UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DAIANA EVELIN MARTIL

Estudos estruturais da Seril-tRNA Sintetase nativa e em interação com
tRNAs cognatos de *Trypanosoma brucei*

São Carlos
2014

DAIANA EVELIN MARTIL

Estudos estruturais da Seril-tRNA Sintetase nativa e em interação com
tRNAs cognatos de *Trypanosoma brucei*

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

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

Versão Original

São Carlos
2014

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)

Martil, Daiana Evelin

Estudos estruturais da Seril-tRNA Sintetase
nativa e em interação com tRNAs cognatos de
Trypanosoma brucei / Daiana Evelin Martil;
orientador Otavio Henrique Thiemann -- São Carlos,
2014.

110 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Selenocisteína. 2. Seril-tRNA sintetase. 3.
tRNASec. 4. tRNASer. I. Thiemann, Otavio Henrique,
orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daiana Evelin Martil

Tese apresentada ao Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada -
Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 17/04/2014

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a). Otavio Henrique Thiemann

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). José Ramon Beltran Abrego

Instituição: UNESP/S. J. do Rio Preto

Prof(a). Dr(a). Alessandro Silva Nascimento

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Yvonne Primerano Mascarenhas

Instituição: IFSC/USP

Prof(a). Dr(a). Luis Paulo Barbour Scott

Instituição: UFABC/Santo André

Aos meus pais Elza Aparecida Sorren Martil e Pedro Martil.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por esse período de experiências inigualáveis, por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho e por ser a minha força maior durante todo esse tempo.

A toda minha família pelo amor incondicional, principalmente, aos meus pais Elza e Pedro pela base familiar e por todo o carinho e cuidado que sempre dedicaram durante a realização dos meus sonhos. A minhas irmãs, Elaine e Rosangela, e aos meus sobrinhos Junior, Lenon, Nicolas e Enzo por estarem sempre presentes. Em especial, a minha irmã Rosangela e ao meu cunhado Silvio Martins pelo companheirismo e cumplicidade. Ao meu namorado, Anderson Bitterncourt, pelo apoio e por entender que este tempo de dedicação seria necessário.

À Livia Manzine e ao Alexandre Cassago por me ensinarem os primeiros passos no laboratório com paciência e prontidão.

Aos técnicos Kelven Ulisses, Maria, Norma Bianca Saes, Suzana Andréa Sculaccio e Humberto Muniz por todo o suporte.

Ao Prof. Dr. Otavio pela orientação e apoio na elaboração e execução dos experimentos.

Ao Grupo do Dr. Andrew Thomson do *SOLEIL Synchrotron*, em especial a Dr. Beatriz Gomes Guimarães, por me ajudar no planejamento e na execução desde o processo de cristalização até a análise das estruturas obtidas por cristalografia de difração de raios X deste trabalho. Paciência e muito entusiasmo foram sempre a base do seu tratamento durante minha estadia no SOLEIL. E aos técnicos do Laboratório de Biologia do SOLEIL, Gabriel David e Blandine Pineau pela disponibilidade em me auxiliar.

A todos os meus queridos amigos do grupo de Cristalografia e Biologia Estrutural Renatinha, Fran, Marisa, Ana, Amanda, Liz, Caio, Bruno, André, Marina, Maluf, Udi, Wan, Karina, Bachega, Antônio, Michel e Nayara por todos esses anos de convivência. Em especial, aos meus amigos Everton, Marcos Michel, Jademilson, Ricardo e as minhas companheiras de apartamento Raissa e Ivani, tudo certamente se tornou muito mais fácil com a presença de vocês.

As *beautys* Fer, Teresa e Mamé pelos momentos de descontração. Vou guardá-los na memória com muito carinho.

Aos meus amigos Maycou Deriggi, Larissa Romanello e Dayane Costa pelas horas de risos, conversas, desabafos, aconselhamentos e de bagunças. Vocês certamente são muito mais que

amigos.

À minha querida amiga Livia Maria Faim (Neguinha) pelo companheirismo, pela alegria em ver meu sucesso, pelo colo nos momentos difíceis e pelo amor de irmã dedicado por longos anos.

Ao Ivan Rosa e Silva e ao Marco Túlio Alves da Silva pelas importantes discussões sobre o trabalho desenvolvido e por todos os almoços.

Ao Matheus Postigo por me ajudar, com paciência, no desenvolvimento dos testes de cinética enzimática.

Aos amigos que fiz durante minha estadia na França Giselda, Luis Paulo, Fred, Fernanda, Bruno, Alexandre Rios, Dayana, Flávio, Rosi, João, Alexandre Guarato, Livia e Otavio por me acompanharem na descoberta da gastronomia francesa e em passeios por lugares que ficarão definitivamente para sempre em minha memória.

Ao Instituto de Física de São Carlos, professores e técnicos pela estrutura e por contribuírem na minha formação.

A FAPESP pela bolsa de doutorado direto.

Ao CNPq pela bolsa de estágio no exterior.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste projeto.

Muito obrigada!!!

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas
lutamos para que o melhor fosse feito."

Martin Luther King

RESUMO

MARTIL, D. E. **Estudos estruturais da Seril-tRNA Sintetase nativa e em interação com tRNAs cognatos de *Trypanosoma brucei***. 2014. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

A síntese de selenocisteína e sua incorporação co-traducional em selenoproteínas como resposta a um códon UGA em fase requerem uma complexa maquinaria molecular. Em eucariotos, foram identificados componentes que participam da reação de formação de selenocisteína: Seril-tRNA sintetase (SerRS), *O*-fosfoseril-tRNA quinase (PSTK), SECIS Binding Protein 2 – SBP2, um fator de elongação específico para Sec (EFSec), selenofosfato sintetase 1 (SPS1) e selenofosfato sintetase 2 (SPS2), SEPSECS, proteína ligante de RNA SECp43, proteína ribossomal L30, um tRNA de inserção de selenocisteína (tRNA^{Sec}, SELC) e uma sequência específica no RNA mensageiro (elemento SECIS). O primeiro passo da incorporação de selenocisteína em proteínas é realizado pela SerRS, que aminoacila o tRNA com serina através da ativação da serina por Mg⁺² e ATP, levando a formação de um intermediário ligado a enzima (Ser-AMP). Posteriormente, ocorre a mudança do radical Ser do intermediário Ser-AMP para o tRNA^{Sec}, e subsequentemente, a conversão enzimática de Ser-tRNA^{Sec} para Sec-tRNA^{Sec}. Através de análises *in silico* nosso grupo identificou componentes da maquinaria de inserção de selenocisteína em espécies de Kinetoplastida. Foram identificados homólogos de tRNA^{Sec} e as enzimas *TbSerRS*, *TbSPS2*, *TbPSTK*, *TbSepSecS* e *TbEFSec*. Nosso principal alvo é o estudo estrutural da SerRS de *Trypanosoma brucei* nativa e em complexo com o tRNA^{Sec} e com as isoformas do tRNA^{Ser}. Uma nova metodologia no processo de purificação desta enzima foi desenvolvida e, através das técnicas de cromatografia de exclusão molecular, espalhamento de luz dinâmico e ultracentrifugação analítica conseguimos determinar o estado oligomérico da *TbSerRS*. O resultado de dímeros em solução corroborou com dados reportados na literatura, além de verificarmos por meio de estudos de cinética enzimática que a enzima encontra-se ativa sob as condições utilizadas. A técnica de ultracentrifugação analítica de sedimentação em equilíbrio também nos permitiu verificar a formação do complexo SerRS-tRNA, mas não nos possibilitou definir a estequiometria deste complexo. Estudos estruturais da enzima nativa e em interação com os tRNAs SELC e com as isoformas do tRNA^{Ser}, L-serina, um análogo não hidrolisável de AMP, MgCl₂, e com porções menores dos tRNAs foram realizados por meio da cristalografia por difração de raios X. Através dessa técnica, dezessete conjunto de dados foram coletados,

processados e estão em fase de refinamento. Algumas análises estruturais possibilitaram confirmar a presença de duas moléculas de glicerol em cada monômero na região do sítio ativo para a estrutura da *Tb*SerRS nativa e uma molécula de dAMP para o complexo *Tb*SerRS-dAMP.

Palavras-chave: Selenocisteína. Seril-tRNA sintetase. tRNA^{Sec}. tRNA^{Ser}.

ABSTRACT

MARTIL, D. E. **Structural studies of the native Seryl-tRNA Synthetase and in interaction with cognates tRNAs from *Trypanosoma brucei*.** 2014. 110 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The synthesis of selenocysteine and its co-translational incorporation in selenoproteins in response to a UGA codon in frame require complex molecular machinery. In eukaryotes, components that participate in the reaction of selenocysteine formation were identified: Seryl-tRNA synthetase (SerRS), *O*-phosphoseryl-tRNA kinase (PSTK), SECIS Binding Protein 2 - SBP2, a selenocysteine-specific elongation factor (EFSec), selenophosphate synthetase 1 (SPS1) and selenophosphate synthetase 2 (SPS2), SEPSECS, SECp43 RNA binding protein, ribosomal protein L30, selenocysteine tRNA (tRNA^{Sec}, SELC), and a specific sequence in the messenger RNA (SECIS element). The first step for selenocysteine incorporating is performed by SerRS that aminoacylates the tRNA with serine through serine activation by Mg²⁺ and ATP leading to the formation of an intermediate linked to the enzyme (Ser-AMP). Subsequently, the change of the Ser radical to tRNA^{Sec} takes place followed by the enzymatic conversion of Ser-tRNA^{Sec} to Sec-tRNA^{Sec}. Through in silico analysis our group has identified components of the selenocysteine insertion machinery in species of Kinetoplastida. Homologues of tRNA^{Sec} and the enzymes *TbSerRS*, *TbSPS2*, *TbPSTK*, *TbSepSecS* and *TbEFSec* were identified. Our main target is the structural study of the native SerRS from *Trypanosoma brucei* and SerRS in complex with the tRNA^{Sec} and the tRNA^{Ser} isoforms. A new methodology in the purification process of this enzyme has been developed, and through molecular exclusion chromatography, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation techniques we were able to determine the oligomeric state of *TbSerRS*. The result of dimers in solution corroborated with the data reported in the literature. Moreover, we were able to verify through studies of enzyme kinetics that the enzyme is active. The sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation technique also demonstrated the formation of the SerRS-tRNA complex, however, it did not allow the definition of the complex stoichiometry. Structural studies of the native enzyme and its interaction with SELC, tRNA^{Ser} isoforms, L-serine, a non-hydrolyzable AMP analog, MgCl₂, and smaller portions of tRNAs were performed by X-ray diffraction crystallography. Through

this technique, seventeen data sets were collected, processed, and are being submitted to refinement processes. Initial structural analysis allowed the confirmation of the presence of two glycerol molecules in each monomer in the active site region in the native structure of *Tb*SerRS and one dAMP molecule in the *Tb*SerRS-dAMP complex.

