Figura 84 -	Fotos dos cristais obtidos pelo Dr. Alexandre Cassago.	181
Figura 85 -	Cryo-EM de SelA realizada em 2008.	182
Figura 86 -	Espectros de dicroísmo circular apresentando as mudanças conformacionais em função da temperatura do tRNA ^{sec} de <i>E. coli</i>	183

sintetizado *in vitro*.

Figura 87 -	<i>Crosslinking</i> químico da proteína SelA com o reagente glutaraldeído em gel SDS-PAGE 10%.	183
Figura 88 -	Curvas de anisotropia de fluorescência da titulação SelA-SelA.	184
Figura 89 -	Curvas de titulação estequiométrica do complexo SelA-tRNA ^{sec} .	185
Figura 90 -	Perfil de incorporação de deutério na SelD de <i>E.coli</i> com 30 minutos de troca H/D	186

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'-UTR	Região 3' não traduzida no RNA mensageiro
Å	Ângstron
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Cys	Cisteína
Da	Dalton
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactosídeo
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Meio Luria-Broth
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
RNPs	Ribonucleoproteínas
RPM	Revoluções por minuto
Se	Selênio
Sec	Selenocisteína
SECIS	Sequência específica de inserção de selenocisteínas
Ser	Serina
tRNA	RNA transportador
tRNA ^{sec}	tRNA de inserção de selenocisteínas

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	29
1.1 Os complexo macromoleculares	31
1.2 O Selênio	34
1.2.1 A selenocisteína e selenoproteínas	35
1.2.2 A biossíntese do aminoácido selenocisteína	36
1.3 A via de incorporação	38
1.3.1 Em bactérias	38
1.3.2 Em arqueas e eucariotos	40
1.3.3 A enzima Selenocisteína Sintase	42
1.3.4 O tRNA específico	47
1.3.5 A enzima Selenofosfato Sintetase	48
 Capítulo 2 – CONTEXTUALIZAÇÃO	 51
2.1 Selnocisteína Sintase (SelA)	53
2.2 Selenofosfato Sintetase (SelD)	55
 Capítulo 3 – OBJETIVOS	 57
3.1 Objetivos gerais	59
3.1.1 Determinação estequiométrica da ligação SelA e seu ligante específico (tRNA ^{sec})	59
3.1.2 Caracterização estrutural do complexo binário e construção de modelos estruturais teóricos	59
3.1.3 Estudo e compreensão da interação entre SelA-tRNA ^{sec} -SelD	60
3.2 Objetivos específicos	60
 Capítulo 4 – TÉCNICAS E MÉTODOS UTILIZADOS	 63
4.1 Expressão do gene <i>sela</i> de <i>Escherichia coli</i>	65
4.2 Purificação do complexo homodecamérico SelA	66
4.2.1 Lise celular	66
4.2.2 Precipitação seletiva com sais inorgânicos	66
4.2.3 Cromatografia de dessalinização	66
4.2.4 Cromatografias de exclusão molecular	67

4.3 Amplificação do gene do tRNA específico (<i>selC</i>)	67
4.4 Transcrição <i>in vitro</i> e purificação do tRNA ^{sec}	69
4.5 Ensaios de cristalização dos complexos	70
4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	72
4.6.1 <i>Negative stain</i> (NS-EM)	76
4.6.2 Crio microscopia eletrônica (Cryo-EM)	77
4.7 Análise teórica, obtenção de um modelo estrutural	78
4.8 Espectrometria de massa com troca hidrogênio-deutério (HDEx)	79
4.9 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	83
4.10 Microscopia de força atômica	86
4.11 Experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS)	87
4.12 Anisotropia de fluorescência	89
4.13 Microcalorimetria	92
4.13.1 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)	92
4.13.2 Microcalorimetria por varredura diferencial (DSC)	93
4.14 <i>Crosslinking</i> químico	94

Capítulo 5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES **95**

5.1 Determinação estequiométrica da ligação SelA e seu ligante específico (tRNA ^{sec})	97
5.1.1 Expressão e purificação do gene <i>selA</i> de <i>Escherichia coli</i> produzindo a proteína recombinante SelA	97
5.1.2 Amplificação e transcrição do tRNA específico, tRNA ^{sec}	99
5.1.3 Ensaios de cristalização do complexo homodecamérico e seu complexo binário	100
5.1.4 Estudos de microscopia eletrônica de transmissão – <i>Negative stain</i> (NS-EM), determinação da estequiometria por análise de simetria	103
5.2 Caracterização estrutural do complexo binário e construção de modelos estruturais teóricos	108
5.2.1 Análise teórica, criação de um modelo estrutural	108
5.2.2 Mapeamento das regiões de interfaces do complexo SelA e do complexo binário SelA-tRNA ^{sec} por espectrometria de massa com troca hidrogênio-deutério, validação do modelo estrutural	113

5.2.3 Determinação da variação de estruturas na formação do complexo binário através de espectroscopia de infravermelho (FTIR)	120
5.2.4 Caracterização em baixa resolução por microscopia de força atômica (AFM)	122
5.2.5 Análise em solução da existência de complexos supramoleculares por Espalhamento de luz dinâmico (DLS), comprovação das micrografias de NS-EM	127
5.3 Compreensão da interação entre o complexo SelA-tRNA ^{sec} com o dímero funcional do próximo parceiro proteico da via de incorporação de selenocisteínas, a enzima Selenofosfato Sintetase – SelD	129
5.3.1 Análise teórica, precursora nos estudos de interação desse complexo macromolecular	130
5.3.2 Determinação da interação por anisotropia de fluorescência	131
5.3.3 Controle negativo da interação, técnicas de microcalorimetria empregadas para os estudos de complexo	135
5.3.3.1 ITC	135
5.3.3.2 DSC	137
5.3.4 Visualização do complexo por microscopia eletrônica de transmissão – <i>Negative stain</i> (NS-EM), necessidade de <i>crosslinking</i> químico	141
5.3.5 Mapeamento das interfaces de interação e variação das estruturas secundárias na formação do complexo ternário	143
5.3.6 Caracterização em baixa resolução por microscopia de força atômica (AFM)	150
5.3.7 Estudos de complexos por crio microscopia eletrônica	151
Capítulo 6 – CONCLUSÕES OBTIDAS	155
Capítulo 7 – PERSPECTIVAS	159
REFERÊNCIAS	163
ANEXOS	177
Anexo 1 - Resumo dos resultados descritos no Capítulo II – Contextualização	179

1.1 Resultados obtidos no mestrado e doutorado de Alexandre Cassago	179
1.2 Resultados obtidos no doutorado de Lívia Regina Manzine	182
1.3 Resultados obtidos no mestrado de Ivan Rosa e Silva	185
Anexo 2 – Artigos publicados durante o mestrado	187

Capítulo I
INTRODUÇÃO

"Não estimo muito o homem que não é mais sábio hoje do que foi ontem."

Abraham Lincoln

12 de fevereiro de 1809 – 15 de abril de 1865

16º Presidente americano

Neste capítulo serão apresentados os principais tópicos sobre complexos proteicos e sua importância em maquinarias moleculares de interações proteína-proteína e proteína-ácidos nucleicos. Posteriormente, está descrita a maquinaria de incorporação do elemento selênio, com ênfase na via de biossíntese do vigésimo primeiro aminoácido (selenocisteína) em procariotos e uma breve comparação com via bioquímica presente em arqueas e eucariotos. A necessidade de interações específicas entre proteínas para entrega de elementos com elevada toxicidade e mecanismos de reconhecimento, focos desse trabalho, serão apresentados ao longo deste capítulo.

1.1 Os complexos macromoleculares

Complexos macromoleculares são encontrados em células participando de maquinarias responsáveis por executar tarefas essenciais, tais como a conversão energética, comunicação intracelular e tradução do código genético¹. Consistem de vários componentes individuais, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios¹. Atualmente, é conhecido que a maior parte das funções biológicas é originada na interação de diversos constituintes celulares, como um conjunto de maquinarias macromoleculares interligadas e não apenas sistemas isolados², sugerindo um nível organizacional superior ao que era conhecido anteriormente.

Alguns complexos macromoleculares conhecidos auxiliam a regular a expressão gênica através de efeitos sobre o RNA e proteínas envolvidas nesse processo¹, um exemplo disso é o spliceossomo, complexo proteico em associação com ácidos nucleicos. Outro exemplo de atuação de complexos é no controle na entrada e saída de material genético através de membranas, sendo o poro nuclear, uma das maiores maquinarias moleculares. Por fim, o ribossomo, constituído por proteínas e RNA interagentes, tem função essencial na tradução da informação genética [Figura 1].

Figura 1 - Modelos de complexos macromoleculares presentes nas células, como exemplos, pode-se citar o spliceossomo (A), responsável pelo mecanismo de *splicing*, é um complexo heteroproteico, enquanto que o ribossomo (B) é um heterocomplexo de interações entre proteínas e ácidos nucleicos¹.

É cada vez mais evidente que os complexos macromoleculares atuam de maneira regulatória, coordenado dentro de uma hierarquia definida na célula. Cada complexo ocupa uma posição particular na cadeia de eventos, com número de cópias e alguns com posição celular definida, como no caso de poros transmembranas³.

Para uma ampla compreensão dos processos biológicos, faz-se necessário um estudo minucioso de complexos moleculares envolvidos nas diversas vias bioquímicas. A formação de complexos macromoleculares pode envolver unicamente subunidades proteicas ou mesmo apresentar uma montagem com a presença de elementos não proteicos, como ácidos nucleicos, lipídeos ou carboidratos.

Complexos, em que estão presentes somente interações entre proteínas, são responsáveis por inúmeras funções biológicas e são classificados como *homocomplexos*, formados pela mesma subunidade proteica e geralmente com conformação oligomérica permanente, e *heterocomplexos*, constituídos por subunidades proteicas distintas, podendo ter sua conformação oligomérica transiente ou permanente⁴ [Figura 2]. O nível de complexidade desses arranjos tridimensionais com papel singular na vida da célula alcançou status de fundamental importância, demandando esforços de diversos grupos em novas metodologias para compreensão das interações por métodos teóricos, elucidação das estruturas em alta resolução e determinação da cinética de formação dessas estruturas supramoleculares.

Figura 2 - Exemplos de complexos proteicos. (A) homocomplexo dimérico da HIV-protease⁵ e, (B) o homocomplexo dimérico da septina 7 humana⁶. (C) a hemoglobina de *Lumbricus erythrocrutorin*⁷ e, (D) o complexo ATP sintase⁸ são os exemplos de heterocomplexos proteicos.

Outra vertente fundamental nessa compreensão são as interações que envolvem as unidades proteicas e componentes celulares diversos, como os ácidos nucleicos. Pode-se usar como exemplos, a especificidade de interações entre tRNAs e as aminoacil-tRNA sintetases na aminoacilação com o resíduo específico para a síntese de proteínas⁹ e as ribonucleoproteínas (RNPs) que se ligam ao RNA durante a regulação pós-transcricional na expressão gênica¹⁰. Comparado aos complexos formados por estruturas proteicas interagentes, os estados oligoméricos de interações entre RNAs e proteínas possuem um número inferior de estruturas conhecidas, no entanto, vem apresentando um aumento nos esforços para a compreensão desses sistemas¹¹, o que culminou em resultados significativos, produzidos na última década, sobre a função e posicionamento desses complexos¹²⁻¹⁴ [Figura 3].

Figura 3 - Exemplos de proteínas interagente com ácidos nucleicos. (A) A proteína ativadora do catabolismo (CAP) ligada ao DNA formando o complexo CAP-DNA¹⁵. (B) A estrutura da enzima glutamínil-tRNA sintetase em complexo com o tRNA^{glu16}.

A associação entre os diversos componentes celulares indicam a complexidade das diversas maquinarias envolvidas em processos celulares, como por exemplos, a transcrição e a tradução, mostrando-se como uma nova fronteira no entendimento dos processos que ocorrem no ambiente celular. Na síntese proteica, fica evidente a participação de complexos, seja pela conformação oligomérica das enzimas específicas da via ou pela formação de arranjos com interações do tipo proteína-RNAs.

Neste trabalho, os homo e heterocomplexos presentes na via específica de incorporação do aminoácido selenocisteína do organismo *Escherichia coli* serão estudados utilizando distintas técnicas biofísicas e estruturais a fim de colaborar com os estudos da via salientando a importância na formação de complexos permanentes e outros transientes.

1.2 O Selênio

Sua descoberta em 1817 pelo químico sueco Jöns Jakob Berzelius chamou a atenção pela elevada toxicidade. Observou-se sintomas como perda de apetite, paralisias recorrentes e eventual morte de animais consumidores de plantas acumuladoras de selênio (Se)¹⁷⁻²⁰. Em 1856, a primeira evidencia concreta de envenenamento por selênio foi registrada pela morte de cavalos que tiveram sua dieta investigada¹⁸. Quase um século após esse incidente, em 1957

foram divulgadas as primeiras evidências da importância desse elemento à saúde humana.

Atualmente, é conhecido que esse elemento é essencial à nutrição humana e a quantidade recomendada de selênio a ser ingerida é de 55 e 70 µg/dia para adultos do sexo feminino e masculino, respectivamente²¹⁻²². Sua deficiência está associada a condições patológicas diversas, entre elas problemas neurológicos severos o que incluem Alzheimer e Parkinson²³. Uma enfermidade associada ao déficit de selênio em humanos é a *doença de Keshan*, uma cardiomiopatia potencialmente fatal, endêmica na China devido à baixa concentração de selênio encontrada no solo e, conseqüente, baixos níveis do composto encontrados nos vegetais consumidos pela população local²⁴.

Assim como para humanos, compostos de selênio são extremamente tóxicos, ocasionando a morte de diversos organismos em condições de elevada concentração de compostos selenados. Em bactérias, as elevadas concentrações de selênio são extremamente tóxicas e a resistência desses organismos a diferentes metalóides foi amplamente documentada²⁵ o que inclui elementos como arsênio, selênio e telúrio. Para *Escherichia coli*, por exemplo, evidências demonstram que a resistência ao selênio envolve o direcionamento desse elemento comoceptor de elétrons na cadeia respiratória em situações anaeróbicas²⁵ e metabolismos de selenoproteínas²⁶ como as principais medidas de desintoxicação celular, onde a bactéria reduzirá selenito (SeO_3^{2-}) e selenato (SeO_4^{2-}) à selênio elementar (Se^0). Nesta forma o composto é incorporado em proteínas, as selenoproteínas, como os aminoácidos selenocisteína ou selenometionina²⁶.

1.2.1 A selenocisteína e selenoproteínas

O vigésimo primeiro aminoácido, a selenocisteína (Sec ou U), está presente nos três domínios da vida: Bactérias, Arqueas e Eukaria, contido nas selenoproteínas²⁷.

Esse aminoácido é considerado análogo ao aminoácido cisteína (Cys), apresentando um grupo selenol na posição do grupo tiol, ou seja, a estrutura química de Sec é distinta de Cys apenas pela substituição do átomo de enxofre pelo selênio [Figura 4]. No entanto, a estrutura eletrônica do átomo de selênio gera o ânion selenolato, base conjugada de Sec, mais estável do que o correspondente tiolato do resíduo de Cys, implicando na diferença significativa dos valores de pKa de Sec (5,2) inferior à Cys (8,5). Portanto, o aminoácido

selenocisteína encontra-se ionizado em pHs fisiológicos e, conseqüentemente, apresenta maior potencial de redução²⁸⁻³⁰.

Figura 4 - Comparação entre os aminoácidos cisteína e selenocisteína. A diferença está na presença do elemento selênio na posição do enxofre característico da cisteína. Extraído e modificado de³¹.

As selenoproteínas, proteínas que apresentam os aminoácidos selenocisteína ou selenometionina como partes integrantes de sua cadeia polipeptídica, possuem atividades enzimáticas diversas como: peroxidases, glutatona redutases, tioredoxinas, sintetases e algumas hidrogenases, ou seja, em sua grande maioria enzimas de oxi-redução com a presença de Sec em seu sítio ativo³².

1.2.2 A biossíntese do aminoácido selenocisteína

Apesar de ser um processo conservado nos três domínios da vida, existem diferenças notórias no mecanismo de síntese desse aminoácido específico.

Diferente de outros aminoácidos biológicos presentes nas sequências polipeptídicas, a selenocisteína não é codificada como os demais aminoácidos, isto é, pela interpretação direta do código genético³³. A codificação ocorre por um mecanismo denominado recodificação traducional³⁴ e utiliza um códon UGA que, normalmente, é interpretado como códon de parada. A interpretação para inserção de Sec utilizando o códon UGA é possível pela presença de um elemento com estrutura secundária no RNA mensageiro (mRNA) em forma de “grampo de cabelo” (ou *hairpin*) denominado Sequência de Inserção de Selenocisteínas

(*SelenoCysteine Insertion Sequence*), ou SECIS^{35,36}. O elemento SECIS em bactérias encontra-se nas regiões codificantes dos genes às selenoproteínas, posicionado imediatamente após o códon UGA e apresenta estruturação distinta dos demais domínios que apresentam via de inserção de selenocisteínas³⁰. Em arqueas e eucariotos, o elemento SECIS está presente na região 3'-UTR do mRNA dos genes codificantes às selenoproteínas. Observam-se sutis diferenças estruturais³⁷ como, por exemplo, o elemento SECIS de *E. coli* contém pelo menos 40 nucleotídeos que formam uma alça na estrutura do mRNA, contudo, apenas os 17pb na região superior da estrutura de alça são suficientes para permitir a incorporação de Sec. Em eucariotos esses 17pb estão localizados a 11pb do códon UGA. De acordo com as estruturas secundárias altamente conservadas e sequências consenso indispensáveis para a incorporação, classificou-se o SECIS em duas formas baseadas na ausência (Forma I) ou presença (Forma II) de uma alça apical adicional³⁷ [Figura 5].

Figura 5 - Comparação entre as diferenças estruturais do elemento SECIS. (A) SECIS para bactérias (*E. coli*) localizado logo após o códon UGA para Sec. Delimitado pelo retângulo em verde encontra-se a região reconhecida pela proteína SelB a exatamente 11 nucleotídeos do códon UGA. (B) SECIS para arqueas (*M. jannaschii*) localizado na região 3'-UTR a aproximadamente 25 nucleotídeos do códon UGA. (C) e (D) SECIS para eucariotos superiores em que respectivamente é ilustrada a forma I e II. Extraído e modificado de³⁸.

A identificação e compreensão da maquinaria de incorporação de Sec em eucariotos vêm sendo alvo de estudos em diversos grupos de pesquisas, no entanto, ainda não foi completamente elucidado. Para *E. coli*, essa via de biossíntese já é estudada desde meados da década de 80, sendo que significativos avanços nas identificações dos elementos participantes dessa via bioquímica já foram obtidos³⁹.

Análises genéticas prévias permitiram identificar quatro produtos gênicos responsáveis pela incorporação de Sec em selenoproteínas em bactérias, são eles: *sela*, *selB*, *selC* e *selD*³⁹.

As macromoléculas associadas a esses produtos gênicos são, respectivamente, a enzima Selenocisteína Sintase (Sela), o Fator de Elongação Específico para Incorporação de Selenocisteínas (SelB), o tRNA Específico de Inserção de Selenocisteínas (tRNA^{sec}) e a enzima Selenofosfato Sintetase (SelD), além de proteínas envolvidas no processo de tradução dos demais resíduos da célula como a Seril-tRNA Sintetase (SerRS) e o complexo ribossomal.

1.3 A via de incorporação

1.3.1 Em bactérias

A via de biossíntese e incorporação de Sec vêm sendo amplamente estudada nas últimas duas décadas, tendo como organismo-modelo a *E. coli*. As várias etapas da via específica de síntese se iniciam com a adenilação do aminoácido serina à L-serina, com o consumo de ATP, pela enzima Seril-tRNA sintetase (SerRS) e posterior transferência desse resíduo de L-serina ativado para o tRNA^{sec}, resultando em seril-tRNA^{sec} e AMP⁴⁰.

O tRNA carregado com um resíduo de L-serina é então convertido à selenocisteil-tRNA^{sec} pela ação da enzima Selenocisteína Sintase dependente do cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP). Inicialmente, ocorre a formação de uma base de Schiff entre o grupo α -amino do resíduo de serina (Ser) com o grupo formil do PLP, covalentemente ligado à Sela, resultando na desidratação do resíduo e formação de um intermediário, o aminoacrilil-tRNA^{sec}. Posteriormente, o selenofosfato é transferido para a molécula intermediária, o aminoacrilil-tRNA^{sec}, resultando na formação de selenocisteil-tRNA^{sec}.

O selenofosfato é sintetizado pelas enzimas Selenotransferases e Selenocisteína liase que reduzem o selênio a seleneto (Se²⁻)^{39,41} e, por sua vez, é catalisado a selenofosfato (H₂PO₃SeH), com consumo de ATP, pela enzima Selenofosfato Sintetase (SelD)⁴².

O selenocisteil-tRNA^{sec}, é então correado ao sítio A da subunidade 70S do ribossomo pelo fator de alongação para a incorporação de Sec, SelB^{40,43}. Esse fator de alongação se diferencia dos demais presentes em *E. coli* (Fatores de Elongação de Tradução - EF-Tu), uma vez que o fator SELB se liga somente ao selenocisteil-tRNA^{sec}, ou seja, não reconhece nenhum outro tRNA aminoacilado, nem mesmo o seril-tRNA^{sec}, precursor de tRNA específico para selenocisteína⁴⁴. Outra diferença está no fato que SelB é um fator bifuncional,

tendo a capacidade de ligação tanto a selenocisteil-tRNA^{sec} como ao elemento SECIS. De acordo com o mecanismo de ação proposto, SelB carrega uma molécula de GTP formando o complexo SelB-GTP- selenocisteil-tRNA^{sec} que, posteriormente, reconhece e interage com o elemento SECIS presente no mRNA. A hipótese é que a parte inferior do elemento SECIS se desestabilize perdendo sua estrutura, a fim de posicionar o códon UGA dentro do sítio A do ribossomo, enquanto que a parte superior de SECIS permanece ligada a SelB. Simultaneamente, o anticódon do selenocisteil-tRNA^{sec} realiza o pareamento com o códon UGA no interior do sítio A. Após a hidrólise do GTP, ocorre o desprendimento de SelB do tRNA aminoacilado e da estrutura SECIS, fazendo com que dessa forma selenocisteil-tRNA^{sec} se acomode no sítio A do ribossomo e a incorporação do resíduo de selenocisteína à cadeia polipeptídica seja completada^{43,45,46}. A via para bactérias está esquematicamente representada na Figura 6.

Figura 6 - Esquema da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em bactérias. As estruturas utilizadas foram obtidas do banco de dados de estrutura de proteínas e, em sua maioria, resolvidas por cristalografia de raios-X: tRNA^{sec47} (PDB.ID:3A3A), SerRS (PDB.ID: 2DQ3 – em publicação), SelA (resultados prévios desse trabalho), SelD⁴⁸ (PDB.ID: 3U0O) e SelB⁴⁹ (PDB.ID: 2PJP).

1.3.2 Em arqueas e eucariotos

Brevemente, comparando com a mesma via de biossíntese e incorporação em arqueas e em eucariotos, nota-se a maior complexidade comparado à bactérias, por envolver um número maior de proteínas no processo.

Figura 7 - Esquema da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em arqueas. As estruturas utilizadas foram obtidas do banco de dados de estrutura de proteínas e, em sua maioria, resolvidas por cristalografia de raios-X: tRNA^{sec47} (PDB.ID: 3A3A), SerRS (PDB.ID: 2DQ3 – em publicação), PSTK⁵³ (PDB.ID: 3A4L), Seld⁴⁸ (PDB.ID: 3U00) e SepSecS⁵⁴ (PDB.ID: 2Z67).

Em arqueas, o tRNA^{sec} é aminoacilado com um resíduo de L-serina pela SerRS formando o seril-tRNA^{sec}. Posteriormente, esse resíduo é fosforilado pela ação da enzima Fosfoseril-tRNA Quinase (PSTK), formando o complexo fosfoseril-tRNA^{sec50,51}. A conversão desse intermediário em selenocisteil-tRNA^{sec} é realizada pela ação da enzima O-fosfoseril-tRNA^{sec} selenocisteína sintase (SepSecS), uma enzima PLP dependente com mecanismo de ação similar à Sela em Bactérias^{50,51}, conforme demonstrado na Figura 7. O Fator de Elongação responsável pelo reconhecimento ao tRNA específico nesses organismos é o EF-Sec, atuando de maneira semelhante ao SelB em bactérias, no entanto, não é conhecido até o

momento o mecanismo de reconhecimento entre o fator de elongação e o elemento SECIS, permanecendo uma grande dúvida nesse ponto.

Em eucariotos, a via de síntese de selenocisteínas é igual à de arqueas. Entretanto, ocorre o reconhecimento por parte do Fator de Elongação Específico para Sec (mSelB/eEFSec) ao selenocisteil-tRNA^{sec}, no entanto, não há o reconhecimento direto de SelB ao elemento SECIS. A proteína SECIS Binding Protein 2 (SBP2) liga-se ao fragmento de mRNA e identifica o Fator de Elongação carregado com o tRNA específico⁵⁵⁻⁵⁸. Foi demonstrado que a proteína SBP2 estimula a incorporação de Sec *in vivo* e *in vitro*^{55,56,59} através da sua associação com o elemento SECIS e recrutamento do complexo eEFSec-selenocisteil-tRNA^{sec} ao ribossomo⁵⁸. O esquema da via bioquímica em eucariotos representada na Figura 8.

Figura 8 - Esquema da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em eucariotos. As estruturas utilizadas foram obtidas do banco de dados de estrutura de proteínas e, em sua maioria, resolvidas por cristalografia de raios-X: tRNA^{sec60} (PDB.ID:3RG5), SerRS (PDB.ID: 2DQ3 – em publicação), PSTK⁵³ (PDB.ID: 3A4L), SelD⁴⁸ (PDB.ID: 3U0O) e SepSecS⁶¹ (PDB.ID: 3HL2).

1.3.3 A enzima Selenocisteína Sintase

A enzima Selenocisteína Sintase (SelA, E.C. 4.2.1.-) é o produto gênico do gene *sela*³³. Para os vários sistemas bacterianos já estudados, essa macromolécula possui conformação oligomérica de um pentâmero de dímeros, formando um homodecamêro, em *Escherichia coli* onde cada subunidade tem 463 resíduos e massa molecular aproximada de 50,6 kDa^{62,63}. Essa enzima possui dois domínios previsto por ferramentas teóricas, um domínio denominado Domínio SelA (CL0061 – PFAM) com a função descrita L-seril-tRNA selênio transferase (83-452) e o Domínio Sec sintase N-terminal (9-48), o qual está presente unicamente nas moléculas de SelAs bacterianas. Essa enzima é PLP dependente, ou seja, necessita do cofator piridoxal 5'-fosfato ligado covalentemente no resíduo de lisina do sítio catalítico [Figura 9].

Figura 9 - Mecanismo de conversão em *E. coli* de seril-tRNA^{sec} para selenocisteil-tRNA^{sec} pela enzima Selenocisteína Sintase (SelA). Extraído e modificado³⁸.

O mecanismo de conversão Ser-Sec foi proposto pela primeira vez em 1991³³, onde foi postulado um mecanismo de interação entre o tRNA e a unidade monomérica de SelA por meio de interação covalente entre o ácido nucleico carregado e a molécula de PLP ligada no resíduo de K295 da SelA de *E. coli* [Figura 10].

Figura 10-Modelo de entrega do selênio e interação postulada por Böck e colaboradores em 1991. Nesse modelo o PLP permanece covalentemente ligado ao resíduo K295. Na presença do seril-tRNA^{sec}, a reação é passível de ocorrer podendo ter dois resíduos possíveis com a conversão para selenocisteil-tRNA^{sec}: a liberação de piruvato ou a liberação de Ala-tRNA. Extraído de²⁶.