Keywords: Selenocysteine. Seryl-tRNA synthetase. tRNA^{Sec}. tRNA^{Ser}.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema mostrando os elementos requeridos para o mecanismo de incorporação de selenocisteínas. A linha verde indica o RNA mensageiro contendo um códon UGA e a estrutura em alça na região 3' do RNA mensageiro representa o elemento SECIS. Fonte: MOGHADASZADEH; BEGGS⁵ 33
- Figura 2 - Etapas envolvidas na síntese de selenocisteína em *Escherichia coli*. Fonte: elaborada pelo grupo de pesquisa da autora..... 35
- Figura 3 - Possível mecanismo da via de biossíntese de selenocisteína em eucariotos. Neste mecanismo o tRNA^{Sec} é aminoacilado com serina pela SerRS. A serina do Ser-tRNA^{Sec} é então fosforilada pela PSTK e, posteriormente, a selenocisteína sintase converte Ser-tRNA^{Sec} em Sec-tRNA^{Sec}. Fonte: Adaptada de CHAVATTE et al 36
- Figura 4 - Comparação entre estruturas secundárias dos tRNA^{Sec} de procarioto (A) e de eucarioto (B). Em B destaca-se o braço acceptor e o braço TψC. Fonte: Adaptada de COMMANS; BÖCK²⁵ 37
- Figura 5 - Reação de aminoacilação da seryl-tRNA sintetase. No primeiro passo ocorre a ativação do aminoácido por Mg⁺² e ATP levando a formação de um intermediário (aminoacil-adenilato) com a liberação de pirofosfato inorgânico (PPi). Posteriormente, ocorre a mudança da porção amino do intermediário aminoacil-adenilato para o tRNA com a liberação de AMP. Fonte: Adaptada de BATTENBERG; et al.⁴⁷ 43
- Figura 6 - Ciclo de vida do Trypanosoma brucei no hospedeiro intermediário inseto e no hospedeiro definitivo homem. Fonte: DPDx–Laboratory Identification PF Parasitic Diseases of Public Health Concern⁵²⁻⁵³ 46
- Figura 7 - Distribuição mundial da tripanossomíase africana humana (T. gambiense) em 2008. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION⁵⁰ 46
- Figura 8 - Gel de poliacrilamida nativo, corado com brometo de etídio: (1) Marcador de massa molecular; (2) TbSerRS tratada com RNase 37 °C; (3) TbSerRS; (4) TbSerRS tratada com RNase a 4 °C overnight. Fonte: Elaborada pela autora..... 69

- Figura 9 - Gel de poliacrilamida nativo corado com Comassie R 350 stain : (1) Marcador de massa molecular; (2) *TbSerRS* tratada com RNase 37 °C; (3) *TbSerRS*; (4) *TbSerRS* tratada com RNase a 4 °C *overnight*. Fonte: Elaborada pela autora..... 70
- Figura 10 - Análise por SDS-PAGE da referente a eluição da *TbSerRS* pela coluna de afinidade (Ni-NTA): (1) padrão de massa molecular, (2) *flow-through* (3), (4) e (5) lavagens com tampão A (25 mM Hepes / NaOH pH 7.25, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5mM DTT) contendo 25mM Imidazol, (6) e (7) lavagens com tampão A contendo 100 mM Imidazol, (8) eluição da quantidade majoritária da *TbSerRS* com tampão A contendo 250mM Imidazol. Fonte: Elaborada pela autora..... 71
- Figura 11 - Perfil cromatográfico, obtido pela cromatografia de exclusão molecular *Superdex 200 HR 10/30* (GE) para a *TbSerRS*. O pico1: representa a eluição da *TbSerRS*. Pico2: representa a eluição do *nycodenz*. Fonte: Elaborada pela autora..... 72
- Figura 12 - Curva de calibração linear K_{av} *versus* log MW para proteínas com massa molecular conhecida. Fonte: Elaborada pela autora..... 73
- Figura 13 - Curva de calibração linear $(-\log K_{av})^{1/2}$ *versus* raio de Stokes para proteínas com o Raio de Stokes conhecido. Fonte: Elaborado pela autora..... 74
- Figura 14 - Medida de espalhamento de luz dinâmico da *TbSerRS* nativa realizada no *Zetasizer uV Protein Sizer Analyzer* a temperatura de 10°C. Fonte: Elaborada pela autora..... 76
- Figura 15 - Análise em gel de agarose da amplificação correspondente aos genes *selC* e das isoformas do tRNA^{Ser} de *Trypanosoma brucei*. 1) padrão de massa molecular 1Kb Plus (Fermentas). 2) gene para o tRNA^{Ser} 3^a (103pb), 3) gene para o tRNA^{Ser} 3B (103pb), 4) gene para o tRNA^{Ser} 4 (103pb), 5) gene para o tRNA^{Ser} 7 (103pb) e 6) gene *selC* (112pb). A seta evidencia a amplificação correspondente aos fragmentos. Fonte: Elaborada pela autora..... 77
- Figura 16 - Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da *TbserRS* para cinco concentrações diferentes 0.2, 0.4, 0.6, 08 e 1 mg/mL. Fonte: Elaborada pela autora..... 79

Figura 17 - Curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo para a <i>TbSerRS</i> nativa nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/mL. O inserto ilustra as cores das curvas correspondentes a cada concentração. Fonte: Elaborada pela autora.....	81
Figura 18 - Curva de espalhamento da <i>TbSerRS</i> nativa em solução a concentração de 10mg/mL. Fonte: Elaborada pela autora.....	81
Figura 19 - Gráfico de Guinier ($\ln$ Intensidade <i>versus</i> q^2) da <i>TbSerRS</i> nativa a concentração de 10mg/mL, utilizando 22 pontos iniciais. Fonte: Elaborada pela autora.....	82
Figura 20 - Gráfico da função de distribuição de distância, $P(r)$ <i>versus</i> r , para a <i>TbSerRS</i> nativa obtido pelo programa GNOM ⁵⁹ . Fonte: Elaborada pela autora.....	83
Figura 21 - Cálculo da massa molecular e número de subunidades em solução da <i>TbSerRS</i> nativa obtidos pelo SAXS MoW ⁶⁰ . Fonte: Elaborada pela autora através do programa SAXSMOW ⁶⁰	84
Figura 22 - Sobreposição das curvas de espalhamento da <i>TbSerRS</i> nativa com o modelo de alta resolução (PDB:3LSQ) pelo software CRY SOL ⁶² . Fonte: Elaborada pela autora.....	84
Figura 23 - A sobreposição do modelo <i>ab initio</i> a baixa resolução com a estrutura cristalográfica (PDB:3LSQ) realizada pelo programa SUPCOMB ⁶³ considerando a simetria de ordem 1. O modelo de alta resolução está representado pela estrutura em <i>cartoon</i> (hélices- α e folhas- β), com o de baixa resolução (<i>TbSerRS</i> nativa) representado pelas esferas. Os modelos estão rotacionados de 90 ⁰ em relação aos eixos x e y. Fonte: Elaborada pela autora.....	85
Figura 24 – Cristais obtidos pelo método de difusão de vapor <i>sitting drop</i> . No lado esquerdo da figura está representado cristais obtidos na co-cristalização da <i>TbSerRS</i> com L-serina (condição de cristalização: 2.4 M de malonato de sódio, pH 7.0, 2 mM de L-serina e 10 mM de MgCl ₂). A direita está representado os cristais da <i>TbSerRS</i> nativa. Os cristais foram corados com Izit Crystal Dye (HAMPTON RESEARCH) indicando formação de cristais com arranjo de moléculas de proteína. Fonte: Elaborada pela autora.....	88
Figura 25 - Monocristal obtido na co-cristalização da <i>TbSerRS</i> com tRNA 3b em 100 mM Tris, pH 8.3, 24% PEG 400, 200 mM MgCl ₂ . A figura ilustra a montagem do cristal no <i>loop</i> no momento da coleta de dados. Fonte: Elaborada pela autora.....	88

- Figura 26 - Estrutura nativa da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* a 1.8 Å de resolução. Esta estrutura é composta de um homodímero (monômero A colorido e monômero B em rosa), sendo que cada monômero é composto do domínio N-terminal (azul) e um domínio central catalítico representado pelos motivos 1, 2, e 3 coloridos em ciano, amarelo e vermelho, respectivamente. Fonte: Elaborada pela autora..... 93
- Figura 27 - Estrutura da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* a 2.05 Å de resolução evidenciando a ligação de duas moléculas de glicerol na região do sítio ativo. Fonte: Elaborada pela autora..... 94
- Figura 28 - Representação dos resíduos que compõem a região do sítio ativo da *TbSerRS* em interação com duas moléculas de glicerol (Gol). As linhas pontilhadas em verde representam as ligações de hidrogênio. O lado esquerdo da figura mostra as ligações com uma molécula de Gol e o lado direito evidencia a segunda molécula de Gol. Fonte: Elaborada pela autora através do PDBsum¹..... 96
- Figura 29 - Representação do sítio de ligação da estrutura da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* a 1.75 Å de resolução em complexo com o análogo não hidrolisável de AMP. O mapa (*omit map*) $2F_o - F_c$ (nível de contorno 1σ) com o modelo sobreposto evidencia a região central de densidade eletrônica de ligação ao análogo não hidrolisável de AMP. Os sticks vermelhos e azuis representam os resíduos que fazem interações de hidrogênio com o dAMP. Fonte: Elaborada pela autora. Fonte: Elaborada pela autora..... 95
- Figura 30 - Densidade eletrônica $2F_o - F_c$ (nível de contorno 1σ) com o modelo sobreposto evidenciando a região central de densidade eletrônica, a qual poderia indicar a região de ligação de uma porção do tRNA^{Ser}. Fonte: Elaborada pela autora..... 97
- Figura 31 - Estrutura da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* nativa (amarelo) sobreposta com a estrutura do complexo *TbSerRS*-dAMP (rosa) e com a estrutura depositada no PDB sob o código 3LSQ (púrpura). Os *gaps* localizados entre os resíduos 243 – 244 e 298 – 305 e o loop (400- 418) também estão indicados na figura. A sobreposição dos C α entre a *TbSerRS* nativa e o complexo *TbSerRS*-dAMP apresentou um RMSD de 0.3 e a sobreposição da *TbSerRS* nativa com o modelo 3LSQ apresentou um RMSD de 0.78. Fonte: Elaborada pela autora..... 99

Figura 32 - Estrutura.cristalográfica evidenciando as regiões com valores maiores valores de Bfactor (regiões coloridas em vermelho, amarelo e alaranjado). A) Estrutura da *TbSerRS* nativa. B) Estrutura da *TbSerRS* em complexo com dAMP. Fonte: Elaborada pela autora..... 100

Figura 33 - Medida da detecção de conversão do MESG através do consumo de PP_i obtido no primeiro passo da reação de aminoacilação catalisada pela *TbSerRS*. Fonte: Elaborada pela autora..... 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão da classe das aminoacil – tRNA sintetases. PheRS é pertencente a classe II das aaRS e aminoacila 2' OH da ribose do 3' terminal da A76. AlaRS e GlyRS da classe II possuem duas diferentes formas oligoméricas em diferentes organismos. LysRS é um exemplo de dados de uma aaRS que pertence a classe II em <i>eukarya</i> e na maioria das bactérias e pertence a classe I em algumas <i>archaea</i> e algumas bactérias. Em eucariotos superiores, GluRS classe I e ProRS classe II existe como uma cadeia peptídica conectada por um domínio linker. A proteína fusionada é referenciada como GluProRS.....	41
Tabela 2 - Descrição das quantidades dos componentes utilizados na reação de PCR para a amplificação do tRNA ^{Ser} e do SELC.	54
Tabela 3 - Descrição das condições utilizadas nas reações de PCR.....	54
Tabela 4 - Descrição das quantidades dos componentes utilizados na reação de PCR para a transcrição dos tRNAs.	56
Tabela 5 - Descrição das quantidades dos componentes utilizados para a detecção de PP _i no primeiro passo da reação de aminoacilação.....	67
Tabela 6 - Proteínas com massa molecular e Raio de Stokes utilizados para a obtenção das curvas de calibração K _{av} versus log MW e, (-logK _{av}) ^{1/2} versus raio de Stokes. O volume de eluição foi obtido a partir da coluna <i>Superdex</i> 200 HR 10/30 (GE) e o tampão: 25mM Hepes-NaOH, pH 7.25, contendo 500mM NaCl, 5% glicerol e 5mM DTT.	73
Tabela 7 - Massa molecular e raio de Stokes obtidos a partir das curvas de calibração para <i>TbSerRS</i> a para os picos ilustrados na Figura . Os Picos 1, 2 e 3 são referentes a <i>TbSerS</i> , ao <i>nycodenz</i> e a <i>TbSerRS</i> ligada ao tRNA endógeno, respectivamente.	75
Tabela 8 - Constantes de dissociação obtidas a partir da sedimentação em equilíbrio para dois modelos de heteroassociação para a interação <i>TbSerRS</i> -tRNA levando em consideração a estequiometria de 1:1 e 1:2.....	80
Tabela 9 - Soaking realizado com os diferentes substratos da <i>TbSerRS</i> : dAMP (2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato), L-serina, tRNA ^{Ser} (SELC), isoformas do tRNA ^{Ser} , braço variável 4, braço variável 7, braço variável SELC e braço acceptor SELC, utilizando o cristal obtido para a enzima nativa (condição: 2.4 M de malonato de sódio, pH 7.0, 10 mM MgCl ₂). Nesta tabela estão dispostos as diferentes combinações entre os substratos, o tempo de <i>soaking</i> e a resolução que estes cristais difrataram utilizando 20% de glicerol como agente crioprotetor. A coleta de dados desses cristais foram realizadas no <i>SOLEIL Synchrotron</i> (Saint Aubin – França).	87

Tabela 10 – Estatística do processamento e do refinamento dos dados cristalográficos coletados para a *TbSerRS* nativa e para o complexo *TbSerRS*-serina.....80

Tabela 11 - Estatística do processamento e do refinamento dos dados cristalográficos coletados para os complexos *TbSerRS*-dAMP e *TbSerRS*-tRNA^{Ser}(03b).....80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aaRS	Aminoacil-tRNA Sintetase
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
dAMP	2'-Deoxiadenosina 5' – monofosfato
dNTP	Desoxiribonucleotídeo Trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EFSec	Fator de elongação de tradução para inserção de selenocisteína em eucariotos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Meio de Cultura Luria Broth
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MESG	2-amino-6-mercaptop-7-metilpurina ribonucleosídeo
MPD	<i>2-Methyl-2-4pentaneidiol</i>
pb	Pares de base (base pairs)
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
P _i	Fosfato inorgânico
PP _i	Pirofosfato inorgânico
PSTK	O-fosfoseril-tRNA quinase
RNase A	Ribonuclease A

RPM	Rotações por minuto
SAXS	Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo
SBP2	Proetína ligadora à SECIS (<i>SECIS Binding Protein 2</i>)
Se	Selênio
Sec	Selenocisteína
SECIS	Sequência de Inserção de Selenocisteína (<i>Selenocysteine Insertion Sequence</i>)
SELA	Selenocisteína sintase em procarioto (<i>Selenocysteine Synthase</i>)
SELB	Fator de Elongação de Selenocisteína em procarioto (<i>Selenocysteine Specific Elongation Factor</i>)
SELD	Selenofosfato Sintetase (<i>Selenophosphate Synthetase</i>)
SepSecS	Selenocisteína sintase em eucarioto
SerRS	Seril-tRNA sintetase
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com sulfato de dodecyl-sódio
SPS1	selenofosfato sintetase 1 (<i>Selenophosphate Synthetase 1</i>)
SPS2	selenofosfato sintetase 2 (<i>Selenophosphate Synthetase 2</i>)
tRNA	Ácido Ribonucléico Transportador
tRNA ^{Sec}	tRNA de Inserção de Selenocisteína (<i>Selenocysteine Insertion tRNA</i>)
tRNA ^{Ser}	tRNA de Inserção de Serina

LISTA DE SÍMBOLOS

KDa Quilodalton (10^3 G/Mol)

mL Mililitro

$^{\circ}\text{C}$ Graus Celsius

pH Potencial hidrogeniônico

μg Micrograma

mM Milimolar

nM Nanomolar

M Molar

$\text{\AA}$ Ângstrom

SUMÁRIO

<i>Capítulo 1</i> – Introdução	31
1.1 Introdução	31
1.1.1 Selênio	31
1.1.2 Biossíntese de Selenocisteínas	32
1.1.3 Aminoacil-tRNA Sintetase.....	37
1.1.4 Seril-tRNA Sintetase.....	42
1.1.5 Trypanosoma	43
1.1.6 Selenocisteína de Trypanosomatídeos.....	46
<i>Capítulo 2</i> – Justificativas e Objetivos	47
2.1 Objetivos.....	47
<i>Capítulo 3</i> - Materiais e Métodos	49
3.1 Clonagem da proteína seril-tRNA sintetase	49
3.2 Expressão do gene <i>tbser</i>	49
3.3 Detecção de RNA endógeno ligado a seril-tRNA sintetase	50
3.4 Adaptações no processo de purificação da enzima seril-tRNA sintetase.....	52
3.5 Estudos de obtenção dos tRNAs.....	52
3.5.1 Amplificação do Gene de Inserção Selenocisteína tRNA ^{Sec} (SELC) e do tRNA ^{Ser}	52
3.5.2 Transcrição <i>in vitro</i> dos tRNA ^{Sec} e das isoformas do tRNA ^{Ser}	55
3.5.3 Purificação e enovelamento dos transcritos tRNA ^{Sec} e das isoformas do tRNA ^{Ser}	56
3.5.4 Construções de algumas regiões do selenocisteína-tRNA ^{Sec} (SELC) e de isoformas do tRNA ^{Ser}	57
3.6 Estudos de espalhamento de luz dinâmico da seril-tRNA sintetase	59
3.7 Estudos de espalhamento de raios X a baixo ângulo	60
3.8 Cristalografia por difração de raios X da seril-tRNA sintetase.....	61
3.8.1 Cristalização da seril-tRNA sintetase	61
3.8.2 Coleta de dados e resolução estrutural.....	62
3.9 Ultracentrifugação analítica.....	63
3.10 Medidas de cinética enzimática da <i>TbSerRS</i> selvagem	66
<i>Capítulo 4</i> – Resultados e Discussão	69
4.1 Purificação da enzima seril-tRNA sintetase	69
4.2 Determinação da massa molecular e Raio de Stokes por meio da cromatografia de exclusão molecular	71

4.3 Espalhamento de luz dinâmico da <i>TbSerRS</i>	76
4.4 Amplificação do gene de inserção de selenocisteína-tRNA ^{Sec} (<i>seI/C</i>) e das isoformas do tRNA ^{Ser} ...	77
4.5 Ultracentrifugação analítica	78
4.6 Espalhamento de raios X a baixo ângulo.....	80
4.7 Cristalografia por difração de raios X da seril-tRNA sintetase	86
4.7.1 Cristalização e coleta de dados da seril-tRNA sintetase	86
4.7.2 Processamento e refinamento inicial dos dados cristalográficos da seril-tRNA sintetase nativa e complexada a L-serina, dAMP e a uma isoforma do tRNA ^{Ser}	89
4.7.3 Análises preliminares das estruturas da seril-tRNA sintetase nativa e complexada a L-serina e ao dAMP	92
4.7.3.1 Seril-tRNA sintetase nativa.....	92
4.7.3.2 Seril-tRNA sintetase em complexo com L-serina	92
4.7.3.3 Seril-tRNA sintetase em complexo com dAMP	92
4.7.3.4 Seril-tRNA sintetase em complexo com uma isoforma do tRNA ^{Ser}	92
4.7.3.5 Comparação estrutural da seril-tRNA sintetase nativa, em complexo com dAMP e o modelo 3LSQ	92
4.8 Medidas de cinética enzimática da <i>TbSerRS</i> selvagem	100
<i>Capítulo 5 – Conclusões e Perspectivas</i>	103
5.1 Conclusões e perspectivas do trabalho.....	103
Referências.....	105

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Introdução

1.1.1 Selênio

Selênio (Se), que vem do grego *σεληνίον* (Deusa da lua), foi identificado como um elemento em 1817, pelo químico Jöns Jakob Berzelius, enquanto examinava sedimentos de plantas em Gripsholm na Suécia².