Em termos de conhecimento estrutural, a enzima putativa Sela de *Methanocaldococcus jannaschii* foi determinada utilizando técnicas cristalográficas, no entanto, a conformação dessa molécula sem função biológica, é um dímero, diferindo das demais conformações oligoméricas do domínio bacteriano⁵² [Figura 11]. O alinhamento comparativo das sequências de *E. coli* e de *M. jannaschii* mostra a clara ausência do domínio N-terminal, aspecto esse que é associado a ausência de função biológica observável, e identidade de 30%. Para bactérias, a enzima Sela de *Aquifex aeolicus* teve sua estrutura resolvida, também por cristalografia, à 3,25 Å de resolução [comunicação oral apresentada no tRNA conference – Olmué - 2012] revelando a conformação oligomérica com detalhes das interfaces de interação.

Figura 11-Estrutura cristalográfica da enzima putativa Sela de *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB.ID: 2AEU), evidenciando a conformação oligomérica como um dímero não funcional pela ausência do N-terminal⁵².

Porém, no início dos anos 90, a estrutura tridimensional da enzima SelA não havia sido resolvida. Utilizando resultados de microscopia eletrônica de transmissão, Forchhammer e colaboradores⁶⁴ mostraram que a enzima SelA de *E. coli* apresentava simetria de ordem cinco ao longo de um eixo de orientação e simetrias de ordem dois ao longo do plano perpendicular a esse eixo, constituído pelas cinco subunidades diméricas⁶⁴ [Figura 12]. No entanto, a sutil diferença nas dimensões da molécula não é perceptível pelas imagens apresentadas no manuscrito.

Figura 12-Imagens de projeção da enzima Selenocisteína Sintase (SelA) de *E. coli* obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão utilizando preparo com *negative stain* (recobrimento com acetato de uranila). Em A, visão superior (*top view*) da partícula isolada de SelA, evidenciando o eixo de ordem cinco ao longo desse eixo de orientação. Em B, visão lateral (*side view*), ilustrando uma subunidade dimérica e o eixo de ordem dois no plano perpendicular ao eixo de mais alta simetria. Em C e D, visão superior e lateral, respectivamente, do complexo binário SelA interagindo ao intermediário aminoacrilil-tRNA^{sec}. Extraído de⁶⁴.

Paralelamente, estudos de cromatografia de permeação em gel⁶⁵ corroboram as análises de microscopia eletrônica⁶⁴ utilizando “*scanning transmission electron microscopy mass determination*” revelaram que a enzima SelA complexada com seu ligante tRNA^{sec} não carregado, possui uma razão estequiométrica de uma molécula de SelA para cinco moléculas de tRNA^{sec}, ou seja, razão de 2SelA_{monômero}:1tRNA^{sec}⁶⁴[Figura 13]. Além disso, o número de moléculas de tRNA^{sec} na célula é reduzido, cerca de 250, e a presença do decâmero de SelA é aproximadamente 150 unidade/célula em *E. coli*, atribuindo-se a isso um mecanismo que deve ser extremamente eficiente para a utilização desses raros componentes celulares⁶⁶.

Figura 13-Imagens de projeção da enzima Selenocisteína Sintase (SesA) de *E. coli*. As análises de conservação de densidade eletrônica feitas em amostras com concentração crescentes de aminoacrilil-tRNA^{sec} e foi realizado a média do total de partículas para essa análise, determinando uma estequiometria de cinco tRNAs ligados a uma molécula de SesA, ou seja, uma razão molar de 2:1. Extraído de⁶⁴.

Em 2007⁶⁷, análises semelhantes foram realizadas para corroborar os eixos de simetria da molécula. Preparo com contraste negativo (*negative stain*) e utilizando TEM evidenciaram o eixo de ordem cinco com os eixos de ordem dois no plano perpendicular através de análises das auto-imagens (*eigenimagens*), isto é, determinação de modos espaciais usando decomposição do dado original em valores singulares, semelhante à determinação de uma base em álgebra linear. É uma operação de decomposição de um objeto original em séries de vetores ortogonais que representem uma característica do conjunto de dados, como simetrias, por exemplo, geradas pelo conjunto de dados⁶⁷ [Figura 14].

Figura 14-Análise estatística multivariada. (A) Conjunto de dados de SslA com preparo em *negative stain*. (B) *Eigenimages* evidenciando os quatro eixos de maior importância, os eixos de ordem cinco e os eixos de dois no plano perpendicular, evidenciado pela representação da *eigenimages* 3 e 4 com simetrias de ordem 10. Conclui-se que a molécula possui simetria D5. Extraído de⁶⁷.

Nesse mesmo trabalho, demonstrou-se que o preparo utilizando gelo vítreo foi possível, permitindo a visualização das partículas [Figura 15] e a caracterização da molécula em baixa resolução. No entanto, com precisão suficiente nas dimensões globais da macromolécula [Figura 16] para mostrar um complexo com 19 nm de dimensão máxima e 6,5 nm na menor dimensão do complexo⁶⁷.

Figura 15-Micrografias obtidas por preparo em gelo vítreo. Os círculos vermelhos evidenciam a orientação lateral (*side view*), os círculos brancos as partículas em vista superior (*top view*) e os círculos alaranjados evidenciam as partículas que estão oblíquas ao feixe de elétrons. Extraído de⁶⁷.

No entanto, não houve outros estudos da interação proteína-RNA entre SslA e tRNA^{sec} *in vitro* e, até este momento, não se apresentavam hipóteses para a chegada da molécula de selenofosfato até o complexo binário SslA- tRNA^{sec} para que ocorra a conversão Ser-Sec.

Figura 16- Caracterização da partícula de SelA. (A) As *classsums* obtidas no conjunto de dados. (B) A caracterização evidenciando as dimensões da partícula em sua conformação na ausência de seu ligante natural. Extraído de⁶⁷.

1.3.4 O tRNA específico

O tRNA específico denominado tRNA^{sec} (tRNA específico para inserção de selenocisteínas) é o produto gênico do gene *selC*. Diferente de outros tRNAs de *E. coli*, esse possui diferenças substanciais, como um braço variável extenso com 22 ribonucleotídeos, além de ser o mais longo da espécie, com 95 ribonucleotídeos⁶⁸. Para eucariotos e arqueas o número de ribonucleotídeos é de aproximadamente 90, com 9 pares de bases (pb) no braço aceptor, além da presença do nucleotídeo modificado 5-metilaminometil-2-selenouridina (mnm5Se2U) no anticódon do tRNA^{sec69}.

A estrutura secundária de tRNAs canônicos em *E. coli* possui 7 pares de bases no braço aceptor, 3 ou 4 pares de bases no D-loop, 5 pares de bases no braço do anticódon e 5 pares de bases no braço TψC. O braço do anticódon e o braço TψC, contêm 7 ribonucleotídeos despareados enquanto o D-loop usualmente tem entre 8 e 10. Em contraste, a sequência primária do tRNA^{sec} varia em relação aos tRNAs canônicos nas posições 8 e 14, que são conservadas em outros tRNAs mas, no tRNA^{sec} são ocupadas por ribonucleotídeos distintos. O aceptor é estendido em 1 par de base e o D-loop possui 6 bases pareadas, o que resulta na redução do número de bases despareadas para 4. O comprimento do braço variável divide os tRNAs em duas classes: tRNAs pertencentes a classe I possui um braço variável pequeno com 4 ou 5 ribonucleotídeos, enquanto os tRNAs pertencentes a classe II apresentam uma região variável contendo um número total de ribonucleotídeos variando entre 10 e 24.

Utilizando essa definição, o tRNA^{sec} é classificado como um tRNA de classe II⁷⁰.

Figura 17-Comparação entre as estruturas secundárias dos tRNAs Sec de *E. coli* (A) e de eucarioto (B). O braço aceitador e o braço TψC estão destacados em vermelho. Extraído e modificado de³⁸.

Embora as sequências sejam relativamente diferentes, comparações podem ser feitas entre o tRNA^{sec} de procariotos e eucariotos em relação às suas estruturas secundárias. O comprimento coaxial do braço TψC juntamente com o aceitador possui 13 pb e ambos apresentam 6 pb no D-loop, diferente dos 3 ou 4 presentes nos tRNAs canônicos^{68,71-74}. Porém, o aceitador e o braço TψC do tRNA^{sec} de eucariotos é formado, respectivamente, por 9 pb e 4 pb, enquanto que em procariotos essas mesmas regiões são formadas por um dobramento do tipo 8 pb e 5 pb, respectivamente^{71,73} [Figura 17].

1.3.5 A enzima Selenofosfato Sintetase

A enzima Selenofosfato Sintetase (SelD ou SPS, E.C. 2.7.9.3) é responsável pela conversão de selênio para forma biologicamente ativa, selenofosfato, doador de selênio na reação de conversão Ser-Sec realizada pela enzima SelA. O gene *seld* de *E. coli* codifica para uma proteína de 347 aminoácidos com massa molecular de 36,7 kDa. Estudos prévios em *Aquifex aeolicus* e *E. coli*, utilizando uma construção cujo domínio N-terminal foi truncado, revelaram uma proteína dimérica que teve sua estrutura cristalográfica resolvida^{75,48}, revelando as regiões essenciais de interação dos dímeros, no entanto, em ambos os casos, a cisteína localizada na posição 17 presente no domínio N-terminal truncado, essencial para a

função catalítica da enzima⁷⁶, estava ausente nas estruturas resolvidas [Figura 18].

Figura 18 - Estrutura cristalográfica da enzima dimérica SelD de *E. coli* (PDB.ID: 3U00)⁴⁸.

Devido a elevada toxicidade do selênio no ambiente celular, na forma de seleneto, provavelmente exista uma cadeia de eventos prévios à utilização dessa molécula pela SelD, uma vez que o K_m (constante de Michaelis-Menten) para seleneto é de aproximadamente 7,3 μM , valor que ultrapassa o limiar de toxicidade celular para *E. coli* e outras bactérias⁷⁶. A enzima selenocisteína liase deve prover o seleneto necessário para a reação por meio da via de degradação de selenocisteínas livres ou pela presença de outras formas de selênio presentes na célula⁷⁷.

De maneira análoga, as proteínas *Nifs-like* em bactérias são responsáveis pela captura de selênio e enxofre sob diferentes formas, a fim de minimizar os níveis de toxicidade. Utilizando análises de interação molecular, postulou-se a interação entre uma proteína da classe *Nifs-like* com a SelD, tornando mais eficiente a entrega de seleneto e evitando a toxicidade para a célula⁷⁸.

Wang e colaboradores⁷⁸ hipotetizaram que a interação entre SelD e SelA facilita a transferência do selenofosfato, semelhante ao que ocorre entre as proteínas *Nifs-like* e SelD na entrega de seleneto. Este processo sequencial é razoável imaginando que a síntese de Sec deve ser extremamente eficiente, evitando a difusão de compostos reativos de selênio. Notavelmente, a enzima SepSecS, em humanos, foi relatada como possivelmente interagindo com a SPS1, enzima paróloga à SelD em eucariotos. Entretanto, pouco se conhece sobre esse possível mecanismo de interação. Embora este processo sequencial seja fundamental para manter a célula sob níveis não tóxicos de selênio, ainda não houve comunicações a respeito da possível interação entre SelA e SelD em sistemas bacterianos⁷⁸.

Este trabalho, em colaboração com o aluno de mestrado Ivan Rosa e Silva (IFSC-USP) e outros colaboradores, vem caracterizar a enzima SelA, que é um complexo macromolecular protéico, utilizando metodologias teóricas de modelagem molecular e a construção do modelo tridimensional do complexo homodecamérico. Análises de microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica foram utilizadas para corroborar os resultados observados anteriormente⁶⁴ em relação à morfologia do complexo, assim como análises de espalhamento de luz dinâmico estão de acordo com as conformações supramoleculares da amostra. A fim de comprovar os modelos gerados, experimentos de troca hidrogênio-deutério acoplado à espectrometria de massas mapearam as regiões de interfaces e experimentos de espectroscopia de infravermelho foram necessários para determinar as percentagens de estruturas secundárias em solução, corroborando com os resultados obtidos anteriormente por nosso grupo através da técnica de dicroísmo circular.

Posteriormente, as análises de formação dos complexos proteína-RNA, SelA-tRNA^{sec}, e medidas de interação para a formação do complexo ternário SelA-tRNA^{sec}-SelD foram realizadas utilizando anisotropia de fluorescência, possibilitando a determinação da razão estequiométrica para ambos os complexos formados. Utilizando os resultados de microscopia eletrônica de transmissão e analisando os dados com a metodologia denominada MSA (*Multivariate Statistic Analysis*) foi possível corroborar com os resultados estequiométricos para o complexo binário SelA-tRNA^{sec}. O complexo ternário foi caracterizado por técnicas microcalorimétricas e demais abordagens listadas acima, a fim de determinar possíveis regiões de interação, mudanças conformacionais em solução e medidas estruturais de baixa resolução, possibilitando a construção de um modelo de interação favorecendo a compreensão do sistema, além de contribuir para o conhecimento sobre complexos macromoleculares protéicos e complexos proteínas-RNAs.

Capítulo II:
CONTEXTUALIZAÇÃO

*"Criatividade e padronização não são mutuamente excludentes,
ao contrário, são mutuamente complementares."*

Yoshio Kondo

1910 – 1990

Biólogo

A via de incorporação do aminoácido selenocisteína em *Escherichia coli* tem sido alvo de estudos no grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos – USP há muito anos. Comandado pelo Professor Doutor Otavio Henrique Thiemann, vários alunos já trouxeram contribuições fundamentais para que a compreensão dessa via chegasse ao ponto que estamos atualmente.

A fim de esclarecer as contribuições dos alunos desse grupo com o passar dos anos e contextualizar as condições nas quais esse projeto se iniciou, foi criado esse capítulo. Ele será dividido pela contribuição de cada aluno ao trabalho com a enzima Selenocisteína Sintase (SelA) e sua interação com o tRNA específico (tRNA^{sec}) e os resultados com o primeiro parceiro protéico na via, a enzima Selenofosfato Sintetase (SelD).

2.1 Selenocisteína Sintase (SelA)

A enzima Selenocisteína Sintase passou a ser estudada por nosso grupo em 2004 pelo, então aluno de mestrado, Alexandre Cassago sob orientação do Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann. Seu projeto consistia na obtenção e caracterização da conformação nativa da enzima que, até aquele momento, era descrita na literatura como um homodecâmero funcional com ligação a cinco tRNAs específicos e mecanismo catalítico dependente de PLP.

A padronização dos protocolos de amplificação do fragmento gênico de 1392 pb por PCR correspondente ao gene *selA*, as clonagens nos vetores pET28a e pET29a, ensaios de expressão no sistema *E.coli* BL21(λDE3) bem como protocolo de purificação foram obtidos com êxito. Os primeiros estudos de caracterização estrutural por modelo de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) foram obtidos, revelando a conformação oligomérica condizente com a literatura⁷⁹.

Durante o doutoramento do aluno, cujo trabalho era a obtenção de modelos estruturais de alta resolução para a compreensão da interação com o ligante tRNA^{sec}, foram realizados inúmeros ensaios de cristalização pela metodologia de troca de vapor em gota suspensa, obtendo cristais protéicos. No entanto, nenhum desses cristais apresentou um padrão de difração suficiente para o processamento em alta resolução⁷⁹.

Devido ao tamanho do complexo determinado pelos experimentos de SAXS e previamente conhecido na literatura, surgiu então à ideia de utilizar a metodologia de crio

microscopia eletrônica, ou seja, microscopia de transmissão eletrônica de alta resolução para solucionar o modelo estrutural. Em colaboração com o Prof. Dr. Marin van Heel (Imperial College London – Inglaterra), amostras de SelA foram enviadas para o preparo de grades e sua coleta de dados. No entanto, ao realizar o preparo das grades, notou-se uma elevada poli dispersividade da amostra, existindo moléculas com presença e ausência do que se acreditava ser o tRNA^{sec}. Isso levantou a hipótese de que a amostra estaria sendo purificada com tRNA endógenos, uma vez que é uma enzima de *Escherichia coli* sendo expressa nesse mesmo organismo. Além disso, outra questão surgiu, aparentemente eram observadas dez regiões de maior contraste de densidade eletrônica nas imagens de microscopia, além de apresentar eixos de simetria não permitidos pela assimetria do tRNA na proporção 1:5, ou seja, contrariando a razão estequiométrica postulada na literatura.

Ensaio de co-cristalização de SelA com excesso de tRNA, além de ensaios de proteólise *in situ*, foram realizados, no entanto, sem êxito. Com o propósito de obtenção de alguma informação estrutural, foram gerados modelos teóricos de acoplamento estatístico e por modelagem molecular de homologia para obtenção de um modelo tridimensional passível de ser ajustado dentro dos modelos de baixa resolução obtidos. Além disso, análises de SAXS na presença do tRNA também foram foco do estudo durante seu doutoramento⁸⁰.

Com base nas hipóteses levantadas pela análise de crio microscopia eletrônica, foi elaborado outro projeto de doutorado para a aluna Lívia Regina Manzine, em que seu trabalho consistia na obtenção da razão estequiométrica de interação entre SelA-tRNA^{sec} em solução³⁸.

Foi necessário inicialmente, a retirada do tRNA endógeno proveniente do sistema de expressão. Utilizando uma linhagem bacteriana (WL81460), deficiente no gene codificante *selC*, cedida pelo Prof. August Böck (*Universität München*), foi possível a expressão e purificação da SelA sem a presença do ácido nucleico endógeno (tRNA^{sec})^{38,81}.

Uma nova metodologia de purificação foi adotada, permitindo rendimento cinco vezes maior que o protocolo anterior. Com isso, foi possível a caracterização da macromolécula SelA por diferentes técnicas biofísicas e bioquímicas, como determinação do pI, caracterização de porcentagens de estruturas secundárias por dicroísmo circular e seu comportamento mediante a variação térmica.

Através de estudos de anisotropia de fluorescência utilizando diferentes marcadores, foi possível a constatação de parâmetros de interação com o tRNA^{sec}. Utilizando como sonda específica a fluoresceína covalentemente ligada, as amostras de SelA (resíduos de lisinas) e depois, tRNA^{sec} (posição 3') foram marcadas e submetidas às análises, determinando assim uma razão estequiométrica de 1SelA:10tRNA^{sec}, ou em termos de monômeros,

1SelA monômero:tRNA^{sec}, corroborando com as hipóteses levantadas com as análises de microscopia e contrapondo os dados literários³⁸.

Além disso, mapeou-se as regiões do tRNA fundamentais para a interação com a proteína SelA, utilizando mutantes cujas principais regiões da estrutura secundária do tRNA^{sec} foram deletadas. Paralelamente, analisou-se o comportamento da enzima em função da concentração em solução. Estes se apresentaram de maneira curiosa, observando um aumento do valor de anisotropia em função da concentração. Determinou-se como o complexo é montado e observou-se a formação de estruturas supramoleculares. Estes dados foram posteriormente confirmados com os resultados de *crosslinking* químico e análise de espalhamento de luz dinâmico (DLS)^{38,81}.

2.2 Selenofosfato Sintetase (SelD)

Durante seu projeto de mestrado, o aluno Ivan Rosa e Silva realizou estudos sobre a caracterização bioquímica e estrutural da enzima Selenofosfato Sintetase (SelD) de *Escherichia coli*, necessária para a entrega de selenofosfato para a enzima SelA na via de biossíntese de selenocisteínas.

A amplificação e clonagem do gene *selD*, expressão e purificação da proteína recombinante foram estabelecidas. A caracterização biofísica utilizou técnicas como espalhamento de luz dinâmico (DLS) e ultracentrifugação analítica (AUC), além de análises teóricas para obtenção de modelos por homologia e compreensão de interfaces de interação e dimerização. Os resultados de caracterização estrutural foram obtidos através da técnica de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)⁸².

Em colaboração, realizamos ensaios de interação entre o complexo binário SelA-tRNA^{sec} com a enzima SelD através de análises de anisotropia de fluorescência, utilizando como sonda a fluoresceína ligada covalentemente à posição 3' do tRNA específico, sendo possível determinar a interação, constante de ligação e a estequiometria de formação do complexo ternário SelA-tRNA^{sec}-SelD. As interfaces de contato entre o complexo decamérico e SelD foram mapeadas através da metodologia de espectrometria de massa com troca hidrogênio-deutério, bem como a validação das interfaces de dimerização e análise de flexibilidade do dímero de SelD em solução⁸².

Esse foi o retrospecto das atividades já realizadas pelo nosso grupo de pesquisa envolvendo as enzimas da via de incorporação de selenocisteínas em *Escherichia coli*. Neste trabalho apresento os resultados mais recentes obtidos a cerca dos estudos envolvendo a interação entre SelA-tRNA^{sec} e formação do complexo ternário SelA-tRNA^{sec}-SelD.

*Capítulo III**OBJETIVOS*

*"Se você está procurando uma grande oportunidade,
descubra um grande problema."*

Martinho Lutero

10 de novembro de 1483 – 18 de fevereiro de 1546

Sacerdote e Teólogo

3.1 Objetivos gerais

3.1.1 Determinação estequiométrica da ligação Sela e seu ligante específico (tRNA^{sec}).

Os resultados estequiométricos obtidos pela Dra. Livia Manzine vão à contraposição aos resultados postulados na literatura a mais de 20 anos, obtidos pela metodologia de microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy* – TEM) utilizando contraste negativo (*negative stain* – NS-EM). A fim de confirmar a razão estequiométrica, a mesma metodologia de 1992⁶⁴ foi empregada, no entanto, acoplada a análise estatística multivariada (*multivariate statistical analysis* - MSA) revelando a simetria das partículas analisadas. Com base nesses resultados, foi possível inferir a relação entre Sela e o tRNA^{sec} no complexo binário.

3.1.2 Caracterização estrutural do complexo binário e construção de modelos estruturais teóricos.

Não havendo modelos estruturais de alta resolução até o momento, tentativas de cristalização foram realizadas, além da obtenção de um modelo tridimensional através de modelagem por homologia acoplada a diferentes técnicas, o que revelou características importantes do complexo. O ajuste do modelo construído na densidade de crio microscopia eletrônica (*cryo electron microscopy* - Cryo-EM) obtida nas primeiras tentativas em 2008, juntamente com análises de espectrometria de massas com troca hidrogênio-deutério (*hydrogen-deuterium exchange* - HDEx), elucidaram as regiões de interação entre as moléculas na formação do complexo homodecamérico e na formação do complexo binário interagente com o tRNA.

Análises de microscopia de força atômica (*atomic force microscopy* - AFM) e microscopia eletrônica de transmissão com *negative stain* foram utilizadas para a caracterização estrutural em baixa resolução. Análises de espectroscopia de infravermelho (*Fourier transform infrared* - FTIR) contribuíram com a compreensão das mudanças

conformacionais das moléculas em solução e após a formação do complexo SelA-tRNA^{sec}.

3.1.3 Estudo e compreensão da interação entre SelA-tRNA^{sec}-SelD.

Como o seleneto é altamente tóxico à célula, a hipótese, já existente⁷⁸, de entrega da forma reativa (selenofosfato) diretamente com a interação entre SelA e SelD foi discutida em conjunto com o aluno Ivan Rosa e Silva. Inicialmente, ensaios teóricos usando programas de interação entre proteína-proteína foram os precursores na análise da possível interação, apontando para possíveis regiões de contato entre os complexos. Para verificação, experimentos de anisotropia de fluorescência (*fluorescence anisotropy* - FAS), microcalorimétricas, como: calorimetria de titulação isotérmica (*isothermal titration calorimetry* – ITC) e calorimetria de varredura diferencial (*differential scanning calorimetry* - DSC), microscopias de força atômica e transmissão eletrônica foram utilizadas para a caracterização da ligação e obtenção de informações estruturais. Além disso, análises de espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas com mapeamento com troca hidrogênio-deutério, foram utilizadas para mapear e corroborar com os ensaios de interação para a formação do complexo ternário SelA-tRNA^{sec}-SelD.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios de cristalização e tentativas de difração com as duas possibilidades de complexos;
- Realizar o preparo de grades em condições de contraste negativo para microscopia eletrônica de transmissão (NS-EM). Com esse conjunto de dados, realizar análise de partícula única atrelada à análise estatística multivariada com o propósito de determinar a estequiometria do complexo binário;
- Construir um modelo teórico, através de ferramentas de bioinformática, dos complexos homodecamérico e binário, com o auxílio da densidade de crio obtida previamente;
- Analisar a veracidade das interfaces de contato através da metodologia HDEx;

- Comprovar a movimentação das estruturas secundárias em solução por FTIR e verificar a alteração na morfologia das macromoléculas através de AFM e DLS;
- Analisar a interação e formação do complexo ternário utilizando anisotropia de fluorescência e comprovar a necessidade da presença do tRNA^{sec} por técnicas microcalorimétricas, como ITC e DSC;
- Verificar alterações morfológicas, estruturais em solução e as interfaces de contato pelas técnicas já mencionadas. Construir um modelo de interação para o complexo SelA-tRNA^{sec}-SelD;
- Realizar ensaios iniciais para coleta de dados com preparo criogênico, em microscópio de alta resolução.

Capítulo IV
TÉCNICAS E METODOS UTILIZADOS

"Pense como homem de ação e aja como homem pensador."

Henri Louis Bergson

18 de outubro – 4 de janeiro de 1941

Filósofo

O objetivo desse capítulo é o esclarecimento simples e objetivo das técnicas e metodologias utilizadas no decorrer deste projeto de mestrado, bem como breves discussões teóricas dos conceitos fundamentais inerentes a cada técnica empregada.

O clone utilizado neste projeto de mestrado possui o inserto do gene *selA* em um vetor híbrido, com marca seletiva alterada para ampicilina através da combinação entre os vetores comerciais pET29a(+) e pETDuet-1, denominada pET29_{modificado}, e transformado na cepa bacteriana *E.coli* WL81460 (λ DE3), deficiente na expressão do gene *selC* responsável pela produção do tRNA específico interagente à proteína SelA, com resistência para o antibiótico canamicina, doado e tendo seus protocolos estabelecidos pela Dra. Livia R. Manzine durante seu doutoramento³⁸.

Todos os experimentos a cerca da interação com a enzima SelD foram realizados em colaboração com o aluno Ivan Rosa e Silva⁸². Este projeto também contou com a colaboração vários pesquisadores de diferentes centros, que estão mencionados em cada sub-tópico deste capítulo, denotando suas importantes contribuições e auxílios no *desing* experimental, realização das medidas e ajuda no tratamento e interpretação dos dados a fim de obter uma resposta biológica plausível.

4.1 Expressão do gene *selA* de *Escherichia coli*

O protocolo de expressão, previamente estabelecido pela Dra. Livia Manzine, consiste no preparo de inóculos de 5 ml de meio LB, contendo Kanamicina (30 μ g/ml) e ampicilina (25 μ g/ml), onde uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) isolada era incubada durante a noite sob agitação de 100 rpm à 37° C. Após aproximadamente 16 horas, era transferida para um inóculo maior na proporção 1:100 em volume, mantendo-se sob agitação de 200 rpm à 37° C por aproximadamente 3 horas, até atingir densidade óptica (D.O._{600nm}) de 1,0. Nesse momento foi adicionado 0,1 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) para indução da proteína recombinante no sistema de expressão utilizado. Manteve-se a mesma agitação e temperatura por 2 horas. As células centrifugadas a 4500 rpm por 45 min à 4° C. As células eram então congeladas para posterior utilização.

4.2 Purificação do complexo homodecamérico SclA

4.2.1 Lise celular

O preparo do extrato protéico iniciou-se com a adição do tampão de lise contendo 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5 na proporção de 3 ml para cada grama de sedimento seco. Como a SclA é uma enzima PLP-dependente, adicionou-se PLP na concentração de 10 μ M ao tampão utilizado para ressuspender às células bacterianas. Em seguida, adicionou-se lisozima (10 μ g/ml) e incubou-se em gelo por 30 minutos. O próximo passo de lise foi feito com pulsos de ultrassom de 20 segundos de duração com intervalos de 45 segundos durante cerca de 5 minutos, em volume máximo de 10 ml. O lisado foi submetido à centrifugação a 9000 rpm por 60 minutos à 4° C, obtendo-se o extrato protéico.