. O selênio, por um longo período, teve sua atividade atribuída a efeitos tóxicos devido a observações feitas por Madison em 1856, cirurgião da guarda do Forte Randall em Nebraska nos Estados Unidos, ao relacionar enfermidades fatais em cavalos a determinadas pastagens de áreas específicas do forte². Essa hipótese pôde ser comprovada, somente em 1934, através de estudos realizados em grãos atribuindo a toxicidade desses ao elemento selênio³.

Este elemento é existente nas formas inorgânicas como: H_2Se , $H_2Se_2O_3$, H_2SeO_3 , H_2SeO_4 e, como um micronutriente essencial que existe naturalmente na forma orgânica de selenometionina (SeMet) e de selenocisteína (Sec, U)⁴. Ele pode atuar como redutor da expressão viral, retardando a progressão da AIDS em HIV soropositivos; como agente quimiopreventivo do câncer e retardador do envelhecimento, devido sua ação antioxidante; na prevenção de doenças cardíacas e musculares; na formação de espermatozóides; no desenvolvimento de mamíferos e no funcionamento do sistema imune⁵⁻⁶.

A principal forma de obtenção do selênio pelos organismos vivos ocorre por meio das plantas que o absorvem em sua forma inorgânica convertendo-o em formas orgânicas de baixa massa molecular como o aminoácido selenometionina. Além de este aminoácido ser um composto encontrado em grandes quantidades em grãos, legumes e soja é o principal precursor para a síntese de selenocisteína em animais⁷⁻⁸. De acordo com o Conselho Nacional

de Pesquisa Norte Americano, a quantidade recomendada de selênio a ser ingerida é de 55 e 70 µg/dia para mulheres e homens adultos, respectivamente⁸⁻⁹. A falta de selênio na dieta está relacionada a várias patologias em humanos, como por exemplo, doenças neurológicas, tais como Alzheimer e Parkinson, e a doença de Keshan. E em animais está relacionada a Doença Muscular Bovina (*White Muscle Disease in cattle*), Miopatias Suína (*Mulberry Heart Disease in pig*), Diátese Exsudativa em aves (*Exudative Diathesis in Chicks and Poults*), desordens neurológicas e danos por tecidos queratinizados (*Keratinaceous Tissues*). A doença de Keshan, que está diretamente associada à deficiência de selênio, é endêmica de áreas rurais da China onde a absorção de selênio nos solos é extremamente baixa (< 10 µg/dia). A população local dessa região apresenta cardiomiopatias graves, infecções virais, disfunção na tireóide, problemas de fecundidade masculina além de problemas vasculares⁸. A prevenção ou a cura dessa doença pode ocorrer através da suplementação via oral de selênio¹⁰. Mutações em determinados genes do metabolismo desse elemento podem ser letais¹¹.

O Selênio encontra-se incorporado a proteínas que podem estar relacionadas a vários processos. A principal forma no qual o selênio é incorporado a proteínas é na forma orgânica de selenocisteína. Sec é incorporado co-traducionalmente ao polipeptídeo nascente, em posições específicas do códon UGA, que normalmente, é conhecido como códon de parada (*stop codon*)⁵. Proteínas que incorporam o selênio na forma do aminoácido selenocisteína são denominadas de selenoproteínas.

1.1.2 Biossíntese de Selenocisteínas

Selenocisteína também é conhecido como 21^o aminoácido. Sec está presente em grande número de enzimas distribuídas em eubactérias, arqueobactérias e eucariotos¹². Para a incorporação de Sec em proteínas são necessários alguns componentes específicos como: elementos estruturais próprios no RNA mensageiro (SECIS - *Seleno Cystein Insertion Sequence*), um tRNA específico (SelC) além de proteínas auxiliares denominadas de proteínas ligadoras ao elemento SECIS (EFSec, SELB, SBP1 e SBP2)⁵. O elemento SECIS é uma

estrutura em forma de alça na região 3' do mRNA que ajuda no reconhecimento códon UGA, códon interno à região codificante e em fase de leitura, como um sinal de inserção de Sec ao invés de indicar parada de tradução (Figura 1).

Figura 1 - Esquema mostrando os elementos requeridos para o mecanismo de incorporação de selenocisteínas. A linha verde indica o RNA mensageiro contendo um códon UGA e a estrutura em alça na região 3' do RNA mensageiro representa o elemento SECIS. Fonte: MOGHADASZADEH; BEGGS⁵.

O primeiro passo para a incorporação de Sec em proteínas procarióticas é a aminoacilação de tRNA^{Sec} (SELC) com o resíduo serina pela enzima seril-tRNA sintetase (SerRS)¹³. Após a aminoacilação do tRNA^{Sec} pela SerRS, em *Escherichia coli*, uma selenocisteína sintase (SELA) dependente de piridoxal fosfato remove o grupo hidroxil da cadeia lateral da serina, formando um intermediário denominado de seril- tRNA^{Sec} . Este composto intermediário insaturado pode tautomerizar para uma forma instável imino. Ao mesmo tempo, a enzima seleno-fosfato sintetase (SELD) catalisa a formação de selenofosfato a partir de seleneto e ATP¹⁴. O seleneto é obtido a partir do selenito ou de selenocisteínas pelas proteínas selenotransferases ou selenocisteína liase, respectivamente¹⁴⁻²⁰. O selenofosfato, forma ativa do selênio, é então transferido ao seril- tRNA^{Sec} produzindo assim o selenocisteil- tRNA^{Sec} ($\text{Sec-tRNA}^{\text{Sec}}$), que logo em seguida é liberado^{14,15}. Um fator de alongação da tradução específico denominado de SELB, que carrega uma molécula de GTP, liga-se então ao selenocisteil- tRNA^{Sec} formando o complexo SELB-GTP- $\text{Sec-tRNA}^{\text{Sec}}$. Este complexo encaminha $\text{Sec-tRNA}^{\text{Sec}}$ para o ribossomo através de sua ligação ao elemento SECIS no mRNA¹⁶. Análises dos sítios de ligação da proteína SELB revelaram que a porção N-terminal é provavelmente capaz de se ligar ao selenocisteil- tRNA^{Sec} e que o fragmento C-

terminal se liga exclusivamente ao elemento SECIS no mRNA. Pressupõem-se que a parte inferior do elemento SECIS sofra alguma modificação de maneira que o códon UGA seja posicionado dentro do sítio A do ribossomo, enquanto que, sua parte superior permaneça ligada a SELB¹⁶. Ao mesmo tempo, o anticódon do Sec-tRNA^{Sec} é pareado com o códon UGA no sítio A e após a hidrólise da molécula de GTP, SELB permanece ligada a um GDP e se desprende do tRNA e da estrutura SECIS. Sec-tRNA^{Sec} permanece no sítio A do ribossomo permitindo assim que o resíduo de selenocisteína seja incorporado a cadeia polipeptídica nascente¹⁶. A via de síntese de selenocisteína em procariotos está ilustrada na Figura 2.

Figura 2 - Etapas envolvidas na síntese de selenocisteína em *Escherichia coli*. Fonte: Elaborada pelo grupo de pesquisa da autora.

Em arqueobactérias e eucariotos após a aminoacilação do tRNA^{Sec} com serina ocorre a fosforilação do resíduo de serina pela fosfoseril-tRNA quinase (PSTK) resultando no produto fosfoseril-tRNA^{Sec17-18}. Recentemente, em eucarioto, foi identificada uma proteína, denominada de SEPCECS, que possui função homóloga a SELA de procarioto sendo capaz de se ligar ao tRNA^{Sec17-19}. Esta proteína possui a função de desfosforilar o fosfoseril-tRNA^{Sec} e transferir o monoselenofosfato para o tRNA, formando assim, selenocisteil-tRNA^{Sec}. A

função de SELB em mamíferos é realizada por duas proteínas: uma que se liga ao elemento SECIS (SECIS Binding Protein 2 – SBP2) e outra que atua como um fator de elongação específico para Sec (EFSec). SBP2 liga-se a subunidade maior do ribossomo e ao elemento SECIS recrutando assim o complexo EFSec-selenocisteil-tRNA^{Sec} ao ribossomo²⁰.

Além dos genes homólogos a Seril-tRNA sintetase (SerRS), selenofosfato sintetase (SELD em procarioto, SPS1 e SPS2 em eucariotos), selenocisteína sintase (SELA em procarioto, SEPSECS em eucarioto) e SELB (EFsec em eucariotos) foram identificados outros componentes enzimáticos que possivelmente participam da reação de formação de selenocisteína: proteína ligante de RNA SECp43 e proteína ribossomal L30^{20,23}. ALLMANG e colaboradores¹⁷ propuseram que o complexo SPS1/SECp43/EFSec/Sec-tRNA^{Sec} é importado do núcleo em seguida se associa a proteína SBP2 que está ligada ao elemento SECIS. O complexo é então transportado para o citoplasma onde se liga ao ribossomo para adicionar Sec ao polipeptídio nascente¹⁵.

Figura 3 - Possível mecanismo da via de biossíntese de selenocisteína em eucariotos. Neste mecanismo o tRNA^{Sec} é aminoacilado com serina pela SerRS. A serina do Ser-tRNA^{Sec} é então fosforilada pela PSTK e, posteriormente, a selenocisteína sintase converte Ser-tRNA^{Sec} em Sec-tRNA^{Sec}. Fonte: Adaptada de CHAVATTE et al²².

O tRNA^{Sec} possui um anticódon UCA correspondente à serina, no entanto, também reconhece o códon UGA. Ele possui características estruturais distintas dos demais tRNAs (Figura 4), e portanto, não é reconhecido pela maquinaria normal que adiciona tRNAs

aminoacilados ao peptídeo nascente pela via ribossomal. O tRNA^{Sec} de eucariotos é o maior tRNA já descrito para estes organismos. Com 90 nucleotídeos de comprimento, ele possui um maior tamanho de braço variável e de braço D quando comparado aos outros tRNAs. O braço acceptor apresenta 9 pares de base e o TΨC 4, enquanto que, em tRNAs canônicos normalmente são formados respectivamente por 7 pb e 5 pb²⁴. Em procariotos essas mesmas regiões apresentam 8 pb e 5 pb, respectivamente. Outra característica marcante é o fato de que sua transcrição é iniciada no primeiro nucleotídeo do tRNA maduro, enquanto que, os demais tRNAs apresentam uma sequência sinal que precede o tRNA e que é retirada no processo de *splicing*. Além disso, o tRNA^{Sec} requer um fator de alongamento especializado, denominado c EFSec em eucariotos²¹.

Figura 4 - Comparação entre estruturas secundárias dos tRNA^{Sec} de procarioto (A) e de eucarioto (B). Em B destaca-se o braço acceptor e o braço TΨC. Fonte: Adaptada de COMMANS; BÖCK²⁵.

1.1.3 Aminoacil-tRNA Sintetase

Nas células vivas, o RNA é quase sempre encontrado complexo a proteínas. Uma família importante de interações proteína - RNA para o ciclo de vida de todas as células vivas é a família das aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs), que interagem especificamente com seus

substratos, os RNAs transportadores (tRNA)²⁶. Devido ao alto grau de especificidade, entre as aaRSs e os tRNAs, essas moléculas são excelentes alvos para o estudo de princípios de reconhecimento proteína–RNA. Além disso, o reconhecimento entre aaRSs e os tRNAs é crucial para a tradução correta do código genético o que assegura a fidelidade na síntese protéica²⁷⁻²⁸.

As aaRSs são um grupo remoto de enzimas cuja principais funções são a ativação do aminoácido e a catálise, com alto grau de especificidade, da ligação covalente do aminoácido ao seu tRNA cognato²⁹. Sendo que, cada uma destas funções é atribuída à formação de domínios especializados³⁰. As aaRSs são um grupo bastante diversificado de enzimas com relação ao seu tamanho, sequência primária e estrutura quaternária²⁶. Em geral, estas enzimas apresentam dois domínios: um domínio central catalítico e um domínio especializado na ligação ao tRNA. Elas são divididas em duas classes baseadas no domínio central catalítico. A classe I das aaRSs geralmente são monoméricas, possuem um domínio central catalítico formado pelo enovelamento clássico de ligação a nucleotídeo do tipo *Rossmann* e duas sequências consenso especificadas pelos motivos HIGH (His – Ile – Gly – His) e KMSKS (Lys – Met – Ser – Lys – Ser)³¹⁻³². Esta classe das sintetases contém enzimas para arginina, cisteína, glutamina, ácido glutâmico, isoleucina, leucina, metionina, triptofano, tirosina e valina. Já a classe II das aaRSs são geralmente diméricas ou tetraméricas, compartilham de um domínio central catalítico formado de sete a oito folhas betas antiparalelas conectadas por duas alfa-hélices e três motivos de sequências altamente degeneradas: motivo 1, 2 e 3³¹. O motivo 1 faz parte da interface dimérica e possui um resíduo de prolina invariavelmente conservado. Sua importância estrutural e papel para a interdependência funcional das subunidades da enzima foi demonstrada por Glangloff e colaboradores em 1993³³⁻³⁴. Os motivos 2 e 3 estão localizados em direção a porção C – terminal das enzimas, possuem um resíduo de arginina rigorosamente conservado e, essencialmente, constituem o sítio ativo envolvido na ligação dos substratos: aminoácido, ATP e *stem acceptor* do tRNA³³. Esta classe das aaRSs inclui as enzimas para alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, prolina, serina e treonina³⁵.

Uma importante distinção funcional entre as duas classes é o sítio inicial de ligação do aminoácido. Em geral, o aminoácido é transferido para o final 3' conservado do tRNA, CCA – 3' (citosina, citosina, adenina). As enzimas da classe I inicialmente aminoacilam 2' OH da ribose do 3' terminal (adenina 76 – A76), enquanto que, as enzimas da classe II ligam o

aminoácido específico ao 3' OH de A76. Outra importante distinção funcional entre as duas classes é o modo com que as aaRSs de cada classe introduzem o aminoácido no *stem acceptor* do seu tRNA cognato. A classe I aproxima-se do *stem acceptor* pelo lado do sulco menor do tRNA. Já a classe II aproxima-se do braço que contém CCA – 3' pelo lado do sulco maior²⁶.

Como regra geral, existe uma sintetase para cada um dos 22 aminoácidos de um dado organismo. Existem, entretanto, algumas exceções como a selenocisteína, forma na qual o selênio é incorporado a proteínas^{36,37} e as duas espécies de lisil-tRNA sintetase (LysRS) de *Escherichia coli*, que são expressas a partir de 2 genes (*lysU* e *lysS*), que esterificam o mesmo aminoácido³⁸.

A formação do aminoacil-tRNA, catalisado pelas aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs), é um passo crucial na manutenção da fidelidade da biossíntese de proteínas³⁹. Cada sintetase reconhece especificamente seus substratos e é capaz de diferenciar eficientemente tRNAs e aminoácidos. Essa distinção segue as regras do código genético conservado por meio do reconhecimento de elementos de identidade idiossincráticos⁴⁰. Um exemplo de elementos de identidade do tRNA é o par de base G3 : U70 apresentado somente pelos tRNAs^{Ala41}. A comparação entre os conjuntos de elementos de reconhecimento dos tRNAs, em espécies existentes, pode ser utilizado para estimar seu parentesco evolucionário ou biológico, uma vez que o conjunto de elementos de reconhecimento de muitos tRNAs tem mudado durante a evolução²⁸.

A partir de projetos de sequenciamento do genoma, atualmente, alguns *insights* sobre a evolução das aaRSs são fornecidos devido a vasta quantidade de informação sequencial disponível. Em contraste com os 22 aminoácidos padrões que são os mesmos em todos os organismos, ambos as sintetases e seus tRNAs cognatos, tem sofrido significantes mudanças através da evolução. A partir de experimentos bioquímicos e análises filogenéticas das sintetases e dos tRNAs tornou-se evidente que coadaptações dos contatos sintetases – tRNAs podem ter ocorrido através da evolução para manter o código genético. Um exemplo disso, são as LysRSs, que através do alinhamento sequencial de algumas sequências de eucariotos, revelou que estas aaRSs continham sequências características da classe I das sintetases e ao mesmo tempo compartilhavam de regiões com significativa similaridade ao motivo 3 encontrado na classe II das sintetases²⁶. *Timelines* que descrevem o surgimento gradual de domínios estruturais na evolução, mostraram que os domínios de ligação ao anticódon e o de edição das aaRS são adições mais tardias que o domínio de aminoacilação⁴².

Atualmente, existem 309 estruturas das aaRSs depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) na presença de uma variedade de substratos ou análogos desses substratos a partir de diferentes organismos. Estas estruturas tem possibilitado uma análise mais detalhada do mecanismo de aminoacilação executado pelas aaRRS. Enquanto que algumas características são compartilhadas por todas as aaRSs, alguns aspectos são de classe - específica. Através da resolução estrutural das aaRSs aliada com algumas outras metodologias pode-se entender a forma de reconhecimento do RNA, de maneira específica, a partir de diferentes espécies. Essas análises poderiam fornecer um melhor entendimento do desenvolvimento do processo de aminoacilação, através da evolução, e do desenvolvimento do código genético.

Tabela 1 - Divisão da classe das aminoacil – tRNA sintetases. PheRS é pertencente a classe II das aaRS e aminoacila 2' OH da ribose do 3' terminal da A76. AlaRS e GlyRS da classe II possuem duas diferentes formas oligoméricas em diferentes organismos. LysRS é um exemplo de dados de uma aaRS que pertence a classe II em *eukarya* e na maioria das bactérias e pertence a classe I em algumas *archaea* e algumas bactérias. Em eucariotos superiores, GluRS classe I e ProRS classe II existe como uma cadeia peptídica conectada por um domínio linker. A proteína fusionada é referenciada como GluProRS.

	Classe I			Classe II		
Motivos Característicos	HIGH			1 P ...		
	KMSKS			2 FRXE ...		
				3....GXGXGXER...		
Estrutura do domínio catalítico conservado	Enovelamento de ligação a nucleotide <i>Rossmann</i>			Folhas- β antiparalelas		
Sítio de aminoacilação	2' – OH			3' - OH		
Membros das subclasses e estruturas quaternárias						
	A:	B:		A:	B:	C:
	ArgRS α			GlyRS α_2		
	CysRS α	GlnRS α	LysRS?	HisRS α_2	AsnRS α_2	AlaRS α_2 ou α_4
	IleRS α	GluRS α		ProRS α_2	AspRS α_2	GlyRS $\alpha_2\beta_2$
	LeuRS α	TrpRS α_2		SerRS α_2	LysRS α_2	PheRS $\alpha_2\beta_2$
	MetRS α_2	TyrRS α_2		ThrRS α_2		
	ValRS α					

Fonte: Adaptada de BEUNING; MUSIER-FORSYTH ²⁶.

1.1.4 Seril-tRNA Sintetase

Recentemente, estruturas cristalográficas de muitas aaRS em complexos com ATP, AMP, serina, aminoacil-adenilato e tRNA tem sido determinadas. A primeira estrutura determinada, da classe II das aaRSs, foi a seril-tRNA sintetases (SerRS) de *E. coli*. Sua principal característica é a ausência do enovelamento *Rossmann fold*⁴³ e a existência de um domínio de ligação ao tRNA que é formado por resíduos do N-terminal⁴⁴. SerRSs são aaRS pertencentes a classe II que contém o domínio sítio ativo característicos de enzimas desta família⁴⁵. Elas são as principais responsáveis pelo carregamento do tRNA^{Ser} com serina. As estruturas para a maioria das SerRSs da classe II possuem um domínio *coiled-coil* no amino-terminal de sua sequência que é essencial para o reconhecimento do loop variável do tRNA³³. E uma extensão do C-terminal que possui um papel importante na estabilidade da proteína e reconhecimento do aminoácido⁴⁶. Elas também são responsáveis por aminoacilar o tRNA^{Sec} com serina como primeiro passo para a incorporação de selenocisteína em proteínas. O primeiro passo da reação de aminoacilação do tRNA^{Sec} ou do tRNA^{Ser}, catalisada pela SerRS, é a ativação da serina por Mg⁺² e ATP levando a formação de um intermediário (Ser-AMP) com a liberação de pirofosfato inorgânico (PPi). Posteriormente, ocorre a mudança do radical Ser do intermediário Ser-AMP para o tRNA e, subsequente, conversão enzimática Ser-tRNA^{Sec} para Sec-tRNA^{Sec} no caso da via de biosíntese de selenocisteína (Figura 5).