4.2.2 Precipitação seletiva com sais inorgânicos

O extrato protéico foi colocado em um béquer em banho de gelo e mantido sob agitação constante de aproximadamente 60 rpm. Adicionou-se lentamente sulfato de amônio ((NH₃)₂SO₄) macerado, que promove a precipitação seletiva de proteínas, até atingir concentração máxima de 25% (m/v) de (NH₃)₂SO₄ por volume de extrato protéico, permanecendo por 15 minutos sob agitação branda. O próximo passo consiste em nova centrifugação nas mesmas condições da realizada anteriormente.

4.2.3 Cromatografia de dessalinização

O precipitado proteico foi ressuspenso no mesmo tampão utilizado na lise celular e aplicado na coluna *HiTrap Desalting* (GE), previamente equilibrada com tampão de lise e acoplada em sistema de cromatografia líquida (AKTA – GE) monitorando o comprimento de onda de 280 nm e a condutividade da amostra. Esse procedimento é necessário para a retirada

do sal inorgânico utilizado no passo de fracionamento por precipitação. Às frações obtidas da amostra, adicionou-se 20% (m/v) de Nycodenz® preparado em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5. Esse composto orgânico está relacionado à preservação da forma e conformação oligomérica em técnicas de ultracentrifugação de células e complexos macromoleculares em análises de sedimentação⁸³. Após 30 minutos de incubação em gelo, a amostra foi submetida à centrifugação em concentrador Amicon, com corte de 50 kDa, a 3100 rpm até atingir, aproximadamente, volume final de 2 ml.

4.2.4 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra concentrada foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex* 200 HL (16/60) (GE) refrigerada à aproximadamente 10° C e previamente equilibrada com 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5, em fluxo de 1 mL/min. As frações foram coletadas e submetidas à eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) para verificação da presença da proteína recombinante de interesse. Ao final, adicionou-se volume necessário para uma concentração de 10% de glicerol as alíquotas de SelA recombinante.

4.3 Amplificação do gene do tRNA específico (*selC*)

O gene do tRNA Específico de Inserção de Selenocisteína (*selC*) do organismo *Escherichia coli* foi amplificado através de PCR a partir dos oligonucleotídeos, comercialmente sintetizados, representados abaixo:

SELC-1

5'ACGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGATCGTCGTCTCCGGTGAGGCGGCTGGACTTCAAATCCAGTTG 3'

SELC-2

5'TGGCGGAAGATCACAGGAGTCGAACCTGCCCCGGGACCGCTGGCGGCCCAACTGGATTGAAGTCCAG 3'

A amplificação do DNA molde, para a posterior transcrição, deu-se pelo protocolo

apresentado na Tabela 1 e pelos ciclos apresentados na Figura 19.

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 ₂ [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

Figura 19-Ciclo de PCR utilizado, em termociclador, para a amplificação do DNA molde do *selC* de *E. coli*.

O resultado da reação foi submetido à purificação através de eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio 1X 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). A quantificação do rendimento foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) no modo DNA50 utilizando, como referência da medida, água deionizada.

4.4 Transcrição *in vitro* e purificação do tRNA^{sec}

Com o resultado da reação de amplificação do gene *selC*, deu-se continuidade à obtenção do tRNA^{sec} com a utilização do kit comercial Megashortscript T7 (Ambion).

O valor X de volume para o DNA molde foi determinado como sendo a quantidade, em µl, necessária para obter 250 ng de DNA. Após a adição dos reagentes, 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^{sec} de *Escherichia coli*.

Reagentes	Volume (µl)
Tampão [10 X]	2
ATP	2
CTP	2
GTP	2
UTP	2
DNA molde	X
Enzima Mix	2
Água livre de RNAses q.s.p.	20

O próximo passo é a purificação do resultado do processo de transcrição. Adicionou-se 1 µl de DNase Turbo, 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 µl de fenol e homogeneização utilizando um vórtex por 30 segundos, seguida por posterior centrifugação à 10000 rpm por 5 minutos e temperatura ambiente. Repetiu-se o procedimento análogo com o clorofórmio.

Para precipitação do RNA presente, adicionou-se 2,5 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M pH 4,7 RNase_{free}, e incubou-se o material durante a noite em freezer.

Posteriormente, centrifugou-se a 13200 rpm por 45 minutos à 4° C e adicionou-se etanol 70% previamente gelado. O produto foi centrifugado e o sedimento seco foi ressuspenso em 50 µl água livre de RNase e incubou-se a 40° C até completa dissolução. Enovelou-se o

tRNA em banho térmico a 80° C com decréscimo contínuo da temperatura até 35° C sendo necessário adicionar a concentração final de 20 mM de cloreto de magnésio livre de RNAses. A quantificação do rendimento foi realizada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) no modo RNA40 utilizando, como referência da medida, água livre de RNAses.

4.5 Ensaios de cristalização dos complexos

Com o intuito de obter um modelo estrutural de biomoléculas, uma das técnicas que fornece maior informação e precisão com relação à posição atômica é a difração de raios-X a partir de um monocristal proteico⁸⁴. Entretanto a cristalização de proteínas é um processo que envolve múltiplos parâmetros divididos em três passos canônicos: nucleação, crescimento e estabilização do crescimento. Nesse percurso até a cristalização é necessário cautela quanto à cinética da troca gasosa nas soluções proteicas, devendo-se evitar que durante o processo de diminuição da solubilidade da amostra, esta não precipite ao invés de cristalizar, e dessa forma, deve-se preferir processos em que redução da solubilidade ocorra de forma lenta⁸⁵, semelhante ao esquema ilustrativo da Figura 20.

Figura 20-Gráfico ilustrativo do processo de cristalização de uma biomolécula em função de um dos parâmetros (concentração do agente precipitante) dentro os inúmeros possíveis. Extraído e modificado de⁸⁵.

A estabilidade das macromoléculas biológicas em solução está baseada nas competições entre as interações solvente-soluto e as interações intramoleculares, que podem ser modificadas através dos seguintes parâmetros: temperatura, capaz de alterar a desordem das moléculas de solvente; pH, alterando as concentrações de H^+ e OH^- , isto é, alterar a protonação e desprotonação dos grupos presentes na superfícies das macromoléculas; sais, podem atuar na força iônica das moléculas; competidores de ligações de hidrogênio, em altas concentrações competem com as ligações de hidrogênio da água e ligações de hidrogênio das macromoléculas; aditivos hidrofóbicos, capazes de interagir diretamente com regiões hidrofóbicas das macromoléculas ou alterar as características do solvente; solventes orgânicos, modificam a constante dielétrica do meio onde se encontra a amostra biológica⁸⁵.

Figura 21-Metodologia de difusão de vapor. À esquerda, mecanismo ilustrativo usando método *sitting drop*, ou gota sentada, mostrando a variação do tamanho da gota e, conseqüentemente, aumentando a concentração das moléculas ali presentes. À direita, ilustrações distinguindo os métodos de gota sentada e gota suspensa, no entanto, o processo físico-químico permanece o mesmo. Extraído e modificado de⁸⁵.

Muitas são as técnicas utilizadas na cristalização de macromoléculas, sendo o mais frequente, as técnicas de difusão de vapor, em que a solução proteica fica suspensa em uma lamínula (*hanging drop*) ou repousada sobre um poço (*sitting drop*), representadas na Figura 21. Nesse método uma pequena gota, 2-10 μl de proteína é misturada com um volume similar de solução de cristalização e colocada, de forma vedada do meio externo, num recipiente contendo 500-1000 μl de solução de cristalização. Essa solução é comumente formada por

tampão, sal e um agente precipitante. A diferença entre a concentração de soluto entre a gota e o reservatório de solução cristalizante direciona esse sistema, devido à diferença de potencial químico, até atingir um equilíbrio de concentrações entre a gota e a solução do reservatório, através da difusão da fase de vapor da solução menos concentrada, a gota, para a mais concentrada, o reservatório. Esse equilíbrio varia de algumas horas até vários dias ou meses dependendo da constituição da solução do reservatório e das características físico-químicas da molécula em análise⁸⁵.

Os ensaios de cristalização partiram de uma triagem inicial utilizando o sistema automatizado HoneyBee 963 (DigiLab) com o kits de cristalização SALT RX e INDEX HT (Hampton Research) utilizando micro gotas de 0.7 µl de amostra e mesmo volume de solução do poço em placas de 96 ensaios simultâneos no método de *sitting drop*.

A proteína SelA e os diferentes complexos testados, SelA-tRNA^{sec} e SelA-tRNA^{sec}-SelD, encontravam-se a uma concentração entre 5 e 10 mg/ml dependendo do kit em teste. As condições promissoras, cuja presença de cristais e pontos de nucleação, foram repetidas, em maior escala, utilizando caixas de 24 ensaios no método *hanging drop*. Os melhores cristais foram selecionados e congelados utilizando 20% de glicerol ou 20% de etilenoglicol como crio protetores. Cerca de 120 cristais foram testados em quatro turnos nas linhas de luz I04 e I24 na “**Diamond Light Source**”, localizada em Didcot-Inglaterra.

4.6 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As obtenções de modelos estruturais são comumente atribuídas às estruturas cristalográficas e por ressonância magnética nuclear, no entanto, essas técnicas apresentam limitações importantes em relação à elevada concentração da amostra, necessidade de cristalizabilidade e tamanho da amostra. Atualmente, técnicas de microscopia eletrônica de transmissão vêm sendo amplamente empregadas para análises de macromoléculas biológicas em caráter estrutural, possibilitando a obtenção de modelo estrutural com faixa de resolução razoável, dentro de alguns aspectos. Obviamente que essa metodologia também apresenta limitações tais como tamanho da amostra e necessidade de minimização de alguns componentes dos tampões, por exemplo.

Na TEM, um feixe de elétrons é produzido e focalizado na amostra. Assim como um conjunto de lentes em um microscópio óptico possibilita a focalização do feixe na amostra,

bobinas produzem campos magnéticos para colimar o feixe de elétrons sobre a área de análise. A passagem do feixe através da amostra produz uma imagem de projeção em um anteparo, que pode ser uma tela fosforescente e aquisição em filme fotográfico, ou mesmo uma câmera CCD e aquisição digital⁸⁶.

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v} \text{ logo, } \lambda = \frac{12.3}{\sqrt{\Phi}} \text{ \AA} \quad (1)$$

Onde na Equação 1, λ é o comprimento de onda de *de Broglie* para o elétron, m_e sua massa de repouso v sua velocidade e Φ a tensão a qual é submetida, nesse caso operando à 200 kV, ou seja, λ de $\sim 0.03 \text{ \AA}$.

A análise de amostras biológicas provê imagens formadas através do contraste de fase. O elétron, apesar de ser tratado como uma partícula no aspecto da física clássica, o elétron pode ser considerado como uma onda eletrônica pelo princípio da dualidade⁸⁶. Essa onda sofre deslocamento de fase em função da interação com a partícula biológica em análise, ocasionando interações destrutivas e construtivas no plano da imagem formada. A Figura 22 ilustra os componentes básicos de um microscópio eletrônico e mostra um exemplo de imagem de transmissão bidimensional que não reflete diretamente o objeto tridimensional que a gerou.

Figura 22-Esquemas representativos sobre microscopia eletrônica. (A) Representação de um microscópio eletrônico com seu sistema magneto-óptico. (B) Exemplo de modelo de imagem de transmissão, a imagem observada no anteparo não revela, em sua totalidade, o objeto que a gerou. Extraído e modificado de⁸⁷.

Apesar de ser um sistema magneto-óptico, não é inerte a efeitos como aberrações esféricas ou aberração da onda, inerentes ao sistema de lentes magnéticas e ao feixe formado

no microscópio, que necessitam ser corrigidos através de funções matemáticas sobre os dados coletados.

Uma vez coletados, o processamento das imagens consiste em um ciclo de eventos que se diferenciam, em alguns aspectos, dentre os dois tipo de metodologia de preparo de amostra: *negative stain* (NS-EM) ou gelo vítreo (Cryo-EM), bem como utilizando o pacote IMAGIC 4D⁸⁸.

Para os conjuntos de dados de NS-EM coletados no LNNano durante esse projeto, realizou-se como etapas de pré-processamento o corte das imagens de 4k x 4k coletadas em *patches* de 1024 x 1024 com sobreposição de aproximadamente 20% dentre as imagens nas regiões de corte. Para amostras de crio microscopia é necessário realizar a correção da função de transferência de contraste (CTF) para inversão das fases das imagens obtidas. Nessa etapa, é utilizado um filtro do tipo passa-banda para baixas e altas frequências, com valores representados nas Equações 2 e 3. As imagens também são normalizadas. O valor 3,9 apresentado é característico do tamanho do pixel utilizado nas coletas realizadas no LNNano durante esses experimentos.

$$Cut - off_{Lowfreq.}(\text{\AA}) = \frac{\left[2 \cdot 3,9 \left(\frac{\text{\AA}}{pixel} \right) \right]}{[Tamanho_da_partícula(\text{\AA})]} \quad (2)$$

e,

$$Cut - off_{Highfreq.}(\text{\AA}) = \frac{\left[2 \cdot 3,9 \left(\frac{\text{\AA}}{pixel} \right) \right]}{[Resolução_esperada(\text{\AA})]} \quad (3)$$

Como a relação sinal-ruído é baixa, é necessário selecionar as partículas de interesse dentre as inúmeras obtidas na coleta e somar imagens semelhantes com o propósito de aumentar essa relação. Inicialmente, um processo de escolha por *picking* é realizado, onde a partícula de interesse é marcada indicando ao programa que outras semelhantes a essa sejam coletadas. Após isso, é necessário que as imagens estejam alinhadas, para isso, são divididas em classes, nas quais partículas com mesma orientação são agrupadas e, quando somadas às imagens das mesmas classes, são denominadas *classsums*.

Em seguida, a análise estatística multivariada (MSA), uma especificidade da análise de componentes principais (*principal components analysis* - PCA), é utilizada para classificar

imagens semelhantes⁸⁹. A partir das classes resultantes desse processo, faz-se um alinhamento multi referência (MRA), que permite um alinhamento translacional e rotacional utilizando um conjunto referência. Esses procedimentos são realizados de maneira iterativa e em vários ciclos, sempre podendo retornar ao passo anterior para melhoria do conjunto de análise.

No procedimento de MSA, as imagens são consideradas como combinação linear de imagens com maior representatividade, chamadas *auto-imagens* ou *eigenimages*, sendo denotados como os “eixos” nos quais as outras imagens serão representadas como combinação linear dessas⁸⁹.

O próximo passo consiste na atribuição angular para as diferentes orientações obtidas, nesse momento do processamento, os ângulos de *Euler* das imagens de projeção definirão sua orientação espacial através de relações angulares entre as imagens escolhidas⁸⁹. Baseado nessa reconstituição é possível obter um modelo estrutural tridimensional. Esse por sua vez, deverá ser validado de modo a sofrer reprojeção bidimensional, o que favorecerá novas atribuições angulares e novos conjuntos de referência para outros ciclos de MSA e MRA, até a obtenção de um modelo confiável com a resolução máxima para a molécula em estudo.

Figura 23-Esquema da sequência de eventos da coleta e processamento de experimentos de microscopia eletrônica de transmissão. Os passos são interativos e apresentam uma sequência previamente definida. Extraído e modificado de⁸⁹.

4.6.1 Negative stain (NS-EM)

A metodologia de contraste negativo consiste no preparo da grade com deposição de um sal metálico sobre a amostra, o que favorece a diferença de contraste entre a amostra (ausência de cobertura) e o *background* observado. Para essa metodologia de preparo, não é necessária a correção do CTF, uma vez que o contraste do sal metálico é suficiente para determinação das baixas frequências (espaço recíproco, ou, espaço de *Fourier*), logo, permite que as partículas sejam reconhecidas facilmente, no entanto, com o contrabalanço de perdas excessivas das altas frequências, o que não permite a obtenção de modelos de alta resolução a partir de dados coletados utilizando esse tipo de preparo de amostra.

Em colaboração com os Drs. Rodrigo Villares Portugal e Jefferson Bettini, ambos do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPq), o preparo das amostras de SelA e SelA-tRNA^{sec} foram realizadas utilizando concentração protéica de 0,5 mg/ml (aproximadamente 10 μ M), e razão estequiométrica de 1SelA_{monômero}:1,2tRNA^{sec} em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5. O complexo binário foi previamente incubado por 30 minutos a 25° C. As grades de carbono foram submetidas ao processo de descarga negativa luminescente durante 25 segundos e 15 mA no equipamento easiGlow (Pelco). Uma gota de 3 μ l da amostra foi aplicada na grade e mantida por 30 segundos para interação, seguida de dois passos de lavagem utilizando tampão HEPES 10 mM pH 7,5. O recobrimento foi realizado com 3 μ l de acetato de uranila 2% durante 30 segundos, seguido de secagem ao ar. As imagens foram coletadas utilizando defocus de -3 μ m e x60,000 de magnificação em um microscópio Jeol JEM -2100 operando à 200 kV e foram gravadas em filme fotográfico Kodak SO-163 e, posteriormente digitalizadas em um scanner ArtixScan F1 (Microtek).

O processamento foi realizado utilizando o pacote IMAGIC 4D^{88,89}, onde um total de 7582 partículas foram selecionadas, filtradas, normalizadas e centradas utilizando as metodologias de processamento. O conjunto de dados gerados possuía 7388 partículas na orientação de vista superior (*top view*) e 194 partículas em vista lateral (*side view*). Os resultados foram classificados em 700 classes usando somente as 3 primeiras *eigenimages* do conjunto de “*top views*”. As análises das *classsums* e *eigenimages* obtidas foram fundamentais para a determinação da razão estequiométrica do complexo SelA-tRNA^{sec}, bem como a confirmação da morfologia da molécula semelhante aos dados da literatura^{64,67}.

Para as análises do complexo ternário, a amostra após passar pelos protocolos de *crosslinking* e exclusão molecular (ver tópico 4.14) foi preparada de maneira análoga ao

apresentado acima, com exceção dos passos de lavagem, pois já se encontrara em tampão Tris 20 mM pH 7,5. Não foi possível a realização de uma coleta de dados, somente a visualização desse complexo.

4.6.2 Crio microscopia eletrônica (Cryo-EM)

A padronização inicial dos parâmetros de preparo das grades de Cryo-EM foram realizadas no LNNano-CNPEM e, a fim de obter modelos estruturais de alta resolução para os complexos de estudo, realizou-se experimentos de crio microscopia eletrônica em colaboração com o Prof. Dr. Marin van Heel e o Dr. Sacha de Carlo no *Netherlands Center of Nanoscopy* (NeCEN) associado à *Universiteit Leiden*, Holanda. Utilizando um microscópio Titan Krios 2 (FEI), as amostras dos complexos Sela e Sela-tRNA^{sec}-SelD foram preparadas em grades (C-flat) com 25 segundos de descarga negativa luminescente e aplicada 4 µl de amostra a uma concentração de 0,7 mg/ml em tampão Tris 20 mM pH 7,5. Para o preparo das grades, foi utilizado o sistema Vitrobot (FEI) de congelamento crio com os seguintes parâmetros previamente estabelecidos no LNNano: temperatura 22° C, umidade 98%, tempo de secagem em papel filtro 2,5 segundos e força de contato 1 u.a. As grades foram imersas rapidamente em etano líquido resfriado por nitrogênio líquido. Foram preparadas 6 grades do complexo Sela e 5 grades do complexo ternário. A coleta foi realizada de maneira automatizada no microscópio pelas plataformas Atlas e EPU (FEI) no microscópio Titan Krios (FEI) operando a 300 kV com defocus diferentes e tamanho de pixel na faixa de 0,822 Å/pixel, resultando em aproximadamente 1TB de dados coletados para dois complexos diferentes. Os pré-processamentos foram iniciados no cluster localizado no *Imperial College London*, Inglaterra. A coleta de dados do complexo Sela-tRNA^{sec} foi iniciada recentemente como continuidade desse projeto.

O comparativo entre os preparos de amostras em NS-EM e Cryo-Em estão representados na Figura 24.

Figura 24-(A) Esquema apresentando a sequência de eventos no preparo de amostras para microscopia eletrônica de transmissão utilizando *Negative Stain* e congelamento em gelo vítreo. Extraído e modificado de⁹⁰. (B) Comparação dos preparos de amostras evidenciando diferenças entre as duas metodologias utilizadas. Extraído e modificado de⁸⁶. (C) Comparativo entre uma partícula em meio ao sal metálico e em gelo vítreo. Extraído e modificado de⁹⁰.

4.7 Análise teórica, obtenção de um modelo estrutural

Na impossibilidade de obtenção de um modelo estrutural até esse momento do projeto, viu-se a necessidade da construção de um modelo teórico utilizando modelagem por diferentes técnicas.

Com base na sequência de aminoácidos presentes no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para a sequência da enzima Sela de *E. coli* (#gb: AAA24624.1) foram realizadas metodologias de modelagem por homologia, que consiste na utilização de estruturas cristalográficas como molde para determinação do enovelamento da sequência desejada, de modo a obter um modelo de mínima energia. Utilizou-se a plataforma

MODELLER 9.0⁹¹ para a determinação de um modelo estrutural para o monômero de SelA utilizando como moldes a estrutura da enzima putativa Selenocisteína Sintase de *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB ID 2AEU), a única homóloga resolvida por difração de raios-X. O melhor modelo obtido foi validado⁸⁰ utilizando os servidores MOLPROBITY e PROCHECK.

Análises utilizando os programas contidos no servidor ZHANG LAB⁹² foram utilizadas, corroborando os resultados disponíveis na literatura.

A construção do modelo decamérico foi possível com a utilização da plataforma *online* SymmDock⁹³ em conjunto com o programa CHIMERA 1.5.3⁹⁴, onde os modelos foram ajustados dentro da densidade do modelo estrutural obtido por crio microscopia eletrônica em 2008⁹⁵ em colaboração com o Prof. Marin van Heel. O refinamento do modelo foi realizado de modo a minimizar regiões de sobreposição e a energia do complexo. Em paralelo, foram realizados ciclos de processamento utilizando os servidores *online* PatchDock⁹⁶ e ClusPro 2.0⁹⁷, que realizam interações do tipo proteína – proteína. Com o modelo decamérico de SelA foi possível propor um modelo estrutural dos complexos binário, SelA-tRNA^{sec}, e ternário, SelA-tRNA^{sec}-SelD.

Além disso, em colaboração com o Prof. Dr. Lucas Bleicher da Universidade Federal de Minas Gerais, foram propostas análises de correlação entre resíduos presentes em dois domínios da proteína SelA, um domínio maior denominado SelA (PF 03841, L-seril-tRNA selênio transferase) entre os resíduos 83 à 451, cujos resultados iniciais foram obtidos pelo Dr. Alexandre Cassago durante seu doutoramento⁸⁰. O mesmo procedimento foi empregado para o domínio N-terminal (PF 12390, N-terminal de Selenocisteína Sintase) compreendido entre os resíduos 9 ao 48. A modelagem por homologia juntamente com a modelagem por ambiente químico associado ao método *Ab-initio* (utilizando o servidor I-TASSER, ZHANG LAB⁹²) revelam uma sequência de três α -hélices, que apresentam função relevante mediante as análises teóricas associadas aos resultados experimentais. Essas análises teóricas colaboraram intrinsecamente com os desenhos experimentais utilizados no decorrer desse projeto.

4.8 Espectrometria de massas com troca hidrogênio deutério (HDEx)

A dinâmica de uma proteína em solução não é algo trivial de ser analisada, ainda mais

com a interação com ligantes específicos ou mesmo outras proteínas. A maneira com que essas moléculas se movimentam está intimamente correlacionada com sua função biológica e dinâmica de interação⁹⁸. Uma possibilidade de monitoramento desses movimentos em solução, e a determinação de regiões de interação entre o complexo ligante-receptor é a troca isotrópica dos hidrogênios das amidas da cadeia principal exposta ao solvente por deutério (Troca H/D) acoplada com a espectrometria de massas (MS). A combinação dessas metodologias permite a compreensão da movimentação da macromolécula em solução e, determinação de regiões de interface de complexos homo oligoméricos e complexos supramoleculares. Mesmo na ausência de um modelo estrutural de alta resolução, é possível obter características das interfaces de interação, flexibilidade dos complexos e mecanismo de interação [Figura 25].

As análises com essa metodologia foram obtidas em colaboração com o Prof. Dr. Mário Sérgio Palma e o Dr. Daniel Menezes Saidemberg, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP – Rio Claro e em conjunto com o aluno Ivan Rosa e Silva.

As etapas básicas consistem em, primeiramente, submeter à macromolécula a troca H/D com a diluição da amostra concentrada (estoque ~10 mg/ml) em óxido de deutério com concentração final de aproximadamente 75% de deutério e 1 mg/ml das amostras a serem analisadas, mantendo o pH em 6,8, ideal para incorporação de deutério nas amidas da cadeia principal. Foram empregados diferentes tempos de incorporação de deutério de acordo com o complexo analisado (Sela: 5, 10, 15 e 30 minutos – Sela-tRNA^{sec}: 10 e 30 minutos – Sela-tRNA^{sec}-SelD: 30 minutos de troca H/D). Para cada ponto de análise, foi retirada uma alíquota de 70 µl de amostra e imediatamente adicionada a 60 µl de tampão 20 mM de fosfato de sódio pH 2,5 com ácido perclórico adicionado. Esse procedimento é recomendado para minimizar o tempo de destroca, uma vez que a amostra não se encontra em ambiente totalmente saturante em deutério. Posteriormente, utilizou-se da pepsina para realização da proteólise antes da injeção no equipamento de análise dos peptídeos resultantes.

Também foram realizadas análises com as amostras sem o procedimento de troca H/D, utilizando-as como referências dos peptídeos obtidos, tornando possível a determinação da taxa de incorporação de deutério para cada respectivo peptíde, considerando tanto o número absoluto de deutérios como em percentual relativos às possibilidades de incorporação.

Figura 25-(A) Modelo ilustrando a incorporação de deutério nas amidas das regiões expostas ao solvente e a visualização após a proteólise. (B) Peptídeo ilustrando os átomos que o compõe, em destaque em amarelo, os hidrogênios amídicos da cadeia principal passíveis de sofrerem a troca por deutério. (C) e (D) Gráfico evidenciando o melhor processo de incorporação quando a amostra está sujeita a pH 2,5 e baixas temperaturas, respectivamente. Modificado e extraído de^{99,100}.

Para as análises no espectrômetro de massas, é necessária a digestão aleatória da amostra utilizando uma protease, no caso, pepsina. Empregou-se a proporção de 1/10 protease em relação à concentração molar de amostra e a reação foi incubada por 5 minutos a 0° C. A realização desses procedimentos à baixa temperatura e pH minimizam os efeitos de destroca, embora não afeta a atividade da pepsina.

Por fim, as amostras eram injetadas em espectrômetro de massas triplo quadrupolo Quattro II (Micromass – Altrincham) por meio de uma fonte de eletrospray (ESI). Os peptídeos ionizáveis foram separados de acordo com a relação carga/massa (z/m) no analisador do equipamento.

Foram obtidos os seguintes espectros:

- 1) Amostra intacta, ou seja, não submetida à troca H/D nem a clivagem com pepsina. O processo de deconvolução do espectro revela a presença de informações com relação à constituição oligomérica da amostra. Procedimento realizado pelo software do equipamento MaxEnt Electrospray (Masslynx 3.2), para as amostras Sela e SelD⁸², separadamente;
- 2) Amostra digerida sem troca H/D para a observação dos picos iniciais e suas relações carga/massa. Utilizando o software MS-Digest¹⁰¹, foi possível a modelagem teórica da clivagem utilizando a pepsina, confirmada pelo assinalamento dos peptídeos realmente observados experimentalmente, procedimento realizado para os três complexos em

análise;

- 3) Amostra digerida com troca H/D em diferentes tempos de incorporação, para observação do deslocamento dos picos e comparativo com o assinalamento junto aos espectros do tipo 2, determinando assim, a taxa de incorporação de deutério.