Figura 5 - Reação de aminoacilação da seryl-tRNA sintetase. O primeiro passo ocorre a ativação do aminoácido por Mg^{+2} e ATP levando a formação de um intermediário (aminoacil-adenilato) com a liberação de pirofosfato inorgânico (PP_i). Posteriormente, ocorre a mudança da porção amino do intermediário aminoacil-adenilato para o tRNA com a liberação de AMP. Fonte: Adaptada de BATTENBERG et al.⁴⁷.

1.1.5 Trypanosoma

Kinetoplastida é uma ordem de protozoários flagelados que são membros do filo Euglenozoa. Sua principal característica é a presença de uma organela denominada de cinetoplasto. A parede do cinetoplasto representa parte da única mitocôndria e contém uma estrutura de DNA capaz de se autoreplicar⁴⁸. Este grupo é dividido em biflagelados, representados pela família Bodonidae, e uniflagelados caracterizado pela família Trypanosomatidae. Os biflagelados incluem espécies de vida livre enquanto que os uniflagelados são exclusivamente parasitários⁴⁹.

A família Trypanosomatidae é constituída por parasitas obrigatórios de outros protozoários, plantas e animais. Esta família inclui os gêneros *Trypanosoma* e *leishmania*, que causam patologias relevantes em humanos, denominadas de doenças tropicais negligenciáveis e, formam um grupo basal da árvore filogenética dos eucariotos⁵⁰. Esses parasitas possuem mecanismos intrínsecos para o controle da expressão gênica, e exibem padrões complexos de morfogênese celular orquestrados pelo citoesqueleto interno. Suas formas celulares mudam durante um conjunto de diferenciações em seus ciclos de vida⁴⁹.

A Tripanossomíse Africana (doença do sono em humanos e Nagana em animais) é causada pela infecção de um protozoário parasita *Trypanosoma brucei*. Esta doença é transmitida pela picada da mosca tse-tsé (*Glossina* spp) que adquiriu a infecção de humanos ou animais. Durante a picada pela tsé-tsé os parasitas, sob formas de tripomastigotas metacíclica, são injetados no tecido cutâneo e, entram na corrente sanguínea do hospedeiro⁵¹. Dentro do hospedeiro, essas formas irão se diferenciar em tripomastigotas sanguíneos, que se dividem por fissão binária no sangue, linfa e espaços extracelulares. A mosca tse-tsé se torna infectada por tripomastigotas sanguíneos quando faz um repasse em um hospedeiro mamífero infectado. No intestino da mosca os parasitas se transformam em formas procíclicas e se multiplicam por fissão binária. Após a proliferação no intestino da mosca o parasita migra para as glândulas salivares onde são geradas formas epimastigotas. E seguida da multiplicação, o parasita se diferencia para a forma tripomastigota metacíclica completando seu ciclo de vida⁵¹⁻⁵².

Figura 6 – Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* no hospedeiro intermediário inseto e no hospedeiro definitivo homem. Fonte: DPDx–Laboratory Identification PF Parasitic Diseases of Public Health Concern⁵²⁻⁵³.

Os sintomas iniciais da Tripanossomíase Africana são dores de cabeça, febres, fraqueza e dores nas articulações. Em um estágio mais avançado, o parasita atravessa a barreira hematoencefálica e migra para o sistema nervoso central, causando distúrbios neurológicos e psiquiátricos seguido de morte⁴⁹. Dependendo da subespécie de *Trypanosoma* envolvido os sintomas se manifestam de formas diferentes. O *Trypanosoma brucei gambiense* causa uma infecção crônica que pode persistir por meses ou anos sem maiores sinais ou sintomas da doença. Já o *Trypanosoma brucei rhodesiense* causa uma infecção aguda, sendo que os sinais e sintomas são observados depois de algumas semanas da picada. A forma aguda desenvolve-se rapidamente, sendo o sistema nervoso central invadido pelos parasitas⁵⁰.

A doença do sono é encontrada em áreas subsaarianas onde o sistema de saúde é precário. *T.b. gambiense* é endêmica em 24 países da África ocidental e central e causa mais de 90 % dos casos reportados de doença do sono. Já o *T.b. rhodesiense* é endêmico em 13 países da África oriental e do sul representando menos que 10 % dos casos reportados. A região africana apresenta 90% dos casos reportados, permanecendo com 10% a região mediterrânea oriental⁵⁰.

De acordo com dados da WHO (World Health Organization), as doenças tropicais negligenciáveis ameaçam diretamente mais de 1 bilhão de pessoas no mundo. Sendo que só a tripanossomíase africana, é responsável por 10 milhões de morte anualmente. A distribuição mundial de tripanossomíase africana mundial está ilustrada na Figura 7.

Figura 7 - Distribuição mundial da tripanosomíase africana humana (*T. b. gambiense*) em 2008. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION⁵⁰.

1.1.6 Selenocisteína de Trypanosomatídeos

Através de análises *in silico* nosso grupo tem identificado componentes da maquinaria de inserção de selenocisteína em espécies de Kinetoplastida. Foram identificados homólogos de tRNA^{Sec} e as enzimas *TbSerRS*, *TbSPS2*, *TbPSTK*, *TbSepSecS* e *TbEFSec*, além da, constatação da funcionalidade destas⁵⁴. Através de análises de RNA interferência foi comprovado que a SPS2 está envolvida na proteção do *stress* oxidativo do parasita. A sua ausência dificulta a sobrevivência do parasita, em condições oxidantes, resultando em um fenótipo apoptótico⁵⁵. O selenoproteoma em *Trypanosoma* parece conter 3 selenoproteínas (SelK, SelT e SelTryp), e além disso, o *Trypanosoma brucei* parece ser altamente sensível a ação de inibidores de selenoproteínas específicos⁵⁶.

Capítulo 2 - Justificativas e Objetivos

2.1 Objetivos

A enzima alvo de nossos estudos é a seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* (*TbSerRS*) pertencente a classe II das aaRSs. Ela apresenta peso molecular de 53,86 KDa (monômero) com 479 resíduos de aminoácidos. Uma vez que a existência da via de biossíntese de selenocisteínas e o tRNA^{Sec} (SELC) foram identificados em *Trypanosoma* estudos com SerRS na forma nativa e estudos de interação com o tRNA^{Sec} e com as isoformas do tRNA^{Ser} pode oferecer novos *insights* no entendimento do papel da SerRS e de sua via metabólica para este parasita. Além de poder contribuir para eventuais iniciativas de desenho de inibidores para novas terapias.

Objetivos específicos:

- Caracterização molecular da *TbSerRS* nativa através da cromatografia de exclusão molecular, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).
- Estudos de afinidade da proteína *TbSerRS* com seus ligantes específicos tRNAs^{Sec} e isoformas do tRNA^{Ser} através de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) e ultracentrifugação analítica.
- Estudos estruturais da proteína *TbSerRS* nativa e em interação com o tRNAs^{Sec} e as isoformas do tRNA^{Ser} através de cristalografia por difração de raios X.
- Ensaios de atividade cinética da *TbSerRS*.

Capítulo 3- Materiais e Métodos

3.1 Clonagem da proteína seril-tRNA sintetase

A proteína Seril-tRNA Sintetase de *Trypanosoma brucei* inicialmente descrita 2006⁵⁴ teve seu gene amplificado pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A clonagem e a subclonagem do gene *tbserres*, utilizando os vetores pTZ57R e pET28a respectivamente, foram realizados pela Dr.^a Joci Neuby Alvez Macedo.

A partir de algumas construções, reações de digestão foram realizadas com as enzimas de restrição NdeI e XhoI, a fim de verificar a presença do inserto no vetor. O clone contendo o gene codificante para a proteína *TbSerRS*, subclonado em vetor de expressão pET28a (Novagen) e transformado em cepas de *E. coli* BL21 (DE3), foi cultivado em 5 mL de meio LB (Tryptona, extrato de levedura, NaCl, pH 7,5) utilizando 30 µg/mL de canamicina mantendo-o a 37°C, sob agitação, por sete horas e meia. Novos inóculos foram preparados a partir deste cultivo sendo mantidos por um período de 12 horas sob as mesmas condições. Os mesmos foram centrifugados a 13200 rpm por 1 minuto e, subsequentemente, foi realizada a extração plasmidial através do Gene JetTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).

3.2 Expressão do gene *tbserres*

O clone contendo o gene *tbserres* em pET28a, transformado em cepas de *E. coli* BL21 (DE3), foi inoculado em meio LB (Tryptona, extrato de levedura, NaCl, pH 7,5). Os inóculos foram incubados a 37°C sob agitação de 250 rpm até que a densidade ótica, medida no comprimento de onda de 600 nm, alcançasse o valor de 0.6. Em seguida, 0.1 mM de IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) foi acrescido ao meio. Os mesmos foram mantidos a temperatura de 20°C por um período de 20 horas, e posteriormente, foram centrifugados por

15 minutos a 6000 rpm. O sedimento bacteriano desta centrifugação foi resuspenso em tampão 50 mM TRIS-HCl, pH 7,6, contendo 10 mM NaCl, 5 mM DTT e 5% glicerol. As células foram rompidas através da ação da lisozima utilizando a concentração final de 10 µg/mL por 30 minutos em gelo. E através do processo de sonicação utilizando 4 pulsos de 20 segundos seguidos por intervalos de 45 segundos entre cada ciclo. Posteriormente, para a obtenção do extrato protéico, o lisado foi centrifugado por 30 minutos a 14000 rpm, a temperatura de 4°C. O protocolo de expressão foi estabelecido pela doutoranda Jaqueline Pesciutti Evangelista.