Para os espectros dos tipos 2 e 3, foram necessárias as subtrações dos espectros de auto-clivagem da pepsina e do tRNA^{sec}, esse último por possuir característica distinta no processo de ionização.

Cada deutério incorporado resulta no aumento da massa, deslocando os picos encontrados no comparativo com os picos não submetidos à troca H/D. Com isso, os deslocamentos dos picos em valores referentes a números inteiros de massa identificam a quantidade de deutérios incorporados. Pelo assinalamento da sequência realizado de maneira prévia e digestão teórica, é possível determinar os percentuais de incorporação. O número de posições trocadas é relacionado pela Equação 4.

$$N_h = N_{Lp} + H_{pep} - N_{pro} \quad (4)$$

Onde, N_h é o número total de hidrogênios trocados por deutério, N_{Lp} é o número de ligações peptídicas de cada peptídeo obtido, H_{pep} é o hidrogênio do N-terminal de cada peptídeo e N_{pro} é o número de prolinas de cada peptídeo¹⁰².

Conhecendo a sequência proteica, pode-se montar um mapa de taxas de incorporação em função do tempo, mostrando as regiões de elevada flexibilidade na molécula e, com modelos teóricos provindos da modelagem molecular, é possível a identificação no modelo tridimensional o que pode indicar interfaces da montagem dos complexos, regiões de interação inter e intramoleculares [Figura 26], contribuindo para elucidar a formação dos complexos, SelA, SelA-tRNA^{sec} e SelA-tRNA^{sec}-SelD.

Figura 26-(A) Esquema metodológico para o experimento com variação temporal, analisando as regiões de elevada flexibilidade da molécula em solução. (B) Esquema utilizado para determinação de regiões de interface entre proteínas na formação de complexos. Extraído e modificado de ^{99,100}.

4.9 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

As proteínas são constituídas de aminoácidos ligados através de ligações covalentes denominadas ligações peptídicas, sendo diferenciada em cadeia principal e cadeias laterais. Um polipeptídeo constitui-se de uma sequência específica de grupos químicos em sua cadeia principal, ou *backbone*, sendo eles um grupo amídico, um carbono- α , onde se encontra ligado o grupo R (cadeia lateral, o que diferencia cada aminoácido) e um grupo ácido carboxílico. Além disso, as proteínas se distinguem pela maneira com que se enovelam, estando intrinsecamente relacionada à sua função¹⁰³. No enovelamento nativo que cada molécula proteica se encontra, uma característica é a interação de hidrogênio formada pelas amidas presentes no *backbone* com moléculas de água do meio em que se encontra, denominadas, moléculas de água estruturais.

Ao se estudar proteínas, técnicas como cristalografia, ressonância magnética nuclear e microscopia eletrônica são fortes ferramentas para obtenção de um modelo conformacional tridimensional de alta resolução.

Ao contrário dessas técnicas, a metodologia de espectroscopia de infravermelho acoplada à transformada de *Fourier* (FTIR) fornece informações sobre o conteúdo de

estruturas secundárias das amostras proteicas. Essa técnica consiste na absorção de radiação na região espectral do infravermelho, uma vez que cada grupamento químico possui uma banda de absorção característica. Para peptídeos, são presentes as bandas de absorção denominadas Amida I e Amida II, provenientes das ligações amida entre os aminoácidos¹⁰³. A absorção associada à banda da Amida I é decorrente do alongamento vibracional da ligação C=O e a banda da Amida II é relacionada com a flexão vibracional da ligação N-H. Ambas as ligações são intrinsecamente correlacionadas com estruturas secundárias tais como voltas, hélices e folhas, constituintes da proteína¹⁰³. Importante ressaltar que os valores das bandas das Amidas I e II, região entre 1600-1700 cm⁻¹, estão localizados no espectro, distante de outras bandas, como alguns componentes do tampão e mesmo RNAs e DNAs.

Como essa região do espectro de FTIR pode sofrer influência dos modos vibracionais da água, as amostras são diluídas até cerca de 1 mg/ml, em óxido de deutério em alta concentração, aproximadamente 90%. A Figura 27 denota os modos vibracionais passíveis de serem medidos e as características dos espectros medidos: Bandas das Amidas I e II, e pós-processados.

Figura 27-Modos vibracionais das Amidas I e II, regiões de estiramento das ligações C=O e N-H das presentes nas ligações peptídicas. (B) Bandas de absorção das Amidas I e II em função do número de onda da radiação incidente. O processamento a partir das bandas observadas revelam características fundamentais com relação aos percentuais de estruturação secundária presente nas amostras. Extraído e modificado de¹⁰³.

Com o intuito de determinar possíveis variações de estruturas secundárias das proteínas constituintes dos complexos de estudo desse trabalho, sem que haja interferência do tRNA, foram realizadas as medidas dos espectros de FTIR de modo a colaborar com informações de percentuais de estruturas secundárias previamente obtidas por CD^{38,82} e a variação de estruturação utilizando a metodologia de espectro de diferença.

Os experimentos foram realizados no Departamento de Física da UNESP – São José do Rio Preto, em colaboração com o Prof. Dr. Marinônio Cornélio e os alunos Ícaro Caruso e

Ivan Rosa e Silva. Utilizando o equipamento 670 FTIR spectrometer (Nicolet Nexus) equipado com um detector DTGS KBr foram coletados 512 *scans* com resolução de 2 cm^{-1} numa varredura de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ à 25° C .

As amostras SelA e tRNA^{sec} foram diluídas em 90% de D₂O para uma concentração de 1 mg/ml. Os complexos, SelA-tRNA^{sec} e SelA-tRNA^{sec}-SelD foram previamente incubados em razão equimolar à 25° C antes de serem diluídos e postos à medidas. Os espectros foram adquiridos em solução, aplicando 50 μl em placas de KBr termoeestáveis.

Para o processamento dos dados, foi utilizado o programa Origin 8.0, de maneira que para a determinação do percentual de estruturas secundárias das amostras SelA e SelD, as análises consistiram em isolar as bandas das Amidas I e II (região entre $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) e aplicar o operador matemático derivada de segunda ordem, determinando os máximos de picos em regiões com estruturas secundárias conhecidas e previamente tabeladas, Tabela 3. O pico resultante da segunda derivada é então deconvoluído utilizando ajuste de curvas gaussianas nesse intervalo descrito. Para os complexos, SelA-tRNA^{sec} e SelA-tRNA^{sec}-SelD, foi utilizado a metodologia de espectro de diferença, que consiste na subtração dos espectros medidos das amostras SelA e SelD, de modo que:

- 1) SelA-tRNA^{sec} subtraído de SelA, revela a variação de estruturas secundárias de SelA após a interação do tRNA^{sec};
- 2) SelA-tRNA^{sec}-SelD subtraído de SelA-tRNA^{sec}, revela como SelD se encontra no complexo ternário (SelD_{complexo});
- 3) SelD_{complexo} subtraído de SelD, revela qual a variação de SelD após a interação com o complexo SelA-tRNA^{sec}.

Com isso, foi possível a validação de valores de estruturas secundárias para SelA e SelD bem como a determinação relativa de mudanças estruturais para a formação dos complexos binário e ternário.

Tabela 3 - Modos vibracionais com os valores de frequências para cada tipo de estrutura secundária presente nas estruturas proteicas.

Modo Vibracional		Hidrogênios na conformação ligada		Hidrogênios na conformação não ligada
		α -hélice	Folhas- β	Frequência (cm^{-1})
		Frequência (cm^{-1})	Frequência (cm^{-1})	
Amida I (C=O)	$\leftarrow\text{C}=\text{O}\rightarrow$	1650-1660	1630	1680-1700
Amida II	$\leftarrow\text{C}-\text{N}\uparrow\text{H}\rightarrow$	1540-1550	1520-1525	<1520

4.10 Microscopia de força atômica (AFM)

Na ciência dos materiais, a caracterização da morfologia de superfície é fundamental para a compreensão de seu funcionamento e de sua composição. Para as ciências biológicas não é diferente, no entanto, a aplicabilidade em biologia estrutural é um desafio por se tratar de escalas nanométricas à escala atômica¹⁰⁴. Para uma caracterização estrutural de alta resolução existem técnicas estruturais como cristalografia, ressonância magnética nuclear e mesmo crio microscopia eletrônica. Mas, alguns complexos macromoleculares têm suas dimensões na ordem de materiais nanométricos, sendo possível a utilização de outras abordagens, como a microscopia de força atômica (AFM).

Essa técnica consiste na varredura da superfície utilizando uma agulha, que pode ser de diferentes tamanhos, de modo a determinar a topologia da amostra em análise. A análise da superfície de uma biomolécula pode trazer informações relevantes como suas dimensões, polidispersividade e mesmo comparativo quando existem diversos complexos envolvidos, como mostrado na Figura 28 e como no caso desse estudo.

Figura 28- (A) Esquema de medida utilizando o “modo contato” de um AFM. A amostra não chega a ser tocada, uma vez que amostras biológicas poderiam aderir à ponta ou mesmo serem danificadas. É observada, simultaneamente, a diferença de fase, proveniente da interferência medida pelo fotodiodo e a “força” do toque sobre a amostra, determinando assim a topologia das partículas na amostra. (B) Exemplos de aplicações de AFM em amostras biológicas, em cima, um complexo proteico interagente à DNA e abaixo, análise de polidispersividade da amostra por diferenças conformacionais. Extraído e modificado de¹⁰⁵.

Para essa análise, as amostras SelA, SelA-tRNA^{sec} e SelA-tRNA^{sec}-SelD foram aplicadas sobre uma superfície de mica clivada de 100 mm² de área a uma concentração de 0,5 mg/ml. Como para a análise é necessário que a amostra esteja seca, as grades preparadas foram colocadas em alto vácuo por 4 horas a 4° C. Análises prévias foram realizadas juntamente ao Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva do Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Instituto de Física de São Carlos – USP utilizando o equipamento AFM - NanoScope III (Digital Instruments) e uma agulha de silício com diâmetro de 50 nm com coleta utilizando “modo contato”, varredura de 256 à 512 linhas. Os resultados foram analisados no software do próprio microscópio, NanoScope III (Digital Instruments).

Para minimização dos efeitos de histerese provenientes do tamanho da agulha, medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEN). O equipamento utilizado foi idêntico, no entanto, foram utilizadas agulhas de silício com 5 e 1 nm de diâmetro. O preparo das grades se deu de maneira análoga às medidas anteriores, cuja concentração era de aproximadamente 0,5 mg/ml de proteínas e razão equimolar entre SelA e tRNA^{sec} previamente incubados à 25° C e razão equimolar entre SelA e SelD para as análises do complexo ternário. As análises dos dados foram realizadas no programa n-Surf 1.0 beta (N-surf) e as médias calculadas à partir da média simples das dimensões medidas pelo número total de partículas.

4.11 Experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Espalhamento de luz dinâmico ou *dynamic light scattering* (DLS) é uma técnica importante para o campo da cristalografia de proteínas sendo usada para determinação de medidas hidrodinâmicas, polidispersividade e agregação das moléculas, sendo parâmetros essenciais para a cristalizabilidade das biomoléculas. Também conhecido como espalhamento quase elástico de luz ou espectroscopia de fóton correlacionado, mede o espalhamento de luz a partir das macromoléculas ou partículas suspensas em solução. Devido ao movimento browniano das partículas em solução, as flutuações na intensidade do espalhamento podem ser observadas ao longo do tempo. Monitorando em períodos muito curtos, a frequência de flutuações depende da rapidez com que as moléculas se movem por difusão [Figura 29], permitindo a determinação da massa molecular e raio de giro a partir da função de correlação

do coeficiente de difusão (D)¹⁰³, Equação 5.

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot R_0} \quad (5)$$

Onde, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra durante a medida, η_0 é a viscosidade da solução e R_0 o raio hidrodinâmico da partícula em solução.

Ainda, valores de polidispersividade e massa média para cada população dentro da amostra podem ser estimados utilizando a função de correlação e distribuição estatística das populações contidas na amostra.

Nesse experimento, o objetivo era a avaliação do estado oligomérico da amostra Sela e do complexo Sela-tRNA^{sec} em solução para corroborar com os dados de microscopia eletrônica obtidos e de anisotropia de fluorescência da Dra. Livia Manzine. Para as medidas foi utilizado o espectrofotômetro Zetasizer UV (Malvern) do Laboratório de Biofísica Molecular “Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas” (IFSC – USP).

Para a amostra Sela as medidas foram realizadas em concentrações variadas de 1 à 12 μM de maneira sequencial no tampão de purificação. Foram registrados 16 *scans* em duplicata durante 8 minutos a 25° C, com tempo de incubação de 120 segundos no equipamento em cubeta de quartzo (caminho óptico 1,5 mm para volume de 12 μl) antes do início das medidas. Para o complexo binário, a análise foi realizada na concentração de 5 μM de Sela na razão estequiométrica de 1Sela_{monômeros}:1,2tRNA^{sec}. O número de *scans* foi aumentado para 25 em duplicata mantendo a temperatura e utilização da mesma cubeta em mesmo tampão de purificação da amostra.

Figura 29-(A) Esquema de funcionamento do DLS, sinal de resposta mediante ao tamanho das partículas em solução. (B) Caracterização das amostras por DLS, condições de dispersividade em solução capaz de determinar o bom funcionamento de outras técnicas biofísicas e estruturais¹⁰³.

4.12 Anisotropia de fluorescência

Estudos de interações entre biomoléculas são essenciais para a compreensão plena dos mecanismos cinéticos, bioquímicos e entendimento do funcionamento das vias metabólicas. Dentre as técnicas apontadas para o estudo de interações entre proteínas ou ácidos nucleicos, as que fazem uso de medidas espectrofotométricas são as que trazem contribuições mais relevantes, em solução, para formação de complexos macromoleculares. A metodologia de anisotropia de fluorescência é amplamente utilizada para estudos de interações entre biomoléculas^{38,106}. A técnica baseia-se na diferença de absorção e emissão de fótons no sistema de coordenadas de um fluoróforo utilizado.

Para uma solução homogênea, os fluoróforos ali presentes possuem uma orientação arbitrária e aleatória. Ao serem expostos à luz polarizada, as moléculas fluorescentes que possuem mesma a orientação de absorção que a polarização da radiação incidente, são excitadas, diferenciando-se da população dentre as demais que estão em outras orientações¹⁰⁷. As medidas de anisotropia elucidam o deslocamento angular médio do vetor de absorção e de emissão do fóton excitado no fluoróforo. No entanto, a emissão pode ser despolarizada por influência da difusão rotacional, evento esse dependente da viscosidade da solução, do tamanho e forma da partícula, e do tempo de vida desse estado excitado no qual se encontra a molécula fluorescente. A Figura 30 mostra o esquema experimental das medidas de anisotropia de fluorescência utilizando uma sonda específica.

Figura 30-(A) Esquema geral do desenho experimental com o posicionamento dos polarizadores e configuração comumente utilizada em L. (B) Modelo esquemático da polarização da luz e consequências pela influência do tamanho das partículas em solução, semelhante ao nosso modelo experimental. Extraído e modificado de¹⁰⁷.

Em suma, o experimento consiste na observância na diferença de polarização, em direções perpendiculares, dos fluoróforos presentes em solução. Essa diferença recebe o nome de anisotropia de fluorescência. No caso de uma molécula pequena, a população estará estatisticamente distribuída, não havendo diferença significativa nos valores observados em ambas as direções de observação. Por outro lado, havendo uma heterogeneidade na distribuição da população, essa diferença se torna significativa, resultado em um valor de anisotropia diferente de zero.

$$r = \frac{[I_{VV} - G \cdot I_{VH}]}{[I_{VV} + 2 \cdot G \cdot I_{VH}]} \text{ onde, } G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (6)$$

Na Equação 6, I é a intensidade de fluorescência observada para cada uma das configurações possíveis de combinação dos polarizadores de excitação e de emissão [Figura 31].

Figura 31-Janela experimental do posicionamento da configuração dos polarizadores no decorrer das medidas. Imagens retiradas durante experimentos realizados no IFSC – USP no fluorímetro ISS-PCI (ISS, Champaign)

Essa heterogeneidade pode ser causada pela interação dos fluoróforos com outras moléculas. Nesse caso em particular, moléculas de fluoresceína (fluoróforo específico utilizado) foram ligadas covalentemente ao 5' das moléculas de tRNA^{sec} por meio do kit de marcação “5' EndTag Nucleic Acid Labelling System” (Vector Laboratories) em protocolo já estabelecido previamente. Por sua vez, essas moléculas marcadas, foram incubadas com o homodecâmero (SslA) seguindo os protocolos estabelecidos pela Dra. Livia Manzone em sua tese de doutorado³⁸. Pelo aumento do complexo, as contribuições de polarização, para ambas

as direções perpendiculares, tornaram-se significativas, resultando no incremento dos valores de anisotropia.

A fim de demonstrar a interação entre o complexo binário Sela-tRNA^{sec} com seu próximo parceiro proteico da via, a SelD, em colaboração com o aluno Ivan Rosa e Silva, o complexo proteína-tRNA foi incubado na concentração de 500 nM de Sela em monômeros e na proporção estequiométrica de 1Sela_{monômeros}:1tRNA^{sec}, sendo desses somente 10 nM de tRNA marcados com fluoresceína. Os ensaios de ligação foram realizados em tampão 20 mM de fosfato de potássio pH 7,5 na presença de 100 mM de cloreto de sódio, 10% de glicerol e 2 mM de β-mercaptoetanol à 25° C titulando concentração crescente de SelD dimérica, com intervalos de 10 minutos de estabilização entre cada medida.

Os espectros foram medidos no espectrofluorímetro ISS-PCI (ISS, Champaign) em geometria L utilizando somente um canal de monitoramento. O comprimento de onda de excitação foi 480 nm com a utilização de filtro, de 50% de corte, na emissão para 515 nm e monitoramento na faixa de 520 – 530 nm em cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico tomando 5 interações por medida de maneira a minimizar os erros experimentais.

Após a determinação dos parâmetros de cooperatividade (n) e constantes de dissociação aparente (K_d) através do ajuste utilizando a equação de Hill¹⁰⁸ (Equação VII) realizou-se o experimento para determinação da estequiometria de ligação, onde 5 μM de Sela_{monomérica} foram previamente incubadas com 5000 nM de tRNA^{sec}, dos quais 10 nM eram marcados com fluoresceína. Titulou-se SelD dimérica até obter um padrão com o conhecido na literatura como uma curva de interação específica e supersaturação dos sítios passíveis de ligação¹⁰², sendo possível estimar a estequiometria de ligação do complexo ternário.

$$Fração\ ligada = f \times \frac{[SELD_{free}]^n}{K_d^n + [SELD_{free}]^n}, \quad f = \frac{A_{obs} - A_i}{A_f - A_i} \quad (7)$$

Onde *f* é a fração ligada do titulante, nesse caso SelD, e sua concentração livre. Como mencionado, os parâmetros determinados pelo ajuste de Hill refletem a cerca de cooperatividade (n>>1 reflete cooperatividade e n ~ 1 não cooperativo e sítios independentes de ligação) e constantes de dissociação aparente em valores biologicamente aceitáveis, ou seja, na faixa do alto nanomolar¹⁰⁸.

4.13 Microcalorimetria

As reações químicas podem ser classificadas como endo ou exotérmicas, ou seja, absorvem ou liberam calor. Com base nesse princípio, inúmero métodos calorimétricos foram criados a fim de determinar reações, ligações e interações. Com a intenção de estudar a dependência da presença do tRNA para a formação do complexo ternário, SelA-tRNA^{sec}-SelD, experimentos de microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC) e calorimetria de varredura diferencial (DSC) foram realizados.

4.13.1 Microcalorimetria por titulação isotérmica (ITC)

Essa técnica vem sendo amplamente utilizada para avaliação termodinâmica de interação entre moléculas. Ela permite, através de uma única medida, a determinação de parâmetros da termodinâmica tais como constantes de associação, estequiometria, energia livre de Gibbs, entalpia e entropia do sistema em análise¹⁰⁹ utilizando as Equações 8-11.

$$\begin{aligned}\Delta U &= \Delta q - W \\ \Delta S &= \frac{[\Delta q]}{T} \\ \Delta H &= \Delta q_{(p,v)} \text{ então, } \Delta S = \frac{[\Delta H]}{T} \quad (8), (9), (10) \text{ e } (11) \\ \Delta U &= T \cdot \Delta S - P \cdot \Delta V\end{aligned}$$

Onde, ΔU é a variação de energia interna ao sistema, Δq é a variação de calor fornecido, W é o trabalho realizado pelo sistema, ΔS é a variação entrópica do sistema, T é a temperatura fixa do sistema de maneira isotérmica e ΔH é a variação da entalpia do mesmo sistema.

A fim de determinar esses parâmetros na formação do complexo ternário, medidas de ITC foram realizadas no equipamento VP-ITC Microcalorimeter (MicroCal) do Laboratório de Biofísica Molecular “Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas” em colaboração com o Dr. Héilton Wiggers e do aluno Ivan Rosa e Silva.

Inicialmente, foi necessária a determinação da linha de base realizando a titulação do tampão de ligação do complexo (20 mM de fosfato de potássio pH 7,5, 100 mM de cloreto de sódio, 10 % de glicerol e 2 mM de β -mercaptoetanol) sobre o mesmo. Após isso, a amostra SelD foi titulada, em frações molares crescentes, sobre o tampão para determinar o calor de diluição da mesma em tampão. Como controle negativo, a amostra SelD foi titulada em 1,8 ml do complexo SelA a uma concentração de 30 μ M e ausência do tRNA^{sec}. Foram realizadas 20 injeções de titulante a um volume de 10 μ l cada e tempo de espera entre as mesmas de 10 minutos. O monitoramento foi realizado até 2,5 vezes a razão molar. Todos os experimentos foram realizados a 25° C, e os dados analisados no programa Origin 8.0.

4.13.2 Microcalorimetria diferencial por varredura (DSC)

Essa metodologia consiste na medida de temperaturas e fluxos de calor associadas às transições em função do tempo e temperatura inserida em um ambiente controlado. Em estudos de macromoléculas biológicas, essa técnica permite a determinação da temperatura de *melting*, ou seja, a temperatura no qual 50% da população em análise perde sua conformação nativa, podendo colaborar com os dados obtidos através das análises de dicróismo circular (CD) monitorando a desnaturação por variação térmica¹¹⁰.

$$\Delta H = C_p \cdot \Delta T$$

$$\text{ou, } \frac{[\Delta H]}{[\Delta T]} = C_p \quad (12)$$

Na Equação 12, ΔH é a variação da entalpia do sistema, C_p é o calor específico da amostra analisada e ΔT a variação de temperatura ao qual o sistema é submetido.

Para esse projeto, a ideia foi o monitoramento da temperatura de *melting*, relacionado ao C_p , das amostras SelA e SelD, comprovando o valor semelhante ao observado pelos experimentos de dicróismo circular. Posteriormente, experimentos semelhantes para o complexo binário SelA-tRNA^{sec} foram realizados, onde foi observado a variação do pico de desnaturação para uma temperatura mais elevada, o que pode indicar a interação. Utilizando esses dados, foi possível realizar as medidas das tentativas de interação do complexo ternário

na presença e ausência do tRNA^{sec}, permitindo inferir valores termodinâmicos ao sistema de interação e observação da variação do pico de desnaturação, o que indica a necessidade de maior energia para a desnaturação, o que é indicio de interação do complexo de maneira tRNA-dependente. Todas as medidas foram realizadas utilizando concentração de 1 mg/ml de proteínas, temperatura inicial da cela do equipamento DSC (Microcal) em 25° C variando até 90° C. Os dados foram analisados no próprio software do equipamento.

4.14 *Crosslinking* químico

Em estudos de complexos moleculares ou proteínas com distintas conformações oligoméricas, o *crosslinking* químico é uma técnica que viabiliza uma série de outros experimentos de caráter exploratório independente da estabilidade do complexo em análise. Esse estudo envolve a ação de um reagente cuja ligação entre moléculas de diferentes naturezas, como proteínas ou ácidos nucleicos, seja promiscua permitindo a estabilização de apenas uma das populações em solução^{38,111}. Comumente os reagentes utilizados são ditos homobifuncionais, como os aldeídos.

Para essa análise, foi utilizado o glutaraldeído para a ligação entre os componentes dos complexos: SelA, SelA-tRNA^{sec} e SelA-tRNA^{sec}-SelD. Foram realizados diferentes ensaios com concentração crescente de 0.05% a 5% de glutaraldeído em solução e tempo variando de 30 minutos a 3 horas em banho térmico a 25° C. As amostras estavam em concentração aproximada de 1mg/ml de complexos. Após os ensaios, foram submetidas à SDS-PAGE em géis com diferentes malhas (5%, 7%, 10% e 15% de poliacrilamida) a fim de obter um resultado que pudesse ser visualizável devido ao tamanho exagerado do complexo ternário, cerca de 1,3 MDa.

As melhores condições testadas foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna de *Sephacril 500* (GE) refrigerada à, aproximadamente, 10° C e previamente equilibrada com tampão 20 mM de tris pH 7,5, em fluxo de 1 ml/min. As frações foram coletadas e submetidas à microscopia eletrônica de transmissão utilizando a metodologia de *negative stain* e também foram enviadas ao NeCEN para coleta em preparo crio.

Capítulo V
RESULTADOS E DISCUSSÕES

“O homem só não faz o que não quer”

João Serrão de Moura

04 de julho de 1929 – atual

Meu avô

A enzima Selenocisteína Sintase de *Escherichia coli*, produto do gene *sela* foi caracterizada como sendo um oligômero decamérico que depende de piridoxal 5'-fosfato (PLP) ligado covalentemente ao resíduo de lisina (K295). Estudos realizados no início da década de 90 definiram a massa molecular aparente do decâmero, bem como os eixos de simetria e razão estequiométrica de interação entre Sela e o tRNA^{sec}.

Os projetos preliminares realizados no nosso grupo revelaram contestações das referências bibliográficas já conceituadas nessa área de estudo bem como análises prévias de caráter estrutural e funcional da enzima. Desse modo, os resultados que serão apresentados nesse capítulo visam colaborar com os resultados obtidos anteriormente com relação à razão estequiométrica entre proteína e tRNA específico, além de revelar uma nova proposição de conformação estrutural, modelos de interação e compreensão da via de incorporação de selênio para o organismo em questão, e prospectar possíveis hipóteses sobre evolução e funcionalidade de regiões específicas da macromolécula utilizando diferentes técnicas biofísicas para fazê-lo.

5.1 Determinação estequiométrica da ligação Sela e seu ligante específico (tRNA^{sec}).

Como mencionado, a estequiometria previamente descrita foi uma molécula de Sela interagente com 5 tRNAs⁶⁴. No entanto, os estudos posteriores³⁸ relataram um comportamento diferente, revelando uma razão entre macromolécula e ácido nucleico de um para dez moléculas, respectivamente. Essa seção vem exemplificar e justificar as proposições mais recentes sobre a razão estequiométrica.

5.1.1 Expressão e purificação do gene *sela* de *Escherichia coli* produzindo a proteína recombinante Sela.

Seguindo o protocolo estabelecido pela Dra. Livia Manzone³⁸, a cepa bacteriana *E. coli* WL81460 (λ DE3) contendo o gene *sela* de *Escherichia coli* clonada em vetor pET29_{modificado}, foi expressa em condições aeróbicas adequadas como descrito na seção 4.1.

Prosseguindo com as etapas de lise celular e passos de purificação: precipitação com sais inorgânicos seguido de cromatografia de dessalinização em coluna *HiTrap Desalting* e por fim, cromatografia de exclusão molecular em coluna *Superdex 200 HL (16/60)* após a adição de 20% em concentração final de Nycodenz® [Figura 32], obtemos os cromatogramas para cada uma das colunas utilizadas e um gel SDS-PAGE 15% das etapas de purificação [Figura 33].

Figura 32-As etapas de purificação monitoradas pelas cromatografias. (A) Dessalinização em coluna *HiTrap Desalting* com monitoramento em 280 e 260 nm. (B) Exclusão molecular em coluna *Superdex 200 HL (16/60)* com monitoramento em comprimento de onda de 280 nm. As setas em preto indicam os picos referentes à proteína recombinante SelA para ambas as cromatografias utilizadas e a seta azul indica a fração pertencente a eluição do Nycodenz®.

Para analisar com clareza as etapas de purificação, uma eletroforese desnaturante foi utilizada nas diversas etapas de purificação, indicando no final um elevado grau de pureza, suficiente para estudos estruturais utilizando cristalografia e outras técnicas que foram mencionadas no decorrer do capítulo 4.

Figura 33-Gel resultado da eletroforese desnaturante. SDS-PAGE 15% das etapas de purificação: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) amostra precipitada com sulfato de amônio; 3) amostra após passagem pela coluna *HiTrap Desalting*; 4) amostra com Nycodenz® concentrada a 2 mL; 5) amostra eluída da coluna de exclusão molecular; 6) amostra eluída concentrada em concentrador de corte de 100 kDa.

A fração correspondente a canaleta 6 do gel desnaturante pôde ser concentrada a 30 mg/ml em um volume final de aproximadamente 2 ml utilizando concentrador Amicon com corte de 100 kDa. Esse procedimento foi reprodutível apresentando rendimento de aproximadamente 15 mg de proteína recombinante para cada litro de cultura utilizada. A amostra também se apresentou como um homodécâmero em solução como resultados de trabalhos anteriores^{38, 64,79-81,95}.

5.1.2 Amplificação e transcrição do tRNA específico, tRNA^{sec}.

Assim como descrito na seção 4.3 e 4.4, o gene *selC* foi amplificado e o tRNA^{sec} transcrito utilizando o kit comercial Megashortscript T7 (Ambion), obtendo o tRNA^{sec} específico para incorporação de selenocisteínas.

Brevemente, 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 34].

Figura 34- 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) SelC de *E. coli* (95 bases). As caixas pretas indicam as bandas desejadas para cada experimento.

Para verificar o estado de enovelamento do tRNA^{sec}, ensaios de dicroísmo circular foram realizados, uma vez que a estrutura secundária dessa macromolécula apresenta o perfil da curva característica para tRNAs em função da temperatura, obtendo um padrão de enovelamento análogo ao encontrado na referência³⁸ e mostrado no capítulo Anexos seção 1.2 [Figura 86].

5.1.3 Ensaios de cristalização do complexo homodecamérico e seu complexo binário.

Com uma amostra com elevado grau de pureza e concentração elevada, foi possível dar início a ensaios de cristalização com o objetivo de obtenção de um modelo estrutural. Utilizando a plataforma automatizada HoneyBee (DigiLab) do Grupo de Cristalografia e Biologia Molecular e Estrutural – Instituto de Física de São Carlos – USP, foram realizado *screenings* em placas de 96 ensaios em gotas sentadas utilizando as amostras SelA e o complexo binário SelA-tRNA^{sec} em uma proporção molar de 1SelA_{monômero}:1,2tRNA^{sec}.

Foram utilizados os kits comerciais SALT RX e INDEX HT (Hampton Research) como triagem inicial, obtendo cristais da amostra de Sela em mais de 35 condições dentre as 192 testadas, cerca de 20% das condições. No entanto, a amostra do complexo binário Sela-tRNA^{sec} apresentou cristais em apenas 7 condições, cerca de 4% das condições testadas.

Tentativas de melhorias das condições obtidas foram realizadas por meio de ensaios de cristalização manuais nos métodos de gota sentada ou gota suspensa, no entanto, as condições de cristalização mais promissoras estão apresentadas na Figura 35 e obtidas por meio do sistema automatizado.

A

B

Figura 35-Cristais obtidos da proteína Sela. (A) Condições do kit INDEX HT com a amostra a 7 mg/ml: 1) 0,1 M Bis-tris 2,0 M sulfato de amônio pH 6,5; 2) 0,1 M Tris 3,0 M cloreto de sódio pH 8,5; 3) 0,1 M Bis-tris 0,3 M formato de magnésio di-hidratado pH 5,5; 4) 1,26 M fosfato de sódio monobásico mono-hidratado 0,14 M fosfato de potássio dibásico. (B) Condições do kit SALTRX com a mesma amostra proteica: 1) 0,1 M Tris 1,5 M cloreto de amônio pH 8,5; 2) 0,1 M Bis-Tris propano 2,2 M de cloreto de sódio pH 7,0; 3) 0,1 M Bis-Tris propano 2,0 M formato de sódio pH 7,0; 4) 0,1 M Bis-tris propano 1,2 M ácido DL-málico pH 7,0. Os cristais apresentavam dimensão média de 0,5 mm na maior dimensão.

Ensaio de cristalização foram feitos com o complexo binário Sela-tRNA^{sec}, e assim como no caso anterior, os melhores cristais obtidos foram por meio do sistema automatizado, não tornando reprodutíveis as condições de cristalização por meio de preparo manual. As condições mais promissoras de cristalização do complexo binário estão representadas na

Figura 36.

Figura 36 Cristais obtidos da proteína Sela em complexo com o tRNA^{sec}. (A) Condições do kit INDEX HT com a amostra a 7 mg/ml: 1) 0,2 M Tartarato de sódio potássio tetra-hidratado 20% m/v polietilenoglicol 3350; 2) 0,2 M Citrato de sódio tribásico di-hidratado 20% m/v polietilenoglicol 3350. (B) Condições do kit SALTRX com a mesma amostra proteica: 1) 0,1 M Tris 0,8 M sulfato de lítio mono-hidratado pH 8,5; 2) 0,1 M Tris 2,2 M de cloreto de sódio pH 8,5. Os cristais apresentavam tamanho médio de 0,3 mm na maior dimensão.

No entanto, todos os cristais enviados ao Sincrotron **Diamond Light Source**, cerca de 120 (100 de Sela e 20 do complexo Sela-tRNA^{sec}), para as linhas de luz I04 e I24, não difrataram. Essas linhas de luz foram escolhidas por estarem entre as mais avançadas e com maior potência, além de apresentar em um conjunto óptico eficiente, tornando-as extremamente potentes e com elevada coerência e coesão, permitindo um feixe microfocal com dimensões de 2 x 8 μm .

Durante as coletas foram utilizados feixes com aberturas de 10 x 10 μm e transmitância em 100%, ou seja, a potência máxima da linha (I04 – 2×10^{11} e I24- 10^{12} fótons/segundo, respectivamente) sobre os cristais com tempo de exposição de 0,5 segundos por imagem e rotação de 1°/segundo. Mas, mesmo assim não houve a presença de *spots* de difração em nenhum dos cristais testados.

5.1.4 Estudos de microscopia eletrônica de transmissão – *negative stain* (NS-EM), determinação da estequiometria por análise de simetria.

Paralelamente às tentativas de cristalização e obtenção de um modelo estrutural por cristalografia de macromoléculas, estudos por microscopia eletrônica de transmissão começaram a ser empregados.

O primeiro objetivo era a análise da conformação oligomérica e grau de pureza das amostras SelA e SelA-tRNA^{sec} e, para isso, foi utilizado o preparo com contraste negativo, ou *negative stain*. Consiste na deposição da amostra sobre uma grade de carbono previamente tratada e recobrimento da amostra com um sal metálico eletronicamente denso, nesse caso, o acetato de uranila. Foram necessárias 12 grades até atingir o preparo adequado para a amostra SelA e depois adequá-lo para o complexo binário. Esses procedimentos foram mencionados na seção 4.6.1. Os resultados estão mostrados na Figura 37.

Para as micrografias da amostra SelA fica clara a morfologia do pentâmero de dímeros análogos ao trabalho de 1992⁶⁴. No entanto, é evidente a maior polidispersividade com a presença de estruturas supramoleculares e interações entre as unidades de SelA. Já as micrografias da amostra do complexo binário revelam-se com menor polidispersividade e ausência de estruturas supramoleculares. A morfologia do complexo sofre alterações como o fechamento do orifício central e maior arredondamento da molécula.

A Figura 37 mostra ambos os complexos com preparo de NS utilizando acetato de uranila. As imagens 37-A, B são com uma magnificação de x60,000 enquanto 37-C, D são imagens em baixa magnificação, ou *low mag*.

Figura 37-Micrografias eletrônicas obtidas em Microscópio JEOL 2100 operando em 200 kV. (A) Amostra de NS-EM de SelA, possível determinação de polidispersividade. (B) Amostra de NS-EM do complexo SelA-tRNA^{sec}, sutil alteração da conformação da molécula e diminuição da polidispersividade da amostra. (C) e (D) Micrografias em *low mag* dos complexos SelA e SelA-tRNA^{sec}, respectivamente.

Também foi possível a identificação de estruturas supramoleculares na amostra de SelA [Figura 38] indicando associação em forma de “pilhas” ou associações “lado a lado”. Este resultado corrobora aqueles obtidos pela Dra. Livia Manzine³⁸ e na seção 5.2.5 desta dissertação, onde os resultados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) da amostra na ausência do tRNA apresenta múltiplos picos de massa molecular elevada, até então não compreendidos. Com os resultados da microscopia foi possível determinar as estruturas supramoleculares e constatar que não há formação de “pilhas” na presença do tRNA^{sec}, possivelmente por impedimento eletrostático causado pelos fosfatos dessa molécula quando interagente com o decâmêro de SelA.

Figura 38-Micrografias da amostra SelA com preparo NS-EM. A caixa indica a estrutura supramolecular em associação em “pilhas” e o círculo indica as associações “lado a lado”.

Por fim, foram realizadas análises de estequiometria da ligação entre SelA e tRNA^{sec} que foi postulada anteriormente como sendo de $2\text{SelA}_{\text{monômero}}:1\text{tRNA}^{\text{sec}}$ por meio de análises de conservação de regiões de densidades eletrônicas em amostras do complexo binário pela metodologia de NS-EM⁶⁴. Para isso, utilizou-se a mesma metodologia de preparo de amostra, mas com outra metodologia de análise, a MSA ou análise estatística multivariada.

Os conjunto de dados coletados de uma amostra de SelA- tRNA^{sec} foram processados utilizando o pacote IMAGIC 4D e os resultados estão mostrados na Figura 39.

Figura 39-Análise de microscopia eletrônica das amostras do complexo em *negative stain*. (A) As primeiras dez *eigenimages* obtidas a partir do conjunto de dados de 7582 partículas. As *eigenimages* A2 e A3 mostram a simetria D5 do conjunto de dados. (B) As primeiras 5 *eigenimages* providas do MSA, obtendo 7388 partículas em “*top view*” após ajustes rotacionais. (C) As classes evidenciando a partícula de SslA e, (D) As classes do complexo binário SslA-tRNA^{Sec}.

Analisando a Figura 39, nota-se que as 10 principais *eigenimages* resultantes do conjunto completo, ou seja, 7582 partículas coletadas refletem os eixos de simetria mais importantes da partícula. Nota-se em A1 a simetria trivial. Em A2 e A3 a presença de um eixo de simetria de ordem cinco, decorrente das partículas em “*top view*” onde é evidente essa simetria pela constituição do complexo como um pentâmero de dímeros. Em A4 e A5, nota-se uma componente de simetria de ordem 10, ou melhor, a composição de simetria de ordem cinco (ao longo do eixo central ao “*top view*”) com as simetrias de ordem dois presentes no plano transversal à molécula, resultando em harmônicos superiores de ordem 10. As partículas

em “*side view*” têm suas simetrias de ordem dois representadas pelas imagens A7 e A8. Em B1 e B3 fica evidente a comparação entre as moléculas SelA e seu complexo binário, respectivamente, onde na segunda é possível notar a presença de dez pontos mais intensos nas regiões mais externas à partícula.

Nas imagens representadas em Figura 39-C, pode-se observar as *classsums* obtidas para um conjunto de dados de SelA e em 39-D as *classsums* obtidas para um conjunto de dados do complexo SelA-tRNA^{sec}, evidenciando as diferenças morfológicas e estruturais entre os complexos. As demais imagens presentes são referentes aos conjuntos de dados processados usando o pacote IMAGIC 4D e eixos de simetria de menor importância.

Levando em consideração que o tRNAs são moléculas assimétricas, ou seja, não possuem eixo de simetria em nenhuma das direções euclidianas, não seria possível a obtenção de uma simetria de ordem 10 para um conjunto de dados do complexo SelA-tRNA^{sec} caso a estequiometria fosse 2SelA_{monômero}:1tRNA^{sec}, como postulado anteriormente, pela quebra das simetrias de ordem dois no plano perpendicular ao eixo de simetria de ordem dez. No entanto, a imagem B2 da Figura 39 reflete os mesmos eixos de ordem 10, ou melhor, composição dos eixos de ordem dois com o eixo de ordem cinco perpendicular, evidenciando a necessidade de uma estequiometria de 1SelA_{monômero}:1tRNA^{sec}, corroborando com os resultados da Dra. Livia Manzine³⁸ (mostrado na seção 1.2 do capítulo Anexos) e com a imagem B3 onde fica evidente as regiões de maior densidade eletrônica.

A Figura 40 elucida esquematicamente como são as simetrias das orientações vista superior (*top view*) e vista lateral (*side view*), com seus respectivos eixos de simetria, caso a razão estequiométrica fosse 2:1 como postulado em 92⁶⁴, os eixos de ordem dois não existiriam.

Com esse resultado é possível construir um modelo teórico de interação entre os monômeros de SelA para a formação do decamêro assim como de interação com o seu tRNA específico, resultando no complexo binário SelA-tRNA^{sec}.

Figura 40-Esquema representativo dos eixos de simetria de ordem cinco e de ordem dois para as diferentes orientações. A composição dos cinco eixos de ordem dois gera a pseudossimetria de ordem 10.

5.2 Caracterização estrutural do complexo binário e construção de modelos estruturais teóricos.

Utilizando a sequência de Sela depositada no NCBI (#gb: AAA24644.1) foi construído um modelo tridimensional utilizando a plataforma MODELLER 9.0⁹¹ [Figura 41]. Esse modelo já havia sido construído durante o doutorado do aluno Alexandre Cassago⁸⁰ assim como sua validação.

Com base nesse modelo estrutural do monômero, foi possível a construção do homodecâmero além de propor um modelo para o complexo binário.

5.2.1 Análise teórica, criação de um modelo estrutural.

Inicialmente, o modelo do monômero utilizado foi proposto pelo Dr. Alexandre Cassago⁸⁰ [Figura 41] e validado pelos programas MOLPROBITY e PROCHECK.

Figura 41-Modelo tridimensional do monômero de SelA utilizando o programa MODELLER 9.0 e obtido pelo Dr. Alexandre Cassago⁸⁰.

Foi utilizada a estrutura da enzima putativa SelA de *Methanocaldococcus jannaschii* (PDB.ID 2AEU⁵²), um dímero não funcional, como molde para a modelagem por homologia. Uma maneira de validar um modelo é a sobreposição com o monômero dessa estrutura cristalográfica e análise do desvio médio quadrático das posições atômicas de ambos os modelos, o valor de RMSD e, juntamente a isso, é possível analisar as interfaces de formação do dímero de SelA de *M. jannaschii* com o modelo gerado por modelagem [Figura 42]. Apesar desse modelo apresentar estruturação somente do domínio SelA, ou seja, definido entre os resíduos 52 ao 463, sendo ausente o domínio N-terminal por conta de não existir estruturas com esse domínio.

O dímero da estrutura *MjSelA* é gerado pelos simétricos cristalográficos, uma vez que é observado um monômero na unidade assimétrica do cristal, e foi sobreposto com o modelo de *EcSelA* obtido por modelagem por homologia.

Figura 42-Sobreposição entre o modelo de *EcSelA* (verde) e *MjSelA* (azul). Na rotação é mostrado o dímero da estrutura cristalográfica com destaque para a superfície de uma das subunidades. O valor de RMSD da sobreposição é de 0,283.

Com o modelo do monômero, utilizando a plataforma *online* SymmDock, impõe-se a simetria de ordem 5 ao dímero construído através dos *webservers* PathDock e ClusPro 2.0, construindo assim o homodecâmero [Figura 43].

A interação realizada para a construção do dímero utilizando a plataforma PathDock resultou em uma molécula com empacotamento semelhante ao observado no empacotamento cristalino de *MjSslA* e, de maneira análoga, o dímero resultante da plataforma ClusPro 2.0 apresentava mesma conformação e regiões de interação. As regiões de *clashes* foram minimizadas pelos próprios programas e pela imposição de simetria pelo programa SymmDock.

A construção do modelo do decâmero foi realizada pela imposição da simetria de ordem 5 no dímero resultante da interação utilizando a plataforma SymmDock. Sendo assim, obtêm-se um modelo tridimensional do decâmero de SslA de *E. coli*, salientando a ausência do domínio N-terminal, de cerca de 50 resíduos, do modelo do monômero gerado.

Figura 43-Construção do modelo tridimensional. A partir do monômero obtido por modelagem por homologia, obtêm-se o dímero por interação proteína-proteína utilizando os programas PathDock e ClusPro 2.0. O decâmero é resultante da imposição de simetria de ordem 5 utilizando a plataforma SymmDock.

Com esse decâmero hipotético, pode-se utilizar a densidade eletrônica, superior a 20 Å de resolução, obtida por Cryo-EM^{80,95}, também mostrado na seção 1.1 do capítulo Anexos,

para ajustar a estrutura modelada dentro da densidade obtida experimentalmente, sendo assim, possibilitando um modelo estrutural adequado ao modelo experimental [Figura 44]. O valor RMSD do ajuste dentro da densidade utilizando o programa CHIMERA 1.5.3 é de 0,149 e as dimensões da molécula são, 19 nm e 6 nm para dimensão máxima e altura, respectivamente.

Figura 44-Ajuste do modelo do decâmero gerado na densidade de Cryo-EM obtida em colaboração⁹⁵ com resolução superior à 20Å. Valor do desvio médio quadrático do ajuste é de 0,149. Vale salientar a baixa resolução da densidade de Cryo-EM, resultando em ajuste com acurácia, mas não precisão.

Modelos das interações em forma de pilhas também foram criados [Figura 45], podendo evidenciar a rotação de 12° entre cada unidade do decâmero de Sela. O modelo foi criado utilizando o programa CHIMERA 1.5.3 e se assemelha com as micrografias obtidas no decorrer desse trabalho e mostrada na Figura 38.

Figura 45-Modelo das estruturas supramoleculares. As pilhas foram modeladas utilizando o programa CHIMERA 1.5.3 a partir da densidade de Cryo-EM obtida anteriormente em colaboração⁹⁵.

Com esse modelo do homodecâmero e sabendo a estequiometria de $1\text{SelA}_{\text{monômero}}:1\text{tRNA}^{\text{sec}}$, pode-se analisar cuidadosamente as regiões de maior densidade eletrônica observadas pelas microscopias, sejam de nossos resultados (Figura 39, B3) ou resultados bibliográficos⁶⁴ [Figura 13], para obtenção de um modelo de interação do complexo binário SelA-tRNA^{sec} utilizando o programa CHIMERA 1.5.3 e o programa *online* de interação entre moléculas PathDock [Figura 46].

Figura 46-Construção do modelo tridimensional. A partir do dímero, obtêm-se o complexo binário por interação proteína-RNA utilizando o programa PathDock. A partir da unidade básica, montou-se o decâmero no programa CHIMERA 1.5.3.

Nota-se que as regiões de alta densidade eletrônica são representativas nas micrografias obtidas, sendo pelos dez pontos de maior intensidade observados nas extremidades de cada unidade monomérica ou pela região interna à molécula que se assemelha a uma estrela, semelhante aos resultados de microscopia de 1992⁶⁴.

Para validar os modelos gerados foram realizados experimentos de mapeamento das interfaces dos complexos em estudo, SelA e SelA-tRNA^{sec}, por troca hidrogênio-deutério acoplado à espectrometria de massas. Esses resultados são mostrados na seção 5.2.2.

Outra análise realizada foi em relação à importância do domínio N-terminal único para SelAs de bactérias. Análises de correlação entre os resíduos foram realizadas pelo Dr. Alexandre Cassago⁸⁰, no entanto, para o domínio SelA definido entre os domínios 83 à 451. O

domínio N-terminal, definido entre os resíduos 9 ao 48, não apresentou correlação entre os resíduos, apesar de ser único e exclusivo para essa proteína em bactérias, com poucas sequências a serem alinhadas. Com isso, a modelagem desse domínio se mostrou importante.

Utilizou-se o servidor *online* I-TASSER, uma vez que não existem sequências homólogas resolvidas sendo necessária a utilização de modelagem por ambiente químico atrelado às técnicas de alinhamento (ou *threading*). O modelo estrutural desse domínio foi obtido, mostrando-se três α -hélices estruturadas ligadas por pequenas voltas [Figura 47].

Figura 47-Modelo estrutural do domínio N-terminal. Utilizando a plataforma online I-TASSER foi obtido modelo constituído por três α -hélices unidas por pequenas voltas. Sua importância, além de estar presente somente em bactérias, será discutida no decorrer desse capítulo.

Na seção 5.3.1 as análises apresentadas nesse capítulo para a obtenção dos modelos estruturais e interações do tipo proteína-proteína serão novamente apresentadas para a obtenção e compreensão de um modelo estrutural do complexo ternário, Sela-tRNA^{sec}-SelD.

5.2.2 Mapeamento das regiões de interfaces do complexo Sela e do complexo binário Sela-tRNA^{sec} por espectrometria de massa com troca hidrogênio-deutério, validação do modelo estrutural.

A técnica de espectrometria de massas geralmente é empregada em análises de proteômica ou identificação de amostras. No entanto, essa técnica vem sendo utilizada para a identificação de regiões flexíveis em solução e até mesmo superfícies de interação entre proteína-ligante.

Para esse projeto, a técnica de espectrometria de massa foi empregada na compreensão das conformações oligoméricas mais estáveis e na análise das superfícies de interação e regiões flexíveis em solução.

A amostra de SelA intacta foi injetada no espectrômetro de massas de triplo quadrupolo Quattro II (Micromass – Altrincham) por meio de uma fonte de eletrospray (ESI) e ausência de coluna de HPLC. O espectro obtido foi então deconvolvido pelo software do equipamento MaxEnt Electrospray (Masslynx 3.2) [Figura 48].

Figura 48-Espectro deconvolvido da espectrometria de massas da amostra de SelA intacta. Esse resultado revela que as conformações oligoméricas mais estáveis nas condições experimentais são monômeros e dímeros, picos com massas de 50,6 e 101,4 KDa, respectivamente, apesar da proteína ser um decâmero em solução.

As massas obtidas na deconvolução do espectro revelam a forma monomérica ($\text{Massa}_{\text{experimental}} = 50658,1 \text{ Da}$ e $\text{Massa}_{\text{teórica}}^{\text{Protparam}} = 50667,2 \text{ Da}$) e a forma dimérica ($\text{Massa}_{\text{experimental}} = 101495,3 \text{ Da}$ e $\text{Massa}_{\text{teórica}}^{\text{Protparam}} = 101334,4 \text{ Da}$) da SelA, não sendo observada a conformação decamérica, talvez pelas condições abrasivas do experimento no qual essa conformação, provavelmente, não se mantém.

As análises das regiões flexíveis e, conseqüentemente, superfícies de interação para os complexos estudados foram utilizados para a validação do modelo estrutural obtido por metodologias teóricas bem como para a compreensão das regiões de maior importância para a formação do complexo homodecamérico e do complexo binário SelA-tRNA^{sec}.

Para o complexo SelA foram obtidos 20 fragmentos únicos com a proteólise realizada com pepsina, resultando em uma cobertura de 57% da sequência, ou seja, 264 resíduos. Foram realizados quatro tempos de incorporação de deutério distintos antes da proteólise ($t_1 = 5$, $t_2 = 10$, $t_3 = 15$ e $t_4 = 30$ minutos) com taxa de incorporação crescente [Figura 49-A], possibilitando também a análise de taxa de incorporação total de deutério por elemento de

estrutura secundária predita [Figura 49-B].

A

B

Figura 49-Análise das taxas de incorporação de deutério. (A) Evolução do percentual de incorporação em função do tempo ($t_1 = 5$, $t_2 = 10$, $t_3 = 15$ e $t_4 = 30$ minutos). (B) Análise de incorporação de deutério por elemento de estrutura secundária predito evidenciando a predominância de incorporação em hélices.

Comparando os diferentes tempos de incorporação é possível inferir quais são as regiões de maior flexibilidade da molécula (elevada incorporação em menor tempo) e as regiões de interface do complexo homodecamérico cuja incorporação mínima ou ausente para tempos longos [Figura 50].

Pode-se notar que algumas regiões não apresentam taxa de incorporação mesmo para tempos longos (t_4), as sequências entre os resíduos 67-72, 305-321 e 333-340 são alguns dos exemplos, indicando a possibilidade de serem regiões de interface.

Outras regiões, no entanto apresentam taxa de incorporação crescente ao longo do tempo ou mesmo elevada troca em tempos curtos, como a sequência designada entre os resíduos 324-332, por exemplo.

Em especial, o domínio N-terminal apresenta uma região de quatro resíduos sem incorporação para nenhum dos tempos de análise (AIDR, 14-17), indicando a importância desse domínio para o estado de oligomerização da molécula, salientando que esse domínio é único para bactérias e essa enzima só é encontrada em estado de oligomerização decamérico nesse domínio da vida.

Figura 50-Comparativo dos tempos de incorporação de deutério. A sequência de Sela com a predição de estruturas secundárias, as sequências sublinhadas indicam os peptídeos medidos. A escala de cores indica as diferentes faixas de incorporação de deutério: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). O resíduo catalítico K295 está em roxo.

A Figura 51 indica, nos modelos estruturais do monômero de Sela e do seu domínio N-terminal, as taxas de incorporação seguindo as mesmas cores da Figura 50, para facilitar a visualização das regiões de possível interfaces e regiões mais expostas da molécula.

Fica evidente a não incorporação em uma região determinada por duas α -hélices perpendiculares cujas sequências são ricas em lisinas e argininas, o que permitira a formação do dímero por interações do tipo ponte salinas através da sequência específica presente nessa região e simetricamente repetida na molécula adjacente (E _ _ _ R _ _ S _ _ _ K).

Em contrapartida, a região contendo uma única hélice localizada na extremidade do domínio menor permite interações hidrofóbicas, sendo uma região composta majoritariamente por resíduos de leucina e treonina.

Figura 51-Plote das taxas de incorporação nos modelos estruturais. Para cada um dos tempos de incorporação analisados os modelos de SslA (à esquerda) e de seu Domínio N-terminal (à direita) foram coloridos seguindo a legenda: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). Indicando possíveis regiões flexíveis e regiões de interação na formação do dímero ou decâmero.

De maneira análoga, o complexo SslA-tRNA^{sec} foi analisado. Foram obtidos 24 fragmentos únicos resultando em uma cobertura de 63%, ou 289 resíduos. No entanto, para os dois tempos analisados ($t_1 = 10$ e $t_2 = 30$ minutos) a taxa de incorporação se manteve constante em ~30% das possibilidades de trocas.

Figura 52-Comparativo dos tempos de incorporação de deutério para o complexo binário Sela-tRNA^{sec}. A sequência de Sela com a predição de estruturas secundárias, as sequências sublinhadas indicam os peptídeos medidos. A escala de cores indica as diferentes faixas de incorporação de deutério: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). O resíduo catalítico K295 está em roxo.

A comparação da incorporação de deutério nos tempos de incorporação mostra um aumento considerável de regiões que minimizaram a incorporação de deutério, o que pode indicar a proteção dessas regiões pelo tRNA^{sec} [Figura 52]. Deve-se atentar novamente ao domínio N-terminal e sua elevada diminuição na incorporação mesmo para tempos longos de troca, o que indica sua importância para a interação do tRNA específico com a enzima Sela. A Figura 53 retrata os tempos de incorporação nos modelos tridimensionais gerados para o monômero e para domínio N-terminal.