3.3 Detecção de RNA endógeno ligado a seril-tRNA sintetase

Utilizando o processo de purificação, estabelecido pela doutoranda Jaqueline Pesciutti Evangelista, realizamos medidas de espalhamento de raios X a baixo ângulo, cromatografia de exclusão molecular, espalhamento de luz dinâmico e eletroforese em gel nativo. Através desses experimentos verificamos a existência de uma massa molecular, um raio de Stokes e um raio de giração da *TbSerRS* que era compatível a formação de um oligômero um pouco maior que um dímero (estado ativo das *SerRS*)²⁶. Devido ao envelope de SAXS não comportar o arranjo de três moléculas da *TbSerRS*, a utilização da expressão heteróloga ser em células de *E. coli* e a um dos substrato da *TbSerRS* ser um RNA transportador, levantou-se a hipótese de que, possivelmente, a enzima poderia estar ligada de uma forma inespecífica a um tRNA de *E. coli*. Assim, repetimos o processo de purificação já estabelecido, onde a enzima inicialmente é precipitada em 60% de sulfato de amônio, em seguida, é aplicada a cromatografia de interação hidrofóbica e, por fim, a cromatografia de afinidade. E aplicamos a amostra, referente à *TbSerRS*, a uma eletroforese em gel de poliacrilamida nativo. Inicialmente este gel foi corado com brometo de etídio, composto intercalante das fitas de DNA e RNA e, através da fluorescência obtida pela emissão de luz ultravioleta a posição de algumas moléculas foi identificada. Em seguida, a fim de detectarmos a posição da proteína em estudo, o mesmo gel foi corado com Comassie R 350 stain e descorado com 10 % ácido

acético e 30 % metanol. Ao analisarmos o gel nativo, verificamos que a posição em que o brometo de etídio fluorescia era a mesma posição em que a *TbSerRS* era encontrada. Então, com objetivo de tentarmos remover o RNA endógeno ligado a proteína incubamos a mesma com uma ribonuclease que catalisa a degradação de RNA (RNase A) a 37 °C por meia hora. Em seguida, aplicamos a mesma a eletroforese em gel de poliacrilamida nativo. Diversas modificações da porcentagem da acrilamida do gel nativo, tanto para a resolução do gel como para a banda de empilhamento, foram realizadas. Isso porque de alguma forma a proteína não migrava da banda de empilhamento. Mas, mesmo assim não conseguimos uma condição na qual a proteína nativa e ligada ao tRNA fosse visualizada além da banda de empilhamento do gel. Posteriormente, a amostra tratada com RNase foi aplicada a uma cromatografia de exclusão molecular superdex 200 10/30 (Amersham Pharmacia). E ao comparamos o resultado desta cromatografia com uma cromatografia realizada antes do processo de incubação com a RNase A, verificamos um pequeno deslocamento do pico referente a enzima. O que poderia indicar que a proteína não estaria mais ligada a um RNA.

Outra forma que encontramos para a verificação da existência do RNA foi a análise por meio do *Qubit Quantitation Platform*, que é composto do aparelho Qubit fluorômetro (Invitrogen) e dos reagentes do kit Quant-it (Invitrogen). O kit Quant-it utilizado é específico para a quantificação de RNAs. Por meio deste kit, verificamos a existência de valores menores que 20 ng/μl, em termos de concentração, para a amostra tratada com RNase e 297 ng/μl da amostra não tratada com RNase.

O tratamento com a RNase a temperatura de 37°C tornou-se um processo inadequado. Isso porque uma razoável quantidade de proteína precipitava nesta temperatura. Assim, vários testes utilizando temperaturas mais baixas e com tempo de incubação maior foram executados, mas mesmo assim não obtivemos melhorias. Diante disso, resolvemos testar algumas modificações nas condições e no processo de purificação para obtenção da enzima nativa. Uma das primeiras variáveis a ser modificada foi a concentração de sal da solução tampão. Em altas concentrações de sal a ligação proteína-RNA pode ser desfeita devido ao processo *salting out*. Após a definição de um novo tampão, que foi utilizado desde o processo de lise celular, novas adaptações no processo de purificação foram executadas. E estas estão descritas no tópico seguinte.

3.4 Adaptações no processo de purificação da enzima seril-tRNA sintetase

Após a obtenção do extrato protéico a amostra foi aplicada a cromatografia de afinidade (Ni-NTA) com gradiente crescente de imidazol. O resultado foi analisado através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As amostras referentes a *TbSerRS* foram incubadas com 15 % de *nycodenz* por 6 horas. Este composto é um dos meios utilizado em experimentos de centrifugação de gradiente de densidade descontínuo. A porcentagem de uso dele foi definida através deste experimento. Este composto de alguma forma ajuda estabilizar o estado oligomérico da enzima em estudo. Isto foi verificado com outras enzimas de via de biossíntese de selenocisteína e de vias bioquímicas diferentes dentro de nosso grupo de pesquisa. O seu papel na estabilização do estado oligomérico de proteínas ainda não foi elucidado. Após o período de incubação com *nycodenz*, as amostras foram aplicadas a cromatografia por exclusão molecular *Superdex 200 HR 10/30* (GE) utilizando o equipamento *AKTA Explorer Automated Liquid Chromatography System* (GE). Concentradores com o corte de 30 KDa (Milipore) foram utilizados para o aumento da concentração da *TbSerRS*. A concentração foi determinada através da medida de absorção no comprimento de onda de 280 nm utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 46590 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) obtido pelo ProtParam⁵⁷.

3.5 Estudos de obtenção dos tRNAs

3.5.1 Amplificação dos genes de inserção selenocisteína tRNA^{Sec} (SELC) e do tRNA^{Ser}

A partir da sequência de nucleotídeos do gene tRNA^{Sec} (SELC) e das isoformas do tRNA^{Ser}, oligonucleotídeos foram desenhados e estão ilustrados abaixo. Em destaque (em vermelho) está o sítio promotor da T7 RNA polimerase. As sequências foram retiradas do *TriTrypDB Kinetoplastid Genomics Resource*.

tRNA^{Ser} – 03a

Primer Foward - Tb03a1

5' – **taatacgaactcactatagg**GTCACCATACCCAAGTGGTTACGGGGACTGACTAGAAATC – 3'

Primer Reverse - Tb03a2

5' – ggtCGTCACCAGCAGGATTCGAACCTGCGCGCGAGATCGCAACTGATTTCTAGTCAGTCCCCG – 3'

tRNA^{Ser} – 03b

Primer Foward - Tb03b1

5' – **taatacgaactcactatagg**GTCACCATACCCAAGTGGTTACGGGGACTGACTCGAAATC – 3'

Primer Reverse - Tb03b2

5' – ggtCGTCACCAGCAGGATTCGAACCTGCGCGCGAGATCGCAACTGATTTTCGAGTCAGTCCCCG – 3'

tRNA^{Ser} - 04

Primer Foward - Tb04a1

5' – **taatacgaactcactatagg**GTCGACATACCCAAGTGGTTACGGGGTTTGACTTGAAATC – 3'

Primer Reverse - Tb04a2

5' – ggtCGTCGACAGCAGGGTTCGAACCTGCGCGCGAGATCGCATTTGATTTCAAGTCAAACCCCG – 3'

tRNA^{Ser} – 07

Primer Foward - Tb07a1

5' – **taatacgaactcactatagg**GCAAACGTGGCCGAGTGGTTAAGGCGCCTGCCTGCTAAGC – 3'

Primer Reverse - Tb07a2

5' ggtCGCAAACGGAAGGGTTCGAACCTTCGCGTGAGATCACACCTGCTTAGCAGGCAGGCGCC – 3'

SelC (tRNA^{Sec} - SELC)

Primer Foward – Tbsec1

5' – **taatacgaactcactatagg**GCCACAAUGAGCUCAGCUGGUGCUGGGUGCGGGCUUCAACCCGUAG – 3'

Primer Reverse – Tbsec2

5' – tggCGCCACAAAGGCCGAATCGAACGGCTGCGAGTCCAACTCGCCTACGGGTTTGAAGCCCGCACC – 3'

A reação de amplificação foi realizada em um termociclador MyCycler da Bio-Rad a partir da técnica de PCR. Os componentes e as quantidades utilizados na reação de amplificação dos genes tRNA^{Sec} e os das isoformas do tRNA^{Ser} e, o programa de amplificação estão descritos nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2 - Descrição das quantidades dos componentes utilizados na reação de PCR para a amplificação do tRNA^{Ser} e do SELC.

Componentes da Reação	Quantidades
Tampão 10X da enzima	10µL
MgCl ₂ (25mM)	6µL
dNTP (10mM)	2µL
Enzima <i>Taq DNA Polymerase</i> (2,5 unidades)	1µL
<i>Primer Foward</i>	1µL
<i>Primer Reverse</i>	1µL
Água Estéril	79µL
VolumeFinal	100µL

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Descrição das condições utilizadas nas reações de PCR.

Passos	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
1	94 ⁰ C	3 minutos	1
2	94 ⁰ C	30 segundos	
3	40 ⁰ C	30 segundos	35
4	72 ⁰ C	30 segundos	
4	4 ⁰ C	24 horas	1

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a verificação da amplificação do tRNA^{Sec} e do tRNA^{Ser}, os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) como marcador de peso molecular. O brometo de etídio foi utilizado para a visualização dos fragmentos de DNA através da luz ultravioleta. Os fragmentos foram extraídos do gel de agarose utilizando o *kit* de purificação *Perfectprep Gel Clean Up* (Eppendorf). A quantificação foi realizada utilizando o equipamento *UV-Visible Spectrophotometer / U-2000 Double-Beam* (Hitachi) no comprimento de onda de 260 nm.

3.5.2 Transcrição *in vitro* dos tRNA^{Sec} e das isoformas do tRNA^{Ser}

O processo de transcrição *in vitro* foi realizado utilizando o *kit MegashortscriptTM* da Ambion. Este kit utiliza DNA plasmidial linearizado, oligonucleotídeos sintéticos e produtos de PCR como *template* que contenham o sítio promotor da T7 RNA polimerase para realizar a transcrição *in vitro*. Para um rendimento máximo de transcritos de 100 bases a concentração do *template* necessária na reação é de 150 nM. Os passos utilizados nos cálculos das reações da transcrição *in vitro* do tRNA^{Sec} e das isoformas do tRNA^{Ser} seguem as recomendações do fabricante. Os componentes e as quantidades utilizados nas reações estão dispostos na tabela 4. A reação de transcrição foi incubada a 37°C por 6 horas.

Tabela 4 - Descrição das quantidades dos componentes utilizados na reação de PCR para a transcrição dos tRNAs.