Figura 53-Plote das taxas de incorporação do complexo binário Sela-tRNA^{sec} nos modelos estruturais de Sela. Para cada um dos tempos de incorporação analisados os modelos de Sela (à esquerda) e de seu Domínio N-terminal (à direita) foram coloridos seguindo a legenda: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). Indicando possíveis regiões flexíveis e regiões de interação na formação do dímero ou decâmero.

Por fim, é possível realizar uma análise comparativa entre os dois complexos, Sela e Sela-tRNA^{sec}. A comparação das sequências dos fragmentos obtidos com diferentes tempos de incorporação de deutério evidencia a evolução na taxa de incorporação e regiões de possível interface de decamerização ou mesmo de interação com o tRNA específico ao homodecâmero e ao domínio N-terminal, indicando as regiões oclusas pela interação dessa molécula [Figura 54].

Figura 54-Comparativo dos tempos de incorporação de deutério para o complexo Sela e para o complexo binário Sela-tRNA^{sec}. A sequência de Sela com a predição de estruturas secundárias, as sequências sublinhadas indicam os peptídeos medidos. A caixa cinza indicam os tempos e resultados de incorporação de deutério para o complexo binário. A escala de cores indica as diferentes faixas de incorporação de deutério: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). O resíduo catalítico K295 está em roxo.

Essas análises servem para indicar e validar os modelos teóricos obtidos na seção 5.2.1 de modo que as interfaces de interação para a formação dos dímeros e de oligomerização para

a formação do decâmero coincidem com os resultados obtidos pela troca hidrogênio-deutério. E para o modelo interagente ao tRNA^{sec}, as regiões oclusas por essa molécula são coincidentes no modelo teórico com as sequências de peptídeos que tiveram sua taxa de incorporação minimizada, validando assim o modelo teórico de interação por um método experimental indireto [Figura 55].

Figura 55-Comparativo dos modelos estruturais em tempo de incorporação de deutério fixo em 30 minutos do complexo SslA e do complexo binário SslA-tRNA^{sec} na estrutura do decâmero. A escala de cores indica as diferentes faixas de incorporação de deutério: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho).

Essa técnica também será de suma importância para a caracterização e mapeamento das interfaces de interação para a formação do complexo ternário e validação do modelo estrutural gerado.

5.2.3 Determinação da variação de estruturas na formação do complexo binário através de espectroscopia de infravermelho (FTIR).

Até este momento, a construção do modelo estrutural do complexo binário foi tratado como resultado da interação de duas estruturas de corpo rígido, não levando em consideração possíveis alterações estruturais da proteína ou do tRNA.

Mudanças estruturais podem ser monitoradas por diferentes metodologias, como por exemplo, o dicroísmo circular. No entanto, quando se trata de uma interação entre uma proteína com um ácido ribonucleico, essa técnica não é a mais indicada por haver sobreposição de espectros o que pode tornar o resultado dúbio por ter que assumir a conservação como corpo rígido de uma das moléculas envolvidas.

A fim de evitar esse problema, a metodologia de espectroscopia de infravermelho (FTIR) foi empregada, uma vez que os modos normais de vibração das ligações que compõe uma proteína são distintos das que compõe uma molécula como o tRNA¹⁰³.

Inicialmente, uma amostra de SelA foi analisada por FTIR para o comparativo entre os resultados obtidos previamente da composição de estruturas secundárias da macromolécula por dicroísmo circular^{38,81} [Figura 56].

Figura 56-Espectro de FTIR. À esquerda, a curva vermelha indica a segunda derivada da banda da Amida I medida experimentalmente. Os ajustes gaussianos realizados, em verde, permitem a determinação de porcentagens de estruturas secundárias, de modo que SelA apresenta 37% de α -hélices, 20% de folhas- β , 18% de voltas, 16% de estruturas irregulares além de ser detectado 5% de agregados presentes na amostra. À direita, o dado experimental obtido seguido do tratamento com o operador laplaciano no software Origin 8.0.

O tratamento no espectro da banda da Amida I, ou seja, análise de segunda derivada do espectro obtido juntamente com o ajuste por funções gaussianas determinaram uma composição estrutural semelhante aos resultados de dicroísmo circular^{38,81} sendo 37% de α -hélices, 20% de folhas- β , 18% de voltas, 16% de estruturas irregulares além de ser detectado 5% de agregados presentes na amostra. Os valores obtidos anteriormente por dicroísmo circular indicavam 70% de α -hélices, 10% de folhas- β , 4% de voltas, 12% de regiões não estruturadas^{38, 81}. Essa discrepância nos valores, principalmente para o elemento estrutural do tipo α -hélice, deve-se ao fato de o espectro de FTIR ser dúbio para esse elemento estrutural e a amostra apresentar agregação devido a grande pressão a qual foi submetida durante o

experimento. Outra complicação deve-se ao fato de que o tratamento dos dados do dicroísmo circular ser por uma análise combinatória com uma biblioteca pequena de espectros conhecidos, não sendo o método mais confiável para a determinação de percentuais de estruturas secundárias. No entanto, os demais valores percentuais de estruturas secundárias estão dentro do esperado para a SelA.

Como não há sobreposição dos picos espectrais de uma amostra proteica com uma amostra de ácidos nucleicos, ao se analisar o espectro do complexo SelA-tRNA^{sec} seria observado mudanças de estrutura secundária em SelA na formação do complexo binário, possibilitando a análise comparativa utilizando espectro de diferença, determinando assim a taxa de mudança estrutural da proteína.

No entanto, para o complexo binário observou-se um espectro idêntico ao observado anteriormente para a amostra de SelA, o que indica não haver alteração detectável na composição de estruturas secundárias do homodecâmero quando interagente com o tRNA específico. Com isso, o modelo estrutural de SelA pode ser considerado como um corpo rígido na interação com o tRNA^{sec}.

Não foi possível fazer uma análise semelhante para mudanças estruturais no tRNA^{sec} por conta do baixo sinal de emissão dessa molécula, sendo necessária altas concentrações sendo inviáveis para a realização desse experimento.

A avaliação de mudanças estruturais na formação do complexo SelA-tRNA^{sec}-SelD utilizando FTIR, assumindo que o complexo binário não sofre nenhuma alteração estrutural durante essa interação, permitirá compreender as mudanças estruturais em SelD necessárias para ocorrer a interação desse complexo.

5.2.4 Caracterização em baixa resolução por microscopia de força atômica (AFM).

Outra maneira de caracterizar macromoléculas é utilizando técnicas estruturais de baixa resolução para a obtenção de suas dimensões externas, ou seja, determinar o tamanho do envelope molecular. Em ciências dos materiais, a técnica de microscopia de força atômica (AFM) é amplamente empregada para esse propósito, permitindo resolução próxima à escala atômica. No entanto, essa técnica ainda é pouco utilizada em estudos de moléculas biológicas pela dificuldade no preparo das amostras e na realização das medidas, uma vez que essas são extremamente sensíveis.

O Dr. Alexandre Cassago utilizando a metodologia de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) caracterizou o complexo Sela e seu complexo binário de modo à obter as dimensões estruturais do envelope molecular⁸⁰. Além disso, o complexo Sela foi previamente caracterizado por crio microscopia eletrônica de modo à possuir uma dimensão máxima média de 19 nm e uma altura de cerca de 6,5 nm⁶⁷.

A fim de investigar o homocomplexo Sela e seu complexo binário foram submetidos às análises de AFM para a caracterização de sua dimensão máxima e sua altura.

Inicialmente, os experimentos foram realizados no Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Instituto de Física de São Carlos – USP utilizando o equipamento AFM - NanoScope III (Digital Instruments) utilizando uma agulha de silício com dimensão máxima de 50 nm com coleta no “modo contato”.

As imagens obtidas foram então analisadas no software n-Surf 1.0 beta (N-surf) permitindo a determinação dos valores de interesse para os complexos Sela e Sela-tRNA^{sec} [Figura 57].

Os dados obtidos no IFSC permitiram o cálculo das dimensões médias em 47 partículas para a amostra de Sela e 28 partículas para o complexo binário.

Figura 57-Análises de AFM realizadas no IFSC. (A) Para a amostra SelA, uma das imagens obtidas utilizando a agulha de 50 nm de diâmetro e o gráfico comparativo das dimensões medidas por outras técnicas. (B) Para a amostra do complexo binário as imagens obtidas e o comparativo das dimensões, no entanto, não havendo valores de Crio-EM para esse complexo.

No entanto, o efeito de histerese juntamente com o tamanho da agulha frente à amostra fez com que os valores da maior dimensão da molécula fossem superestimados. Fez-se necessário então a utilização de uma agulha de maior precisão. Essas medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano-CNPEM) utilizando uma agulha de silício com 1 nm de diâmetro. De maneira semelhante ao discutido anteriormente, os resultados foram analisados pelos mesmos softwares [Figura 58]. Os dados obtidos no LNNano permitiram o cálculo das dimensões médias em 58 partículas para a amostra de SelA e 86 partículas para o complexo binário.

Figura 58-Análises de AFM realizadas no LNNano. (A) Para a amostra SelA, uma das imagens obtidas utilizando a agulha de 1 nm de diâmetro e o gráfico comparativo das dimensões medidas por outras técnicas. (B) Para a amostra do complexo binário as imagens obtidas e o comparativo das dimensões, no entanto, não havendo valores de Crio-EM para esse complexo.

Nas Figuras 57 e 58 é realizada uma análise comparativa com os dados obtidos pelas técnicas de SAXS⁸⁰, TEM⁶⁷, NS⁶⁴ e AFM. É notável que ocorreu a interferência do tamanho do diâmetro da agulha em demasia nos resultados preliminares das análises dos complexos, no entanto, as medidas realizadas no LNNano permitem inferir as dimensões com maior precisão e verificar a proximidade das dimensões por distintas técnicas.

As amostras de SelA apresentaram valores médios da dimensão máxima e altura, respectivamente, de 52 ± 25 nm e $4,01 \pm 0,05$ nm para os experimentos realizados no IFSC e $20,8 \pm 0,5$ nm e $3,96 \pm 0,05$ nm para os experimentos realizados no LNNano. Os valores de altura são comparáveis aos valores obtidos previamente por outras técnicas, no entanto, os valores de dimensão máxima das medidas realizadas no IFSC estão com os valores de erros demasiadamente grandes, o que torna esses resultados inconclusivos. Para favorecer essa análise, atenta-se para os valores obtidos no LNNano com a agulha de menor diâmetro, o que minimiza os valores dos erros e permite a obtenção de valores bem próximos aos encontrados nas referências^{80,67,64}.

Para o complexo SelA-tRNA^{sec} têm-se como valores de dimensão máxima e altura,

respectivamente, de $36,5 \pm 25$ nm e $3,45 \pm 0,05$ nm para os experimentos realizados no IFSC e $22,0 \pm 0,5$ nm e $3,56 \pm 0,05$ nm para os experimentos realizados no LNNano. Os valores condizem para os esperados no comparativo com outras técnicas, com ressalva para os valores de dimensão máxima obtidos em experimentos realizados no IFSC.

A ausência de dados do complexo binário pela técnica de TEM deve-se ao fato de não ter havido alguma caracterização desse complexo no trabalho de Cryo-EM de 2007⁶⁷, de onde foram retirados os valores utilizados para os comparativos.

Em suma, fica evidente o comportamento que o homodecâmero apresenta na interação com seu tRNA específico, tendo um aumento médio da dimensão máxima em 2,4 nm e diminuição da altura de 2,5 nm [Figura 59] no comparativo com todas as técnicas utilizadas para determinação desses parâmetros. Foi utilizado um cilindro como representação esquemática para facilitar a compreensão das mudanças estruturais.

Figura 59-Representação esquemática, em escala, das mudanças das dimensões. Os valores indicados são médias dos valores experimentais obtidos para cada uma das conformações.

Essa técnica será de grande valia para a validação da interação entre SelD com o complexo binário SelA-tRNA^{sec}, uma vez que as dimensões sofreram alterações e são passíveis de serem comparadas com os modelos teóricos gerados.

5.2.5 Análise em solução da existência de complexos supramoleculares por espalhamento de luz dinâmico (DLS), comprovação das micrografias de NS-EM.

Anteriormente, a Dra. Livia Manzine, em colaboração, realizou experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para a compreensão dos elevados valores de anisotropia de fluorescência observados durante seus experimentos de titulação isotérmica para análise de formação de estruturas supramoleculares de SelA e compreensão da influência do tRNA nessas estruturas³⁸.

Na seção 5.1.4 dessa dissertação, foram apresentadas as micrografias do complexo homodecamérico e do complexo binário e foi identificada a presença das estruturas supramoleculares em forma de “pilhas” ou interação “lado a lado” [Figura 38]. Outro aspecto interessante foi a não observação dessas estruturas supramoleculares nas micrografias do complexo SelA-tRNA^{sec} [Figura 37].

A fim de compreender esse comportamento em solução, foram realizados experimentos de DLS em condições similares às preparações das grades de microscopia eletrônica de transmissão para os complexos SelA e SelA-tRNA^{sec}.

Foi identificada a presença de picos correspondentes a elevadas massas moleculares para a amostra de SelA, de modo que seu aumento é gradativo com o incremento de concentração de amostra no experimento, evidenciando elevada polidispersividade da amostra [Figura 60]. Esse efeito corrobora as observações por microscopia eletrônica.

Figura 60-Análise de DLS. Avaliação da presença de complexo supramolecular em solução, (A), (B) e (C) referem-se às concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 12 μ M de SelA, respectivamente.

Em contrapartida, ao compararmos as amostras de SelA e seu complexo binário na mesma concentração [Figura 61] fica evidente a ausência de picos de massa molecular elevada, tornando a amostra monodispersa. Esse efeito também é observado nas micrografias obtidas, confirmando com o resultado prévio que era observado por TEM.

Figura 61-Comparativo entre SelA e o complexo binário. (A) Amostra SelA em 5 μ M e presença de picos de massas elevadas, indicando presença de estruturas supramoleculares. (B) Complexo binário na mesma concentração que a situação em (A). Indicativo de monodispersividade com pico único. Interessante que o valor do raio obtido é bem próximo do valor obtido por outras técnicas, $R = 9,592$ nm.

5.3 Compreensão da interação entre o complexo SelA-tRNA^{sec} com o dímero funcional do próximo parceiro proteico da via de incorporação de selenocisteínas, a enzima Selenofosfato Sintetase – SelD.

Como mencionado na introdução, o elemento selênio é altamente tóxico às células e aos organismos, tendo necessariamente uma concentração limite antes da morte celular ou do indivíduo. Desse modo, presume-se que compostos derivados desse elemento não devem ser encontrados em forma livre no meio celular, mas sim interagindo com alguma macromolecular específica de conversão ou passagem do composto de selênio.

Partindo desse pressuposto, propõe-se um modelo de interação entre a enzima Selenofosfato Sintetase (SelD) com o complexo binário (SelA-tRNA^{sec}) para a entrega *in situ* do selenofosfato necessário para a conversão Ser-Sec realizada pela enzima SelA.

Posteriormente, medidas experimentais foram realizadas para a comprovação dessa interação e compreensão da formação do complexo ternário SelA-tRNA^{sec}-SelD e, por fim, compreensão do mecanismo de interação. Todas as etapas dos estudos dessa interação foram realizadas em colaboração com o aluno Ivan Rosa e Silva durante seu projeto de mestrado⁸².

5.3.1 Análise teórica, precursora nos estudos da interação desse complexo macromolecular.

Com a obtenção dos modelos estruturais de SelA e SelA-tRNA^{sec} pensou-se na possibilidade de gerar um modelo de interação com o dímero funcional da enzima Selenofosfato Sintetase, SelD. O aluno Ivan Rosa e Silva havia obtido um modelo estrutural da enzima através de modelagem por homologia e validado por meio de técnicas biofísicas e estruturais⁸². Posteriormente a estrutura de *EcSelD* foi resolvida por Itoh e colaboradores⁷⁵.

Utilizando a plataforma *online* PathDock e a unidade básica de um tetrâmero do complexo binário SelA-tRNA^{sec} como molde de interação, foi possível obter um modelo de interação cuja equivalência de interações de cargas e superfície é notória. Impondo a composição de um pentâmero de dímeros é possível obter o modelo estrutural do decâmero interagente com os dímeros de SelD [Figura 62]. O modelo de interação foi construído assumindo que os componentes se comportam como corpos rígidos.

A partir desse modelo estrutural teórico, determina-se que seria possível a interação de 10 unidades diméricas de SelD ao complexo binário e as possíveis regiões de interface de contato na formação com complexo ternário. Além disso, pode-se determinar as dimensões do modelo como ~27 nm de dimensão máxima e ~4 nm de altura, levando em consideração as dimensões das moléculas componentes como corpos rígidos.

O modelo serviu de motivação e ajuda para os desenhos experimentais para sua validação e real comprovação da existência de uma interação para a formação desse complexo ternário.

Figura 62-Construção do modelo tridimensional. A partir do tetrâmero interagente com o tRNA, obtêm-se o complexo ternário por docagem de interação proteína-proteína utilizando o programa PathDock. A partir da unidade básica, montou-se o decâmero no programa CHIMERA 1.5.3.

5.3.2 Determinação da interação por anisotropia de fluorescência.

Para determinar a interação de SelD com o complexo binário, foram realizados experimentos de anisotropia de fluorescência com titulação isotérmica.

Como mostrado pela Dra. Lívia Manzine, o tRNA^{sec} interage com o homodecâmero de SelA no resíduo K295. Essa determinação foi realizada utilizando a metodologia de anisotropia de fluorescência onde o tRNA apresentava um fluoróforo, a fluoresceína, covalentemente ligado na extremidade 3', de modo a não interferir na interação de formação do complexo binário³⁸. Esse experimento também foi realizado para a determinação da razão estequiométrica do complexo binário em solução de 1SelA_{monômero}:1tRNA^{sec}.

Como o intuito era determinar a interação de SelD com o complexo binário já montado e, como a estequiometria correta de ligação entre tRNA^{sec} e SelA foi determinada, pode-se realizar a montagem do complexo SelA-tRNA^{sec} previamente, onde uma parcela dos tRNAs presentes na amostra continham a sonda fluorescente. A interação de formação do complexo binário foi realizada a 25° C.

Com isso, o complexo binário previamente montado tinha seus valores iniciais de anisotropia medidos para comprovação da correta interação, uma vez que esses valores de anisotropia eram conhecidos para essas condições experimentais (~80 mA). Com essa verificação, prosseguia-se com o incremento sucessivo na concentração de SelD por titulação na cubeta experimental seguido de um tempo de espera de 10 minutos antes de realizar a medida.

A curva de interação obtida é a média de três experimentos realizados sob as mesmas condições experimentais e cada ponto é média de cinco interações consecutivas dentro do mesmo experimento. O resultado foi então tratado de maneira a obtermos uma curva que obedeça ao ajuste proposto por Hill¹⁰⁸ e ajustada segundo a Equação VII [Figura 63]. Todas as concentrações utilizadas estão em valores correspondentes à concentração de monômeros de solução.

Com base no ajuste, foi possível a determinação dos parâmetros associados à cooperatividade (n) e a constante de dissociação aparente (K_d) como sendo, 1,3 e 773,68 nM, respectivamente. Esses valores refletem que a interação é não cooperativa com sítios de ligação independentes (valor de n próximo de 1¹⁰⁸) e o K_d está próximo do encontrado para os sistemas biológicos de interação entre biomoléculas na faixa de concentração do baixo micromolar⁶, o que pode evidenciar a possível interação biológica, não somente um artefato do experimento *in vitro*.

Figura 63-Curva de interação utilizando anisotropia de fluorescência. (A) Curva experimental obtida pela observação do incremento da anisotropia em função do aumento da concentração de SelD. (B) A curva foi tratada de modo ser possível o ajuste de Hill e determinação dos parâmetros n e K_d . A concentração de SelD livre é determinada pela concentração de SelD titulada subtraída da fração ligada referente a concentração de SelA-tRNA^{sec}. A fração ligada é determinada pela razão entre a subtração dos valores medidos com o inicial pela diferença entre os valores de anisotropia final e inicial. A curva é a média de três experimentos realizados sob as mesmas condições experimentais e cada ponto é média de cinco interações consecutivas dentro do mesmo experimento.

Com essa mesma metodologia foi possível determinar a estequiometria de ligação entre o dímero de SelD com o complexo binário. Titulando-se concentrações crescentes de SelD em uma amostra de 5 μM de SelA-tRNA^{sec} (10 vezes mais concentrada e cerca de 10 vezes acima da concentração ao qual encontra-se o K_d) previamente incubadas, é possível obter uma curva com a característica de uma curva estequiométrica, na qual o ponto de inflexão refere-se ao valor cujas concentrações são equimolares [Figura 64]. Novamente, a curva de interação obtida é a média de três experimentos realizados sob as mesmas condições experimentais e cada ponto é média de cinco interações consecutivas dentro do mesmo experimento.

Figura 64-Curva estequiométrica. A determinação da estequiometria de ligação é feita no ponto de inflexão da curva, ou seja, no momento que a curva altera seu comportamento. Nesse caso, a inflexão ocorre em concentração de 5000 nM de SelD titulada, indicando uma estequiometria de equimolar, uma vez que havia a mesma concentração, em monômeros, de SelA-tRNA^{sec} em solução.

Utilizando ajustes lineares para ambas as curvas separadamente, nota-se a pequena variação dos valores, ocasionando no erro pequeno e boa aproximação linear dos mesmos. A estequiometria de 1SelA_{monômero}:1tRNA^{sec} já determinada por estudo preliminares³⁸ e nesse trabalho (seção 5.1.4) iniciou a importante determinação das estequiometrias dos complexos da via de incorporação de selenocisteínas em *E. coli*. Com esses experimentos, é possível

determinar que a estequiometria de formação do complexo ternário é $1\text{SelA}_{\text{monômero}}:1\text{tRNA}^{\text{sec}}:1\text{SelD}_{\text{monômero}}$, ou $1\text{SelA}_{\text{decâmero}}:10\text{tRNA}^{\text{sec}}:5\text{SelD}_{\text{dímero}}$, uma vez que SelA é um homodecâmero e SelD um homodímero.

As razões equimolares dos componentes do complexo ternário validam o modelo de interação proposto (seção 5.3.1), que previa uma interação nessa mesma razão estequiométrica. Com isso, a formação do complexo ternário resulta na formação de uma molécula de ~1,3 MDa com dimensões nanométricas.

No entanto, os resultados anteriores que mostram a não cooperatividade dos sítios de ligação, assim como sua independência, levam a crer que o fato de haver uma ocupação total dos sítios possíveis é um artefato experimental, uma vez que dificilmente em ambiente celular deverá ocorrer, uma vez que o processo deve ser eficiente e eficaz em momento de elevada toxicidade ou necessidade de produção de selenoproteínas como algumas situações hipotéticas. Esse aspecto propõe uma dinâmica de interação que independe da presença do tRNA^{sec} em todos os sítios de SelA de maneira simultânea e, de mesmo modo, a presença de uma molécula de SelD ocupando um dos sítios não interfere nos demais.

A fim de verificar a necessidade do tRNA^{sec} na montagem do complexo ternário, experimentos de microcalorimetria foram necessários, uma vez que medidas de anisotropia de fluorescência na ausência dessa molécula não se mostraram viáveis.

5.3.3 Controle negativo da interação, técnicas de microcalorimetria empregados para os estudos de complexos.

Uma das vantagens de utilizar técnicas de microcalorimetria é o fato de não ser necessária à utilização de uma sonda específica (como no caso da anisotropia de fluorescência). São realizados experimentos de medidas diretas de troca de calor em função do tempo, no caso do ITC, ou de troca de calor em função da temperatura, caso do DSC. Com o propósito de avaliar a importância da presença do tRNA para a interação entre SelA e SelD, foram realizados experimentos utilizando essas duas metodologias.

5.3.3.1 ITC

As medidas de calorimetria de titulação isotérmica iniciais foram realizadas no equipamento VP-ITC Microcalorimeter (MicroCal) do Laboratório de Biofísica Molecular “Prof. Dr. Sérgio Mascarenhas”.

A amostra SelD foi titulada em tampão como padrão de diluição dessa molécula e, posteriormente, titulada em uma amostra de Sela [Figura 65]. Todos os experimentos realizados a 25° C e em duplicata e os dados foram tratados utilizando o software Origin 8.0 do próprio equipamento.

Figura 65-Experimentos de ITC. (A) Curva de titulação de SelD em tampão. (B) Curva de titulação tampão-tampão. (C) Resultados da titulação de SelD em Sela (dados tratados) revelam o mesmo comportamento da diluição de SelD em tampão, o que pode indicar a não interação entre essas moléculas na ausência do tRNA específico.

O equipamento mede a taxa de transferência de calor em função do tempo, sendo possível determinar interações pelo perfil da curva observada e, caso seja possível, ajustar a curva às funções que permitem determinar os parâmetros termodinâmicos do sistema estudado.

Como observado, não houve alteração entre a titulação de SelD em Sela comparado ao padrão obtido para diluição de SelD em tampão, não indicando interação entre SelD e Sela na ausência do tRNA^{sec}. Para o caso de interação, o padrão deveria ser diferente do apresentado, com um padrão sigmoidal com os dados tratados e não deveria coincidir com a diluição de SelD em tampão.

Experimentos de titulação de SelD no complexo binário foram inviáveis por conta das quantidades exorbitantes de tRNA necessária para os experimentos, naquele momento, inviáveis de serem obtidas.

Esse resultado indica a necessidade da presença do tRNA^{sec} para que haja a interação entre Sela e SelD. Biologicamente, a necessidade de entrega do selenofosfato, produto da reação catalisada por SelD, só se faz necessária para a conversão Ser-Sec, ou seja, a presença do tRNA no sítio de reconhecimento de SelD no complexo binário Sela-tRNA^{sec}.

Resultados das caracterizações do complexo binário revelam que esse complexo apresenta um decréscimo em uma de suas dimensões de 2,5 nm. Uma das hipóteses levantadas é que esse achatamento sirva de controle de interação através do impedimento estéreo que ocorre caso o tRNA não esteja presente.

Até esse ponto, não foi possível um experimento que permitisse realizar simultaneamente a avaliação da importância da presença do tRNA. Tentando solucionar esse aspecto, experimentos de DSC foram realizados.

5.3.3.2 DSC

Com o propósito de validar a hipótese levantada pelos resultados de ITC, não há interação na ausência do tRNA, e comprovar os resultados de anisotropia de fluorescência, há a formação do complexo ternário, foram realizados experimentos de calorimetria de varredura diferencial (DSC).

Esse experimento consiste no aquecimento contínuo da amostra até o seu total desenovelamento, passando por estágios como perda de estruturas oligoméricas seguida de perdas estruturais completas, nesse momento, ocorre uma grande liberação de energia que é captada pelo equipamento. A análise desses picos de desnaturação permite calcular diversos parâmetros termodinâmicos, entre eles a temperatura de *melting*, ou T_m.

A importância do T_m se dá por conta que quando uma proteína interage com um ligante, ou mesmo com outra proteína, seu T_m pode ser deslocado para valores superiores, indicando a interação¹¹⁰. O ajuste por funções gaussianas e determinação do T_m foram realizados no software NanoAnalyze (Microcal).

Desse modo, as amostras de Sela e SelD foram utilizadas como controle e parâmetros

para a determinação de seus respectivos valores de T_m [Figura 66], passíveis de serem comparados aos dados de desnaturação térmica realizados por dicroísmo circular em estudos prévios^{38,82}.

Figura 66-Experimentos de DSC para as amostra de Sela e SelD. O ajuste gaussiano permite a determinação do T_m para cada uma das moléculas como sendo 69,33° C para Sela (A) e 52,43° C para SelD (B). O perfil arrastado da curva (A) pode indicar a desestruturação dos descâmeros antes da perda do desenovelamento dos monômeros.

Os valores de T_m para Sela e SelD são, respectivamente, 69,33° C e 52,43° C por DSC, condizentes com os resultados de dicroísmo circular para Sela³⁸ e SelD⁸², respectivamente.

Com essas referências, pode-se então determinar o T_m dos demais complexos possíveis: Sela-tRNA^{sec}, Sela-SelD e Sela-tRNA^{sec}-SelD [Figura 67]. Logo, pode-se inferir a interação ou não na formação de cada complexo mencionado.

Figura 67-Experimentos de DSC para os complexos. (A) Sela-tRNA^{sec}, não apresentando um deslocamento de T_m significativo. (B) Sela-SelD, não havendo deslocamento significativo para nem para os picos referentes à SelD como para Sela o que é indício de não interação. (C) Complexo ternário, o deslocamento significativo observado para o pico referente à SelD indica que foi necessário maior energia para sua desnaturação, o que pode ser indicativo de formação do complexo, uma vez que esse o blindaria uma de suas superfícies, dificultando assim seu desenovelamento e, conseqüentemente, aumentando o valor de T_m .

Observando os resultados da Figura 67 e na Tabela 4, podemos perceber o deslocamento do Tm de SelD em 0,9° C quando presente no complexo ternário, fato que não ocorre para a amostra SelA-SelD, o que indica a não interação nessa situação e corrobora com os resultados de necessidade da presença do tRNA para a formação do complexo.

Esse deslocamento pode estar associado a “proteção” que o complexo binário oferece para SelD, protegendo sua superfície e sendo necessária uma temperatura maior para desligar do complexo antes de desnaturá-la.

Vale ressaltar que os pequenos valores de deslocamento de Tm de SelA mesmo nos complexos pode estar relacionada com sua conformação oligomérica. Por ser um decâmero o pico fica mais alargado que os demais, não possibilitando uma definição precisa da posição do máximo de desnaturação, fato que não ocorre para SelD, que por ser dimérica tem seu Tm determinado com maior precisão.

Tabela 4 - Resultados das análises de DSC. Os valores são as médias de duplicatas experimentais e os erros calculados por desvio médio dos resultados obtidos.

Complexo	ΔT_m (° C)
SelA-tRNA ^{sec}	0,18 ± 0,06
SelA-SelD (pico da SelD)	0,097 ± 0,008
SelA-SelD (pico da SelA)	0,15 ± 0,07
SelA-tRNA ^{sec} -SelD (pico da SelD)	0,86 ± 0,05
SelA-tRNA ^{sec} -SelD (pico da SelA)	0,307 ± 0,008

O maior deslocamento de Tm observado é para o pico de SelD na presença do tRNA, deste modo, a possibilidade da hipótese da necessidade da presença do tRNA para a interação fica mais próxima de ser afirmada categoricamente. Mas, dando a interação como certa, realizaram-se experimentos com fins de caracterização estrutural do complexo ternário.

5.3.4 Visualização do complexo por microscopia eletrônica de transmissão – *negative stain* (NS-EM), necessidade de *crosslinking* químico.

Por se tratar de um complexo de elevada massa molecular, as técnicas de TEM são até certo ponto simples de serem empregadas. Partindo desse pressuposto, e da expertise adquirida com as amostras de SelA e seu complexo binário, amostras de SelA-tRNA^{sec}-SelD foram preparadas com contraste negativo e analisadas nos microscópios eletrônicos do LNNano-CNPEM, com o intuito de analisar a morfologia da molécula corroborando com o modelo teórico gerado.

Foram preparadas mais de 30 amostras com diferentes concentrações e diferentes tempos de interação com a grade de carbono e lavagens, no entanto, o resultado foi sempre o mesmo, as grades estavam recobertas com aparência irregular e sem identificações de partículas [Figura 68].

Figura 68-Micrografia da amostra do complexo ternário. Não foi possível a visualização de nenhuma partícula, além de apresentar um padrão de fundo diferente do observado para os demais complexo o que leva a crer que SelD possa se desprender do complexo e poluir a grade, impossibilitando uma visualização clara da mesma.

A hipótese levantada é que a grade estava sendo recoberta pela proteína SelD que estava se desprendendo do complexo ternário montado. Para elucidar essa questão, uma grade somente da amostra SelD foi preparada e apresentou o mesmo perfil do observado

anteriormente.

Para eliminar o efeito de desassociação do complexo ternário, a amostra foi submetida a ensaios de *crosslinking* químico com glutaraldeído.

Foram realizados vários ensaios variando tempo e concentração de *crosslinker* até obter uma condição adequada de 0,2% de *crosslinker* por 60 minutos a 25° C [Figura 69].

Figura 69-Gel de SDS-PAGE 5% dos resultados de *cross-linking* químico. As concentrações variadas de glutaraldeído estão indicadas e os resultados mais satisfatório, indicados pelas setas, foram utilizados na cromatografia de exclusão molecular.

Essa amostra foi então submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna *Sephacryl 500 (GE)*, resultando em um pico único com massa elevada saindo ainda no “volume morto” da coluna. Essa amostra foi então preparada para o NS-EM novamente, possibilitando a visualização de partículas que, acredita-se, serem do complexo ternário Sela-tRNA^{sec}-SelD [Figura 70].

Figura 70-Micrografia do complexo ternário *crosslinker*. Fica evidente a melhora da grade com a amostra *crosslinkada*, permitindo a identificação de partículas com tamanho e morfologia semelhantes às esperadas para esse complexo.

A amostra apresenta partículas que devem ser agregados que não foram eliminados na cromatografia, no entanto, apresenta também partículas com morfologia semelhante à esperada pelo modelo teórico. Melhorias no preparo dessa amostra para TEM de alta resolução estão em procedimento na continuidade desse projeto.

5.3.5 Mapeamento das interfaces de interação e variação das estruturas secundárias na formação do complexo ternário

Assim como o realizado para as amostras SelA e SelA-tRNA^{sec}, o mapeamentos das regiões de interface pela metodologia de troca hidrogênio-deutério auxilia a compreensão e importância das regiões de interação entre essas moléculas.

Analogamente ao realizado para as demais construções já analisadas na seção 5.2.2, o complexo ternário foi incubado na presença de deutério, no entanto, somente para um tempo fixo de 30 minutos de incorporação seguido da proteólise com pepsina e análise no

espectrômetro de massas. Lembrando que nesse experimento além dos peptídeos referentes à proteína Sela foram encontrados peptídeos referentes à ambas as amostras proteicas presentes no complexo.

Analisando os resultados de Sela, encontrou-se 24 peptídeos únicos referentes a uma cobertura de 58% da proteína, ou 270 resíduos. A taxa de incorporação máxima de deutério foi de 32,4%, maior que a taxa de incorporação para os outros complexos por motivos óbvios da presença de uma quantidade maior de regiões no qual a troca hidrogênio-deutério é passível de ocorrer.

A Figura 71 retrata a sequência de Sela com as regiões, indicadas pelas cores, identificadas e suas respectivas incorporações de deutério.

Figura 71-Sequência Sela com plote da incorporação do complexo ternário. A sequência de Sela com a predição de estruturas secundárias, as sequências sublinhadas indicam os peptídeos medidos. A escala de cores indica as diferentes faixas de incorporação de deutério: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). O resíduo catalítico K295 está em roxo.

Como destaque, algumas sequências pertencentes ao domínio N-terminal tiveram suas incorporações minimizadas e a região entre os resíduos 305-321, que contem o pareamento de resíduos possíveis de realização de pontes salinas, continuaram sem apresentar incorporação.

De maneira semelhante ao realizado anteriormente, foi feito o plot da escala de incorporações de deutério no modelo estrutural gerado [Figura 72] favorecendo a identificação de regiões importantes e melhor visualização do complexo estruturado.

Figura 72-Plote das taxas de incorporação do complexo ternário nos modelos estruturais de Sela e seu N-terminal. Para o tempo de incorporação de 30 minutos, os modelos de Sela (à esquerda) e de seu Domínio N-terminal (à direita) foram coloridos seguindo a legenda: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho). Indicando possíveis regiões flexíveis e regiões de interação na formação do dímero ou decâmero.

No domínio Sela, é interessante ressaltar a diminuição da taxa de incorporação de deutério na região próxima ao C-terminal da molécula, justamente onde é prevista a interação de SelD pelos modelos teóricos [Figura 62]. No domínio N-terminal chama a atenção uma porção que tem diminuída sua incorporação, podendo ser importante para a interação com seu parceiro proteico.

A fim de favorecer a compreensão final desse sistema, um resumo geral dos experimentos de HDEx, mostrando o plot de todas as sequências e suas evoluções temporais, Figura 73 Também foi construído um comparativo do plot realizado nos modelos estruturais

Os resultados de HDEx para os peptídeos de SelD analisados revela a cobertura em uma de suas interfaces, justamente na posição de seu domínio N-terminal, região essa que possui seus resíduos catalíticos⁸². Esse posicionamento permite a proximidade dos sítios ativos de ambas as enzimas, o que é facilmente interpretado pela necessidade de entrega do selenofosfato diretamente para o sítio de conversão da SelA. Esses resultados estão presentes na dissertação de mestrado do aluno Ivan Rosa e Silva⁸² e um resumo na Figura 90.

Figura 74-Comparativo dos modelos estruturas de SslA e de seu domínio N-terminal para o tempo de 30 minutos de incorporação de deutério. (A) SslA, região indica a possível região de interação para formação da unidade dimérica. (B) SslA-tRNA^{sec}, as regiões indicadas sofreram grande redução na taxa de incorporação de deutério após a adição do tRNA, indicando possíveis regiões ocluídas por essa molécula. (C) SslA-tRNA^{sec}-SslD, de maneira análoga, as regiões indicadas sofreram grande redução na taxa de incorporação de deutério após a adição de SslD, indicando possíveis regiões ocluídas por essa molécula. A escala de cores indica as diferentes faixas de incorporação de deutério: 0-14% (azul); 15-24% (ciano); 25-34% (verde claro); 35-49% (verde escuro); 50-69% (amarelo); 70-84% (laranja) e 85-100% (vermelho).

Resta ainda à compreensão se ocorrem mudanças conformacionais na montagem desse complexo. Sendo assim, medidas de FTIR foram fundamentais, uma vez que, assumindo que SslA não sofre mudanças conformacionais durante a interação com SslD (assim como não sofre na interação com tRNA^{sec}), foi possível analisar as mudanças de estruturas secundárias em SslD.

Analogamente ao procedimento experimental mencionado na seção 5.2.3, a amostra de SslD foi submetida a análise por FTIR e a análise dos picos Amida I e Amida II possibilitaram a determinação dos percentuais de elementos de estruturas secundárias por ajustes de funções gaussianas [Figura 75].

Figura 75-Espectro de FTIR. À esquerda, a curva vermelha indica a segunda derivada da banda da Amida I medida experimentalmente. Os ajustes gaussianos realizados, em verde, permitem a determinação de porcentagens de estruturas secundárias, de modo que SelD apresenta 37% de α -hélices, 41% de folhas- β , 14% de voltas, e 6% de folha anti-paralela. À direita, o espectro experimental obtido seguido do tratamento de dados com o operador laplaciano no software Origin 8.0.

Posteriormente, medidas do complexo SelA-tRNA^{sec}-SelD procederam de maneira análoga. Para os espectros obtidos para as amostras SelD e SelD presente no complexo SelA-tRNA^{sec}-SelD, foi realizada a análise denominada “espectro de diferença” que consiste na subtração do pico da Amida I, obtido para SelD no complexo ternário, do pico equivalente da amostra de SelD livre, obtendo um pico de Amida I agora determinado de SelD_{complexo}, normalizados pela concentração molar. Como assumimos que SelA não sofre mudança conformacional durante essa interação e como os modos normais do tRNA não interfere na banda da Amida I ou da Amida II, temos que esse pico resultante da diferença desses dois espectros traz a informação da variação de estruturas secundárias de SelD no complexo ternário [Figura 76].

O tratamento segue de maneira análoga ao realizado anteriormente para os outros espectros obtidos, sendo sua segunda derivada ajustada por funções gaussianas.

Figura 76-Espectro de diferença. Realizando a análise por essa metodologia é possível identificar o mínimo de 1653 cm⁻¹, refletindo em perda de estrutura do tipo hélice por estiramento. Em destaque, a diferença dos espectros experimentais observados para SelD livre (vermelho) e SelD_{complexo} (preto).

O mínimo observado em 1653 cm⁻¹ é descrito na literatura como perda de estruturas em hélices, ou seja, uma α -hélice é esticada de modo a se desenrolar. Interessantemente, ao analisar a estrutura de SelD, existem estruturas em forma de hélices que unem os domínios lobulares ao domínio central. Extrapolando as análises com a ajuda do modelo estrutural gerado e em conjunto com os resultado de HDEX pode-se inferir que os domínios lobulares de SelD podem cobrir o complexo binário Sela-tRNA^{sec} durante a interação, o que minimizaria riscos de perder compostos com selênio, em forma livre, para o ambiente celular [Figura 77].

Figura 77-Representação esquemática, não em escala, da hipótese gerada para a interação. SelD pode ser compreendida como uma dímero que possui três domínios globulares ligados por uma α -hélice e uma volta. Portanto, juntando as informações de HDEx e FTIR do complexo ternário, bem como a dependência do tRNA para a ligação, resultados vindo da anisotropia de fluorescência e das calorimetrias, pode-se inferir que a interação ocorre pela mudança estrutural do complexo binário, permitindo a interação de SelD. Essa por sua vez, tem a perda de um elemento estrutural em hélice para permitir a interação e formação do complexo ternário.

5.3.6 Caracterização em baixa resolução por microscopia de força atômica (AFM).

As amostras do complexo ternário não foram, até o momento, caracterizadas com respeito as suas dimensões, uma vez que as amostras de NS-EM estavam polidispersas. Havendo somente as dimensões propostas pelo modelo estrutural gerado. Sendo assim, experimentos de AFM realizados no LNNano possibilitaram a determinação das dimensões aparentes do complexo ternário [Figura 78].

Figura 78-Análises de AFM realizadas no LNNano. Para a amostra do complexo ternário, é mostrado duas das imagens obtidas utilizando a agulha de 1 nm de diâmetro.

Os resultados são condizentes com o modelo teórico gerado, ou seja, dimensão máxima média de $27,04 \pm 0,05$ nm e altura média de $4,02 \pm 0,05$ nm. As dimensões foram obtidas pelas médias dos valores de 58 partículas únicas identificadas.

5.3.7 Estudos de complexos por crio microscopia eletrônica.

Por fim, por se tratar de complexos macromoleculares em escala nanométrica uma das melhores abordagens para obtenção de modelos estruturais de alta resolução é a crio microscopia eletrônica de transmissão (Cryo-EM). Essa técnica permite, atualmente, atingir faixas de resolução atômica com a utilização de volume e concentração bem inferiores a outras técnicas estruturais.

Em colaboração com os Drs. Rodrigo Villares Portugal e Jefferson Bettini, tentativas de padronização do preparo criogênico foram iniciado no LNNano utilizando as amostras Sela, Sela-tRNA^{sec} e Sela-tRNA^{sec}-SelD-*crosslinker*.

Aproximadamente 30 grades foram testadas com variação dos parâmetros de preparação no sistema Vitrobot (FEI). As melhores imagens obtidas foram para o complexo Sela e estão representadas na Figura 79, não sendo possível, naquele momento, a realização de uma coleta completa, somente captação de algumas imagens.

Figura 79-Micrografias eletrônicas obtidas em Microscópio JEOL 2100 operando em 200 kV. Amostra de Crio-EM de SclA, possível determinação de polidispersividade, no entanto, evidências de determinação das partículas proteicas, evidenciando o correto preparo da amostra nas condições criogênicas, além de serem uma das primeiras de Crio-EM coletadas no país.

Com os parâmetros de preparo de amostras praticamente estabelecidos, as amostras foram enviadas para o *Netherlands Center of Nanoscopy* (NeCEN) associado à *Universiteit Leiden*, Holanda. Em colaboração com o Prof. Dr. Marin van Heel e o Dr. Sacha de Carlo, as amostras SclA e o complexo ternário tiveram seus preparados aprimorados e foram enviadas para coleta em alta resolução utilizando o microscópio Titan Krios (FEI). Essas coletas de dados resultaram em cerca de 1 TB de dados coletados. A Figura 80 retrata uma das coletas de dados realizadas no NeCEN.

Figura 80-Micrografias eletrônicas obtidas em Microscópio Titan Krio - NeCEN. (A) Amostra de Cryo-EM de Sela. (B) Início do processamento dos conjuntos de dados coletados, primeiras tentativas de correção do CTF das imagens coletadas.

A morfologia das partículas continuou sendo a mesma, indicando que as amostras não sofreram danos com a viagem ou com o congelamento. Os dados coletados estão sendo processados em conjunto com o Prof. Dr. van Heel e o Dr. Rodrigo Portugal e são parte do planejamento das atividades futuras.

Capítulo VI
CONCLUSÕES OBTIDAS

*“Não existe no mundo nada mais poderoso que uma ideia
para a qual tenha chegado sua hora.”*

Victor-Marie Hugo

26 de fevereiro de 1802 – 22 de maio de 1885

Poeta francês

Os resultados referentes à estequiometria de interação entre a enzima homodecamérica SelA com seu ligante específico, tRNA^{sec}, veio corroborar os resultados previamente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa³⁸ e se contrapondo com o descrito nas referências bibliográficas⁶⁴.

A importância da determinação da estequiometria correta de 1SelA_{decâmero}:10tRNA^{sec} permite inferir os reais motivos de qual a funcionalidade de um decâmero e, porque esse complexo foi substituído evolutivamente por outras enzimas em conformações oligoméricas mais simples, como dímeros. Os resultados prévios de interação com o tRNA^{sec} mostram que não há cooperatividade na interação, tornando dispensável a ocupação total dos sítios, afirmação essa corroborada pelos dados de microscopia eletrônica onde é possível determinar partículas com ocupação incompleta. A importância sugerida para o decâmero é que, como existem poucas SelAs no ambiente celular e o tRNA^{sec} é extremamente raro, essa enzima deve servir de reservatório, aguardando o momento de estresse celular pela presença de selênio ou necessidade de selenoproteínas para realizar a conversão Ser-Sec. A hipótese levantada é que o decâmero é energeticamente custoso, sendo gradativamente substituído por dímeros na escala evolutiva. Além disso, os resultados de correta estequiometria vem favorecer estudos estruturais por técnicas de cristalografia e de Cryo-EM utilizando a correção proporcional dos componentes do complexo no preparo das amostras.

As construções dos modelos teóricos serviram de motivação para a realização dos demais experimentos que, por sua vez, tiveram a funcionalidade de validação da construção desse modelo. Os experimentos de HDEx permitiram inferir as regiões de interface, evidenciando uma interface de dimerização por pontes salinas mais estável que as interfaces de decamerização, essas mantidas por pequenas regiões de elevada hidrofobicidade. As regiões identificadas como interação do tRNA específico foram oclusas o que permitiu a validação do correto ajuste dessa molécula no modelo e compreensão da densidade em forma de estrela encontra nas análises de 1992⁶⁴.

A compreensão das grandes alterações conformacionais na interação com o tRNA^{sec}, na ordem de nanômetros (aumento da dimensão máxima em 2,4 nm e diminuição da altura de 2,5 nm), e ausência de mudanças em sua estrutura secundária, observada pela conservação dos espectros de FTIR, é algo surpreendente, uma vez que a molécula é obrigada a se ajustar após a interação sem perdas de elementos estruturais. Fica evidente a elevada cristabilidade da molécula, no entanto, sem obtenção de padrão de difração. As análises de DLS e NS-EM para SelA revelam que, apesar da amostra apresentar elevado grau de pureza, existe um elevado

grau de polidispersividade da amostra. Essas estruturas supramoleculares regulares em forma de “pilha” e de interações “lado a lado” são dependentes da concentração, o que leva a crer que os cristais têm sua nucleação e crescimentos prejudicados por esses elementos. Além disso, o N-terminal se apresenta como uma região flexível, o que dificulta as coletas de dados por difração de raios-X.

Com respeito ao domínio N-terminal único em bactérias, é importante ressaltar sua aparente importância na formação dos decâmeros e interação com o tRNA^{sec}, resultados esses observados pelo aparecimento de regiões oclusas na troca hidrogênio-deutério na presença do tRNA e uma pequena sequência que se manteve sem incorporação durante todos os experimentos.

Os resultados referentes à interação entre o complexo binário, Sela-tRNA^{sec}, com a enzima dimérica Selenofosfato Sintetase, SelD, que é a responsável pela entrega do composto de selênio necessário para a conversão Ser-Sec, mostram que existe a interação em constantes biológicas, ~700 nM, e que não existe cooperatividade na interação, sendo assim, a interação ocorre em sítios de ligação independentes. Esse resultado faz sentido dentro da hipótese que Sela serviria como reservatório de tRNAs raros. Além disso, a determinação da estequiometria de 1Sela_{decâmero}:10tRNA^{sec}:5SelD_{dímero} colabora com o modelo construído para o complexo ternário, revelando a proximidade dos sítios ativos de ambas as enzimas.

Os experimentos de HDEX e FTIR vieram a colaborar com os modelos teóricos e mostrar que existe uma mudança estrutural de perda de hélices em SelD para possibilitar a interação pela movimentação dos domínio lobulares nas extremidades da enzima. O complexo foi caracterizado por NS-EM, utilizando *crosslinking* químico, e por AFM, revelando mudanças na morfologia do complexo conhecido, Sela-tRNA^{sec}, e mudanças em suas dimensões (dimensão máxima de 27 nm e altura de 4 nm).

Por fim, medidas microcalorimétricas de ITC e DSC evidenciaram a dependência da presença do tRNA^{sec} para que ocorra a montagem do complexo ternário, Sela-tRNA^{sec}-SelD, o que permitiu a elaboração de uma hipótese de interação e reconhecimento baseada na mudança conformacional sofrida pelo complexo Sela-tRNA^{sec}, o que possibilitaria a interação de SelD para a entrega do selenofosfato, não permitindo existir compostos de selênio livres no ambiente celular e servindo como reconhecimento da presença ou não do tRNA para que ocorra o conversão Ser-Sec.

Os resultados prévios de Cryo-EM são indicativos da real possibilidade de obtenção de modelos estruturais em alta resolução dos três complexos (Sela, Sela-tRNA^{sec}, Sela-tRNA^{sec}-SelD) utilizando essa metodologia.

Capítulo VII
PERSPECTIVAS

"O que temos que aprender a fazer, aprendemos fazendo."

Aristóteles

384 a.C. - 322 a.C.

Filósofo

Como principais perspectivas de continuidade desse projeto, temos:

A real compreensão da importância do domínio N-terminal, realizando mutações de substituição dos resíduos aparentemente responsáveis pela decamerização e sua completa deleção. O propósito é analisar a influência na conformação oligomérica da enzima e sua funcionalidade no reconhecimento de interação com o tRNA^{sec}. Como controle dessas construções truncadas, será realizada construção mesclada entre o domínio N-terminal de *E. coli* com a enzima putativa dimérica SelA de *M. jannaschii* com o intuito de análises dos resultados de oligomerização e interação com o tRNA específico.

Paralelamente, mutações na hélice de SelD que perde estrutura na interação, tornando-a rígida e verificando se ocorre a interação. Além de novas tentativas de experimentos de ITC com a presença de tRNA^{sec} com o propósito de obtenção de uma curva característica de ligação e, assim determinar os parâmetros energéticos da interação.

A resolução estrutural por Cryo-EM dos complexos já coletados no NeCEN e a otimização do preparo de amostra para o complexo binário.

Assim como houve a hipótese inicial de interação e reconhecimento de SelD no complexo binário, existe a possibilidade de interação com o próximo elemento da via de incorporação de selenocisteínas, o fator de elongação específico, SelB. Analogamente ao realizado nesse trabalho, seriam estudadas as condições de reconhecimento para a interação e tentativa de compreensão do modelo de reconhecimento e interação para o complexo SelA-tRNA^{sec}-SelB.

REFERÊNCIAS

"Me preparei e algum dia terei minha oportunidade."

Abraham Lincoln

12 de fevereiro de 1809 – 15 de abril de 1865

16º Presidente americano

- 1 WAKL, M.C. et al. Macromolecular complex. **Research Perspectives of the Max Planck Society**, v.34, n. 1, p. 30-31, 2010.
- 2 ALBERTS, B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 291-294, 1998.
- 3 PEREIRA-LEAL, J. B.; LEVY, E. D.; TEICHMANN, S. A. The origins and evolution of functional modules: lessons from protein complexes. **Philosophical Transactions Royal Society B**, v. 361, p. 507–517, 2006. DOI: 10.1098/rstb.2005.1807
- 4 JONES, S.; THORNTON, J. M. Principles of protein-protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, n. 1, p. 13-20, 1996.
- 5 ANDERSSON, H. O.; FRIDBORG, K.; LÖWGREN, S.; ALTERMAN, M.; MÜHLMAN, A.; BJÖRSNE, M.; GARG, N.; KVARNSTRÖM, I. et al. Optimization of P1-P3 groups in symmetric and asymmetric HIV-1 protease inhibitors. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 270, n. 8, p. 1746–1758, 2003.
- 6 SERRÃO, V. H. B.; ALESSANDRO, F.; CALDAS, V. E.; MARÇAL, R. L.; PEREIRA, H. D.; THIEMANN, O. H.; GARRATT, R. C. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. **FEBS Letters**, v.24, p. 3868-3873, 2011. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.043. Epub 2011 Nov 3.
- 7 ROYER Jr., W. E.; SHARMAL, H.; STRAND, K.; KNAPP, J. E.; BHYRAVBHATLA, B. *Lumbricus erythrocrutorin* at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. **Structure**, v. 14, n. 7, p. 1167–1177, 2006.
- 8 PEDERSEN, P. L.; AMZEL, L. M. ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. **Biological Chemistry**, v. 268, n. 14, p. 9937-9940, 1993.
- 9 MORAS, D. et al. Aminoacyl-tRNA synthetases. **Current Opinions in Structural Biology.**, v. 2, n. 1, p. 138-142, 1992.
- 10 HARRISON, S. C. et al. A structural taxonomy of DNA-binding domains. **Nature**, v. 353, p. 715-719, 1991. DOI:10.1038/353715a0.
- 11 JONES, S.; DALEY, D. T. A.; LUSCOMBE, N. M.; BERMAN, H. M.; THORNTON, J. M. Protein-RNA interactions: a structural analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 4, 943-

954, 2001.

12 BAN, N.; NISSEN, P.; HANSEN, J.; MOORE, P.B.; STEITZ, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 905-920, 2000.

13 WIMBERLY, B. T.; BRODERSEN, D. E.; CLEMONS, W. M.; MORGAN-WARREN, R. J.; CARTER, A. P.; VONRHEIN, C.; HARTSCH, T.; RAMAKRISHNAN, V. Structure of 30S ribosomal subunit. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 327-339, 2000.

14 GAVIN, A. C.; et al. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 123-124, 2002.

15 PARKINSON, G.; WILSON, C.; EBRIGHT, A. G. Y. W.; EBRIGHT, R. E.; BERMAN, H. M. Structure of the CAP-DNA complex at 2.5 Å resolution: a complete picture of the protein-DNA interface. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, n. 1, p. 395-408, 1996.

16 ROULD, M. A.; PERONA, J. J.; SÖLL, D.; STEITZ, T. A. Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8 Å resolution. **Science**, v. 246, n. 4934, p. 1135-1142, 1989.

17 WESSJOHANN, L. A.; SCHNEIDER, A.; ABBAS, M.; BRANDT, W. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 997-1006, 2007.

18 MOXON, A. L.; RHIAN, M. Selenium poisoning. **Physiological Reviews**, v. 23, n. 4, p. 305-337, 1943.

19 STADTMAN, T. C. Selenoproteins-tracing the role of a trace element in protein function. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. e421, 2005.

20 STADTMAN, T. C. Selenium biochemistry. **Science**, v. 183, n. 128, p. 915-922, 1974.

21 JOHANSSON, L.; GAFVELIN, G.; ARNER, E. S. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 1-13, 2005.

22 DUFFIELD, A. J.; THOMSON, C. D.; HILL, K. E.; WILLIAMS, S. An estimation of selenium requirements for New Zealanders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 896-903, 1999.

- 23 RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 356, n. 9225, p. 233-241, 2000.

- 24 LEVANDER, O. A.; BECK, M. A. Interacting nutritional and infectious etiologies of Keshan disease. Insights from coxsackie virus B-induced myocarditis in mice deficient in selenium or vitamin E. **Biological Trace Element Research**, v. 56, n. 1, p. 5-21, 1997.

- 25 BURTON Jr., G. A.; GIDDINGS, T. H.; DeBRINE, P.; FALL, R. High incidence of selenite-resistant bacteria from a site polluted with selenium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 185-188, 1987.

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

- 27 BOCK, A.; STADTMAN, T. C. Selenocysteine, a highly specific component of certain enzymes, is incorporated by a UGA-directed co-translational mechanism. **Biofactors**, v. 1, n. 3, p. 245-250, 1988.

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

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

- 30 BÖCK, A. Selenium metabolism in bacteria. In: HATFIELD, D. L. (Ed). **Selenium: its molecular biology and role in human health**. Norwood, MA: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 7-22.

- 31 SELENOCYSTEINE. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Selenocysteine>>. Acesso: em 20.dez.2012.

- 32 STADTMAN, T. C. Selenocysteine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 83-100, 1996. DOI: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073318.

- 33 LEINFELDER, W.; FORCHHAMMER, K.; ZINONI, F.; SAWERS, G.; MANDRAND-BERTHELOT, M. A.; BOCK, A. *Escherichia coli* genes whose products are involved in selenium metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 2, p. 540-546, 1988.

- 34 BARANOV, P. V.; GESTELAND, R. F.; ATKINS, J. F. Recoding: translational

bifurcations in gene expression. **Gene**, v. 286, n. 2, p. 187-201, 2002.

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

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

37 ROTHER, M.; RESCH, A.; GARDNER, W. L.; WHITMAN, W. B.; BOCK, A. Heterologous expression of archaeal selenoprotein genes directed by the SECIS element located in the 3' non-translated region. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 900-908, 2001.

38 MANZINE, L. R. **Identificação de elementos estruturais no tRNA^{sec_{uca}} determinantes da ligação com proteínas** 2012. p 159. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos - USP, São Carlos, 2012.

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

40 NELSON, D. L. COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**, 4th ed. New York, Worth Publishers. 2004. p. 330.

41 MIHARA, H.; KURIHARA, T.; WATANABE, T.; YOSHIMURA, T.; ESAKI, N. cDNA cloning, purification, and characterization of mouse liver selenocysteine lyase. Candidate for selenium delivery protein in selenoprotein synthesis. **The Journal of Biological chemistry**, v. 275, n. 9, p. 6195-6200, 2000.

42 GLASS, R. S.; SINGH, W. P.; JUNG, W.; VERES, Z.; SCHOLZ, T. D.; STADTMAN, T. C. Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12555-12559, 1993.

43 FISCHER, N.; PALESKAVA, A.; GROMADSKI, K. B.; KONEVEGA, A. L.; WAHL, M. C.; STARK, H.; RODNINA, M. V. Towards understanding selenocysteine incorporation into bacterial proteins. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 1061-1067, 2007.

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

- 45 SELMER, M.; SU, X. D. Crystal structure of an mRNA-binding fragment of *Moorella thermoacetica* elongation factor SelB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 15, p. 4145-4153, 2002.
- 46 THANBICHLER, M.; BOCK, A. Functional analysis of prokaryotic SELB proteins. **Biofactors**, v. 14, n. 1-4, p. 53-59, 2001.
- 47 ITOH, Y.; CHIBA, S.; SEKINE, S.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of human selenocysteine tRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 18, p. 6259-6268, 2009.
- 48 NOINAJ, N.; WATTANASAK, R.; LEE, D.; WALLY, J. L.; PISZCZEK, G.; CHOCK, P. B.; SATDTMAN, T. C.; BUCHANAN, S. K. Structural insights into the catalytic mechanism of *Escherichia coli* selenophosphate synthetase. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 499-508, 2012.
- 49 SOLER, N.; FOURMY, D.; YOSHIKAWA, S. structural insight into a molecular switch in tandem winged-helix motifs from elongation factor SelB. **Journal Molecular Biology**, v. 370, n. 4, p. 728-741, 2007.
- 50 XU, X. M.; CARLSON, B. A.; IRONS, R.; MIX, H.; ZHONG, N.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **The Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 115-120, 2007.
- 51 XU, X. M.; CARLSON, B. A.; MIX, H.; ZHANG, Y.; SAIRA, K.; GLASS, R. S.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N.; HATFIELD, D. L. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. **PLoS Biology**, v. 5, n. 1, p. e4, 2007.
- 52 KAISER, J. T.; GROMADSKI, K.; ROTHER, M.; ENGERHARDT, H.; RODNINA, M. V.; WAHL, M. C. Structural and functional investigation of a putative archaeal selenocysteine synthase. **Biochemistry**, v. 44, n. 40, p. 13315-13327, 2005.
- 53 ARAISO, Y.; SHERRER, R. L.; ISHITANI, R.; HO, J. M. L.; SOLL, D. NUREKI, O. Structure of a tRNA-dependent kinase essential for selenocysteine decoding. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 3, p. 1034-1041, 2011.
- 54 ARAISO, Y.; PALIOURA, S.; ISHITANI, R.; SHERRER R. L.; O'DONOGHUE, P.; YUAN, J.; OSHIKANE, H.; DOMAE, N.; DeFRANCO, J.; SOLL, D.; NUREKI, O. Structural insights into RNA-dependent eukaryal and archaeal selenocysteine formation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 4, p. 1187-1199, 2008.

- 55 COPELAND, P. R.; DRISCOLL, D. M. Purification, redox sensitivity, and RNA binding properties of SECIS-binding protein 2, a protein involved in selenoprotein biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 36, p. 25447-25454, 1999.
- 56 COPELAND, P. R.; FLETCHER, J. E.; CARLSON, B. A.; HATFIELD, D. L.; DRISCOLL, D. M. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 2, p. 306-314, 2000.
- 57 FAGEGALTIER, D.; HUBERT, N.; YAMADA, K.; MIZUTANI, T.; CARBON, P.; KROL, A. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 17, p. 4796-4805, 2000.
- 58 TUJEBAJEVA, R. M.; COPELAND, P. R.; XU, X. M.; CARLSON, B. A.; HARNEY, J. W.; DRISCOLL, D. M.; HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. **EMBO Reports**, v. 1, n. 2, p. 158-163, 2000.
- 59 COPELAND, P. R.; STEPANIK, V. A.; DRISCOLL, D. M. Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 5, p. 1491-1498, 2001.
- 60 GANICHKIN, O. M.; ANEDCHENKO, E. A.; WAHL, M. C. crystal structure analysis reveals functional flexibility in the selenocysteine-specific tRNA from Mouse. **PLoS One**, v. 6, n. 5, e20032, 2011.
- 61 PALIOURA, S.; SHERRER R. L.; STEITZ, T. A.; SOLL, D.; SIMONOVIC, M. The human SepSecS-tRNA^{Sec} Complex reveals the mechanism of selenocysteine formation. **Science**, v. 325, n. 5938, p. 321-325, 2009.
- 62 TORMAY, P.; WILTING, R.; LOTTSPEICH, F.; MEHTA, P. K.; CHRISTEN, P.; BOCK, A. Bacterial selenocysteine synthase--structural and functional properties. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 254, n. 3, p. 655-661, 1998.
- 63 FORCHHAMMER, K.; LEINFELDER, W.; BOESMILLER, K.; VEPREK, B.; BOCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the gene (selA) and purification of the protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6318-6323, 1991.
- 64 ENGELHARDT, H.; FORCHHAMMER, K.; MULLER, S.; GOLDIE, K. N.; BOCK, A. Structure of selenocysteine synthase from *Escherichia coli* and location of tRNA in the seryl-tRNA(sec)-enzyme complex. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 23, p. 3461-3467, 1992.

- 65 FORCHHAMMER, K.; BOCK, A. Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. analysis of the reaction sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6324-6328, 1991.
- 66 HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N. **Selenium: its molecular biology and role in human health**. New York: Springer- Verlag, 2006.
- 67 FISCHER, N.; PALESKAVA, A.; GROMADSKI, K. B.; KONEVEGA, A. L.; WAHL, M. C.; STARK, H.; RODNINA, M. V. Towards understanding selenocysteine incorporation into bacterial proteins. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 1061–1067, 2007.
- 68 SCHON, A.; BOCK, A.; OTT, G.; SPRINZL, M.; SOLL, D. The selenocysteine-inserting opal suppressor serine tRNA from *E. coli* is highly unusual in structure and modification. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 18, p. 7159-7165, 1989.
- 69 CARLSON, B. A.; HATFIELD, D. L. Transfer RNAs that insert selenocysteine. In: SIES, H.; PACKER, L. **Methods in Enzymology**, New York, Elsevier Inc., 2002. v. 347, p. 24-39.
- 70 COMMANS, S.; BOCK, A. Selenocysteine inserting tRNAs: an overview. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 335-351, 1999.
- 71 BARON, C.; WESTHOF, E.; BOCK, A.; GIEGE, R. Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA(Sec) from *Escherichia coli*. Comparison with canonical tRNA(Ser). **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 2, p. 274-292, 1993.
- 72 STURCHLER, C.; WESTHOF, E.; CARBON, P.; KROL, A. Unique secondary and tertiary structural features of the eucaryotic selenocysteine tRNA(Sec). **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 5, p. 1073-1079, 1993.
- 73 TORMAY, P.; WILTING, R.; HEIDER, J.; BOCK, A. 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.
- 74 GABRYSZUK, J.; PRZYKORSKA, A.; MONKO, M.; KULIGOWSKA, E.; STURCHLER, C.; KROL, A.; DIRHEIMER, G.; SZARKOWSKI, J. W.; KEITH, G. Native bovine selenocysteine tRNA(Sec) secondary structure as probed by two plant single-strand-specific nucleases. **Gene**, v. 161, n. 2, p. 259-263, 1995.

- 75 ITOH, Y. *et al.* Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into protein and RNAs. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 385, n. 5, p. 1456-1469, 2009.
- 76 KIM, I. Y.; VERES, Z.; STADTMAN, T. C. *Escherichia coli* mutant seld enzymes: the cysteine-17 residue is essential for selenophosphate formation from ATP and selenide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 19650-19654, 1992.
- 77 TAMURA, T. *et al.* Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: SPSq for recycling L-selenocysteine and SPS2 for selenite assimilaion. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16162-16167, 2004.
- 78 KHAN, M. A. K.; WANG, F. Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 1567–1577, 2009.
- 79 CASSAGO, A. **Estudos moleculares da Selenocisteína sintase (SELA) de *Escherichia coli***. 2005. p 87. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- 80 CASSAGO, A. **Determinação estrutural da proteína Selenocisteína sintase de *Escherichia coli***. 2010. p 110. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos - USP, São Carlos, 2010.
- 81 MANZINE, L. R.; CASSAGO, A.; SILVA, M. T. A.; THIEMANN, O. H. 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.
- 82 SILVA, I. R. **Estudos biofísicos da Selenofosfato Sintetase de *Escherichia coli* e investigação de seu papel na via de biossíntese de Selenocisteínas**. 2012. p 140 Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos - USP, São Carlos, 2012.
- 83 RICKWOOD, D.; FORD, T.; GRAHAM, J. Nycodenz: A new nonionic iodinated gradient medium. **Analytical Biochemistry**, v. 123, n. 1, p. 23-31, 1982.
- 84 MALTA, V. R. S. **Cristalografia**. Alagoas: Departamento de Química - Universidade Federal de Alagoas, 2003. p. 114-118. Apostila
- 85 DIAS, S. M. G. **Estudos estruturais dos receptores nucleares humanos dos hormônios tireoidianos isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$) e do ácido retinóico 9-cis isoforma α (hTXR α)**. 2004. p.

210. Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos - USP, São Carlos, 2004.

86 BROGLIE, L. La nouvelle dynamique des quanta. In: RAPPORTS ET DISCUSSIONS DU CINQUIÈME CONSEIL DE PHYSIQUE, Bruzelles, Octobre 1927. **Électrons et Photons**. Bruzelles: l'Institut International de Physique Solvay, 1928.

87 DeROSIER, D.; KLUG, A. Reconstruction of 3-dimensional structures from electron micrographs. **Nature**, v. 217, n. 3, p. 130-134, 1968.

88 van HEEL, M.; PORTUGAL, R. V.; et al. Four-dimensional cryo electron microscopy at quase atomic resolution: IMAGIC 4D. In: **International Tables for Crystallography: crystallography of biological macromolecules 2nd**. ed. London: ITC, 2012. v. F, p. 624-628.

89 van HEEL, M.; et al. Single-particle cryo electron microscopy: towards atomic resolution. **Quarterly Reviews Biophysics**, v. 33, n. 1, p. 307-369, 2000.

90 TRANSMISSION electron microscopy. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Transmission_electron_microscopy>. Acesso em: 23.dez.2012.

91 SANCHEZ, R.; SALI, A. Comparative protein structure modeling: introduction and pratical examples with modeller. **Protein Structure Prediction: Methods and Protocols**, v. 143, n. 82, p. 97-129, 2000.

92 BAZZOLI, A.; TETTAMANZI, A. G. B.; ZHANG, Y. Computational protein design and large-scale assessment by I-TASSER structure assembly simulations. **Journal of Molecular Biology**, v. 407, n. 5, p. 764-776, 2011.

93 SYMMDOCK: prediction of complexes with cn symmetry by geometry based docking. Disponível em: <bioinfo3d.cs.tau.ac.il/SymmDock/> Acesso em: 30.mai.2012.

94 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.

95 ROHAN, S.; van HEEL, M. **Cryo electron microscopy of the prokaryotic Selenocysteine macromolecular complex**. London: Imperial College, 2008. p. 47 Mrs. Project II.

96 PATHDOCK: molecular docking algorithm based on shape complementarity principles.

Disponível em: <bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PathDock/> Acesso em: 30.mai.2012.

97 CLUS PRO 2.0: protein-protein interactions server. Disponível em: <cluspro.bu.edu> Acesso em: 31.mai.2012.

98 HAMURO, Y.; et al. Rapid analysis of protein structure and dynamics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. **Journal Biomolecular Technology**, v. 14, n. 3, p. 171-182, 2003.

99 ENGEN, J. R.; WALES, T. E.; SHI, X. Hydrogen exchange mass spectrometry for conformational analysis of proteins. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, v. 1, 2011.DOI: 10.1002/9780470027318.a9201.

100 WEIS, D. D.; KAVETI, S.; WU, Y.; ENGEN, J. R. Probing protein interactions using hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry. **Mass Spectrometry of Protein Interactions**, v. 3, n. 1, p. 45-62, 2007.

101 MS-DIGEST: MS-spectra prediction. Disponível em: <<http://prospector.ucsf.edu/propector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>> Acesso em: 12.out.2011.

102 FIGUEIRA, A. C. M. **Oligomerização, estruturas à baixa resolução, ligação ao DNA e ao ligante dos receptores de hormônios tireoidianos**. 2008. p 210 Tese (Doutorado em Física Biomolecular) - Instituto de Física de São Carlos - USP, São Carlos, 2008.

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

104 WOOLLEY, A. T.; CHEUNG, C. L.; HAFNER, J. H.; LIEBER, C. M. Structural biology with carbon nanotube AFM probes. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 11, p. R193-R204, 2000.

105 ISRALEWITZ, B.; GAO, M.; SCHULTEN, K. Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 2, p. 224-230, 2001.

106 LAKOWICKZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3th ed., New York: Springes-Verlag, 2006.

107 JAMESON, D. M.; SAWYER, W. H. Fluorescence anisotropy applied to biomolecular

interactions. In: SIES, H.; PACKER, L. **Methods in Enzymology**, New York: Elsevier Inc., 1995. v. 246, p. 283-300.

108 WEISS, J. N. The Hill equation revisited: uses and misuses. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 11, p. 835-841, 1997.

109 LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. **Biocalorimetry**: applications of calorimetry in the biological sciences, New York: JWS, 1998. v. 1, p.18-363.

110 JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetic of biomolecular recognition. **Journal of Molecular Recognition**, v. 12, n. 1, p. 3-18, 1999.

111 PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 59, n. 1, p. 94-123, 1995.

ANEXOS

*"A menos que acredite em si mesmo, nada fará;
este é o caminho do sucesso."*

Jonh D. Rockefeller Jr.

29 de janeiro de 1874 - 11 de maio de 1960

Empresário

ANEXO 1 – Resumo dos resultados descritos no *Capítulo II – Contextualização*

1.1 Resultados obtidos no mestrado e doutorado de Alexandre Cassago

Durante seu mestrado e doutorado, o aluno amplificou o gene codificante para Selenocisteína sintase (SelA) de *Escherichia coli*, de 1392 pb, através da técnica de PCR a partir de DNA genômico do mesmo organismo.

Figura 81-Amplificação do gene *selA* de *Escherichia coli* visualizado em gel de agarose 1% e TAE [1X] corado com brometo de etídeo. Na coluna 1- padrão molecular “1Kb Plus DNA Ladder”; coluna 2- controle negativo e coluna 3- purificação do gene *selA* amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *Escherichia coli*.

Posteriormente, realizou as clonagens em vetores comerciais pET28a e pET29a e seu sequenciamento para validação. Tendo selecionado a construção clonada no segundo vetor mencionado, por não possuir a cauda de poli-histidinas (HIS-TAG), deu-se início aos ensaios de expressão e purificação utilizando o sistema de expressão *E.coli* BL21 (DE3) quimio-competente e, aos ensaios de purificação utilizando uma coluna de troca aniônica e outras metodologias padronizadas no estudo em questão.

Figura 82-Etapas de expressão da proteína Sela anteriormente a sua aplicação em coluna aniônica *DEAE Sepharose Fast Flow*, visualizada em SDS-PAGE 15%. 1- padrão de massas moleculares 2- controle negativo (BL21-pET29a+); 3- extrato bruto (BL21-pET29a-selA); 4- extrato bruto após adição de lisozima e sonicação; 5- sobrenadante contendo Sela solúvel; 6- fração precipitada; 7- sobrenadante após a adição de 25% de sulfato de amônio; 8- fração precipitada após a adição de 25% de sulfato de amônio; 9- pré-coluna após diálise; 10- precipitado após diálise.

Novas metodologias de purificação foram buscadas, até encontrar, que nesse momento, foi considerada a ideal que consistia na precipitação com 25% de sulfato de amônio, passagem em coluna de troca iônica hidroxipatita e posterior *HI Trap Q HP*. Com essa amostra foram iniciados os estudos de caracterização bioquímicas e estruturais. O experimento de espalhamento de raios-X a baixos ângulos proporcionou um modelo de baixa resolução, porém, corroborando com os dados de microscopia eletrônica de 1992 ao mostrar um envelope decamérico com simetria de ordem 5 ao longo de um dos eixos.

Figura 83-Resultados de SAXS onde o eixo de ordem 5 foi imposto com a finalidade da obtenção do modelo estrutural.

Foram determinadas as diferentes dimensões da molécula na presença e ausência do tRNA específico. Também foram realizadas as primeiras medidas de microscopia eletrônica em condição de contraste em gelo vítreo, o que possibilitou a verificação de formação de estruturas supramoleculares (pilhas) e da polidispersividade da amostra com relação à interações com tRNA endógeno.

Além disso, inúmeros *screenings* varrendo incontáveis condições de cristalização foram testados, obtendo alguns cristais, no entanto, não havendo padrão de difração necessário para o processamento e obtenção de modelo de alta resolução.

Figura 84-Fotos dos cristais obtidos pelo Dr. Alexandre Cassago, no entanto, sem obter sucesso nos experimentos de difração.

Medidas iniciais de TEM em preparo criogênico foram realizadas, possibilitando a obtenção de um modelo de baixa resolução.

Figura 85-Uma das imagens coletadas da amostra SslA em preparo crio. Coleta realizada no Imperial College London em colaboração com o Prof. Dr. Marin van Heel. Preparo da grade realizada por Willem Tichelaar e obtenção do conjunto de dados. É possível notar a polidiversidade mediante a presença de estruturas supramoleculares, partículas com e sem o tRNA, além de ocupação incompleta dos sítios abaixo da estequiometria literária e acima do esperado, levantando a hipótese de qual realmente é a razão estequiométrica entre SslA e seu tRNA específico. Com essa coleta foi possível construir um modelo prévio (abaixo) em resolução superior a 20 Å

1.2 Resultados obtidos no doutorado de Livia Regina Manzone

Durante seu doutorado, teve a incumbência de determinar a razão estequiométrica entre SslA e o tRNA^{sec}. No entanto, era necessário a retirada do tRNA endógeno ao sistema de expressão utilizado, para isso protocolos de lisogenia e de clonagem em um vetor híbrido foram estabelecidos.

Foi realizada então toda a caracterização bioquímica da molécula, através de medidas de dicroísmo circular, eletroforese em gel desnaturante, gel nativo e em gel de análise de ponto isoelétrico, o que juntamente com os resultados de SAXS obtidos pelo Dr. Alexandre Cassago estão sendo redigidos para publicação. Análise da cromatografia de exclusão

molecular também permitiu, a partir da calibração da coluna, estimar a massa molecular e comprovar a conformação oligomérica.

A obtenção do tRNA^{sec} a partir do kit de transcrição comercial, assim como descrito no capítulo IV, e sua estruturação foram observados a partir dos espectros de CD para confirmação das condições de enovelamento.

Figura 86-Espectros de dicroísmo circular apresentando as mudanças conformacionais em função da temperatura do tRNA^{sec} de *E. coli* sintetizado *in vitro*. As diferentes cores representam as mudanças na elipicidade em função da temperatura de 85°C (inicial) a 5°C (final).

Para a determinação das conformações oligoméricas presentes, ensaios de *crosslinking* químico foram realizados, resultando em uma hipótese do processo de oligomerização.

Figura 87-Crosslinking químico da proteína SclA com o reagente glutaraldeído em gel SDS-PAGE 10%. Em A: 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína SclA sem *crosslinking*; 3) SclA com 0,01% de glutaraldeído; 4) SclA com 0,02% de glutaraldeído; 5) SclA com 0,05% de glutaraldeído; 6) SclA com 0,07% de glutaraldeído; 7) SclA com 0,1% de glutaraldeído; 8) SclA com 0,2% de glutaraldeído; 9) SclA com 0,5% de glutaraldeído. Em B, 1) padrão de massa molecular (kDa); 2) proteína SclA sem *crosslinking*; 3) SclA com 1% de glutaraldeído; 4) SclA com 2% de glutaraldeído; 5) SclA com 3% de glutaraldeído; 6) SclA com 5% de glutaraldeído. Abaixo a hipótese levantada da maneira com que os complexos são montados em função da concentração.

Devido à necessidade de elevadas concentrações para os ensaios de anisotropia de

fluorescência, foi estabelecido um novo protocolo de purificação, utilizado nesse trabalho e descrita no capítulo IV. Com isso o padrão cromatográfico referente a coluna de exclusão molecular *Superdex 200 (16/60)* foi alterado, no entanto, mantendo a eluição da amostra com alto grau de pureza na mesma região.

Os primeiros ensaios de anisotropia foram realizados utilizando Sela marcada com fluoresceína para análise de seu comportamento mediante a variação de concentração. Era esperado observar os passos de oligomerização seguindo à hipótese previamente estabelecida pela técnica de *crosslinking* químico. No entanto, o comportamento observado refletia um incremento nos valores de anisotropia incessável (sem plateau final), demonstrando que poderia estar ocorrendo à formação de estruturas supramoleculares.

Figura 88-Curvas de anisotropia de fluorescência da titulação Sela-Sela. Cada curva refere-se à média de 3 experimentos independentes.

Posteriormente, ensaios de titulação do tRNA marcado com fluoresceína foram realizados a fim de determinar as constantes de afinidade e associação, além da razão estequiometria. Para validar esses resultados, em posterior experimento a enzima Sela foi marcada com fluoresceína, e observado a curva estequiométrica reversa. Ambos os experimentos apresentaram o mesmo resultado de razão estequiométrica, de 1Sela para 10tRNAs.

Figura 89-Curvas de titulação estequiométrica do complexo Sela-tRNA^{sec}. As linhas em vermelho indicam a razão estequiométrica de 1:1 (mol:mol, moles de monômeros de Sela : moles de tRNA^{sec}). Em A, dados brutos de anisotropia de fluorescência. Em B, dados normalizados para fração de ligação. Os símbolos ○ ● ▼ representam medidas individuais de experimentos independentes.

1.3 Resultados obtidos no mestrado de Ivan Rosa e Silva

O alvo do estudo do aluno foi a enzima Selenofosfato sintetase (SelD) de *Escherichia coli*. Durante seu projeto, obteve com sucesso a sequência codificante para o gene *seld* através de PCR a partir de DNA genômico. Estabelecendo, posteriormente, todos os protocolos de clonagem, expressão e purificação.

A enzima foi caracterizada através de diversas técnicas biofísicas como dicroísmo circular, ultracentrifugação analítica, espalhamento de luz dinâmico, espalhamento de raios-X a baixos ângulos e análises teóricas obtendo um modelo estrutural por homologia.

Surgiu então à possibilidade de ser realizado em colaboração os estudos de interação entre a SelD com seu parceiro proteico na via de incorporação de selênio em *Escherichia coli*, a Sela.

A fim de determinar quais as superfícies de interação entre o complexo de 910 KDa e os dímeros de SelD, foi desenhado um experimento de espectrometria de massa com troca hidrogênio-deutério, no qual o complexo foi submetido a elevada concentração de óxido de deutério por tempo elevado e analisado os resultados dos deslocamentos dos peptídeos no qual houve ou não a incorporação. A análise dando o enfoque no complexo Sela e o complexo binário é um dos resultados dessa dissertação, enquanto que o trabalho do agora,

aluno de doutorado, Ivan Rosa e Silva, abrangeu a análise e interpretação para as interfaces presentes na SelD.

Figura 90-Perfil de incorporação de deutério na SelD de *E.coli* com 30 minutos de troca H/D, para o modelo da esquerda (amostra pura de proteína) e modelo da direita (após a interação com complexo SelA-tRNA^{sec}) indicando apenas as regiões em que houve grande variação na taxa de incorporação de deutério. As setas indicam os N-terminais de cada monômero. Em Azul, são representadas regiões com porcentagem de incorporação de deutério de 0 a 14%, enquanto que em ciano a porcentagem de incorporação é de 15 a 24%, em amarelo é de 50 a 69% e em vermelho é de 85 a 100%. Os números apresentados à esquerda indicam as posições dos resíduos de aminoácidos nas regiões assinaladas, com suas respectivas cores (esses números são indicados em apenas 3 regiões, dado que as outras são simétricas às primeiras). Extraído e modificado de⁸².

ANEXO 2 – Artigos publicados durante o Mestrado

Durante o período do mestrado, foram publicados e/ou submetidos os artigos em anexo:

- 1) SERRÃO, V. H. B.; ALESSANDRO, F.; CALDAS, V. E.; MARÇAL, R. L.; PEREIRA, H. D.; THIEMANN, O. H.; GARRATT, R. C. Promiscuous interactions of human septins: the GTP binding domain of SEPT7 forms filaments within the crystal. **FEBS Letters**, v.24, p. 3868-3873, 2011. DOI: 10.1016/j.febslet.2011.10.043. Epub 2011 Nov 3.
- 2) MANZINE, L. R.; SERRÃO, V. H. B.; LIMA, L. M. T.; SOUZA, M. M.; BETTINI, J.; PORTUGAL, R. V.; van HEEL, M.; THIEMANN, O. H. Assembly Stoichiometry of bacterial Selenocysteine Synthase and SelC (tRNA^{sec}). **FEBS Letters**. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.02.014. Epub 2013 Feb 18.
- 3) Em elaboração o artigo da interação entre o SelA-tRNA^{sec}-SelD.