Componentes da Reação	Quantidades
Tampão 10 X da enzima T7	2 µL
Solução de ATP da T7 (75mM)	2 µL
Solução de CTP da T7 (75mM)	2 µL
Solução de GTP da T7 (75mM)	2 µL
Solução de UTP da T7 (75mM)	2 µL
DNA amplificado	Variável
Mix de Enzima T7	2 µL
Água estéril	Variável
Volume da Reação	20 µL

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5.3 Purificação e enovelamento dos transcritos tRNA^{Sec} e das isoformas do tRNA^{Ser}

Após a reação de transcrição *in vitro* os RNAs foram purificados como descrito a seguir:

- 1) Inicialmente os transcritos são submetidos ao tratamento com a DNase I . Adiciona-se 10U de DNase por 200 µL de reação por um período de 20 minutos a 37°C, a fim de remover o DNA molde restante da reação de amplificação.
- 2) Em seguida, inicia-se o processo de precipitação dos transcritos utilizando fenol e clorofórmio. Um volume de fenol (100%) é adicionado a amostra seguido de agitação por 30 segundos. Posteriormente, centrifuga-se por 5 minutos a 13200 rpm movendo o sobrenadante para um novo tubo. Ao pellet acrescenta-se água repetindo os passos

realizados para o fenol.

- 3) O item 2 é repetido com adição de clorofórmio ao invés do fenol.
- 4) Posteriormente, 2,5 volume de etanol (100%) com 0,1 volume de 3M NaOac (pH = 4,7) é adicionado a reação permanecendo *overnight* a 20 °C.
- 5) Então, centrifuga-se por 1 hora 13200 rpm a temperatura de 4 °C. Ao pellet adiciona-se 500 µL de etanol 70% e centrifuga-se novamente por um período de 30 minutos.
- 6) Após a remoção do etanol, 20 µL de água estéril é acrescido ao *pellet* permanecendo por 15 minutos a 37 °C para posterior resuspensão.

O processo de enovelamento inicia-se com a adição de 10 mM cloreto de potássio aos transcritos purificados, em seguida, os mesmos são levados a temperatura de 80 °C. O processo de enovelamento ocorre com a diminuição gradual da temperatura, sendo que, a temperatura de 35 °C 20 mM de cloreto de magnésio é acrescido. A temperatura de 27 °C os tRNAs já estão enovelados e são quantificados utilizando o comprimento de onda de 260 nm.

3.5.4 Construções de algumas regiões do selenocisteína-tRNA^{Sec} (SELC) e de isoformas do tRNA^{Ser}

Um dos principais objetivos do estudo com a *TbSerRS* é a determinação estrutural, por cristalografia de difração de raios X, do complexo *TbSerRS*-tRNA. Devido ao fato desse complexo ser relativamente grande optamos por realizar construções de porções dos tRNAs, a fim de, aumentarmos a probabilidade de cristalização desse complexo. Abaixo descrevemos as regiões e sequencias dos tRNAs construídos. A síntese destes braços foi realizada pela empresa Eurogentec.

- **Braço variável do tRNA^{Ser} (04)**

5'GCGAUCUCGC 3'

- **Braço variável do tRNA^{Ser} (07)**

5'GUGAUCUCAC 3'

- **Braço variável do SELC**

5'GCGAGUUGGACUCGC 3'

- **Braço acceptor SELC**

5'GCCACGAAG 3'

5'CUUCGUGGUGCCA 3'

Após a síntese os braços variáveis dos tRNAs 04, 07 e SELC e, o braço acceptor do SELC foram levados a temperatura de 80⁰C para que ocorresse o anelamento dos nucleotídeos e o processo de enovelamento fosse iniciado. O enovelamento desses braços foi realizado como descritos no item 3.5.3 desta seção. A sequência de nucleotídeos do braço acceptor SELC sofreu uma modificação de dois nucleotídeos a fim de evitarmos a formação de *airpins*. Esses nucleotídeos estão destacados em vermelho na sequência descrita acima.

3.6 Estudos de espalhamento de luz dinâmico da seril-tRNA sintetase

Espalhamento de luz dinâmico (DLS) é uma técnica utilizada para determinar o tamanho de partículas. Com esta técnica é possível medir alguns parâmetros tais como: peso molecular, o raio de giração e constante de difusão translacional. Neste experimento, um feixe de luz monocromático é incidido sobre uma solução, e ao passar pela amostra, o comprimento de onda da luz incidente é modificado. Essa mudança está relacionada com o tamanho da partícula e as flutuações na luz espalhada são devido ao movimento Browniano. Considerando as partículas como sendo esféricas é possível calcular a distribuição do tamanho das esferas e obter a descrição do movimento das mesmas no meio. Medindo para tanto o coeficiente de difusão da partícula através da função de autocorrelação. A constante de difusão é dada por:

$$D = K_B T / 6\pi\eta r_h \quad (1)$$

onde: r_h é o raio hidrodinâmico, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em kelvin, η é a viscosidade do solvente.

Medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas para a *TbSerRS* nativa a fim de determinarmos o seu estado de oligomerização em solução. Estas medidas foram realizadas com a *TbSerRS* na concentração de 10 mg/mL a 10⁰C, utilizando o equipamento *Zetasizer uV Protein Sizer Analyzer* (Malvern) do Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC - USP).

3.7 Estudos de espalhamento de raios X a baixo ângulo

Através de espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) é possível obter forma a baixa resolução, estrutura quaternária, formação de complexo, adicionar porções procuradas para modelos de alta resolução e analisar misturas oligoméricas e processos cinéticos. A fim de obtermos o envelope molecular da *TbSerRS* medidas de SAXS foram realizadas em tampão 25 mM de HEPES pH 7.25, contendo 500 mM de NaCl, 5 mM DTT e 5% glicerol, em três concentrações diferentes: 1, 3 e 10 mg/mL. O experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - Campinas, SP) na linha SAXS2 utilizando o detector PILATUS (DECTRIS, Suíça). Medidas de SAXS com a *TbSerRS* ligada ao tRNA^{Ser} e com as isoformas do tRNA^{Ser} foram realizados no SOLEIL Synchrotron (Saint Aubin – França) utilizando a linha SWING. Esta linha de luz possui um HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) acoplado que permite separar populações diferentes de uma dada amostra antes da coleta de dados de SAXS, o que assegura uma boa qualidade da medida. O espalhamento foi realizado utilizando o momento de transferência de $0.0014 < q < 0.34 \text{ \AA}^{-1}$, onde $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, 2θ é o ângulo de espalhamento, e $\lambda = 1.48 \text{ \AA}$ é o comprimento de onda dos raios X. As medidas foram realizadas no vácuo com tempo de exposição de 5 minutos. Os perfis de espalhamento experimental a partir das amostras foram corrigidos pelo espalhamento *background* do solvente e processados utilizando os procedimentos padrão do programa ATSAS⁵⁸. As funções de distribuição de distâncias $p(r)$ e a distância máxima ($D_{\text{máx}}$) foram calculadas pelo método da Transformada Inversa de Fourier. Esse método é implementado no programa GNOM⁵⁹. Este *software* pode tratar dados experimentais de sistemas monodispersos de partículas globulares, monodispersos de partículas alongadas, monodispersos de partículas achatadas, monodispersos de partículas esféricas e polidispersos de partículas com um fator forma arbitrários. A massa molecular foi calculada a partir da curva experimental utilizando SAXSmoW⁶⁰. Os modelos resíduos *dummy ab initio* a baixa resolução foram gerado pelos programa DAMMIN⁶¹. E a comparação das curvas de espalhamento preditas com as dos modelos de alta resolução (PDB: 3LSQ) foi realizada pelo CRY SOL⁶². A sobreposição dos modelos *ab initio* a baixa resolução com a estrutura cristalográfica foram executados pelo SUPCOMB⁶³.

3.8 Cristalografia por difração de raios X da seril-tRNA sintetase

3.8.1 Cristalização da seril-tRNA sintetase

O principal objetivo da cristalização de uma macromolécula biológica, como por exemplo, proteínas, ácidos nucleicos e vírus é o seu estudo estrutural. E a principal técnica para investigação da estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas, tem sido a cristalografia por difração de raios X. O estudo estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos. Os principais passos envolvidos no processo de resolução da estrutura de uma macromolécula biológica são: purificação, cristalização, coleta de dados, determinação das fases, obtenção do mapa de densidade eletrônica, refinamento e análise estereoquímica do modelo.

As triagens iniciais pela busca da condição de cristalização da *TbSerRS* foram realizadas por meio do robô de cristalização *Roneybee* que empregou as soluções dos kits Classics Suite, Classics II Suite, PEGs Suite, PEGs II Suite e MPD Suite da QIAGEN. Utilizando o método de difusão de vapor, *sitting drop*, gotas de 0.7 μ L da solução contendo, 10 mg/mL da *TbSerRS* em tampão 25mM Hepes-NaOH, pH 7.25, contendo 500mM de NaCl, 5mM DTT e 5% de glicerol, misturadas a 0.7 μ L da solução do poço foram equilibradas contra 120 μ L da solução de cristalização. Para as condições que apresentaram cristais foram feitas algumas otimizações como pequenas mudanças de pH, concentração de precipitante e/ou concentração da proteína e variação no método de difusão. Nesse caso, foram utilizados reagentes de alta pureza dos fabricantes Sigma e J. T. Baker.

Além de experimentos de co-cristalização com dAMP (2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato), MgCl₂, L-serina, tRNA^{Sec} (SELC), isoformas do tRNA^{Ser}, experimentos de *soaking* também foram realizados. Para a realização do *soaking* foram utilizados os cristais obtidos da *TbSerRS* nativa.

Os experimentos de co-cristalização com os tRNAs foram realizadas no *SOLEIL Synchrotron* utilizando o robô de cristalização *mosquito® Crystal* (TTP Labtech). Essas triagens foram realizadas utilizando a estequiometria *TbSerRS*-tRNA de 112 μ M:135 μ M,

respectivamente. O processo de ligação *TbSerRS* – tRNA foi realizado através da incubação do complexo a 23°C por 40 minutos. O método de difusão de vapor utilizado foi *sitting drop*, onde gotas de 0.2 µL da solução do complexo *TbSerRS* – tRNA, em 25mM Hepes-NaOH, pH 7.25, contendo 300mM de NaCl, 5mM DTT e 5% de glicerol, misturadas a 0.2µL da solução do poço foram equilibradas contra 60 µL da solução de cristalização. Para a cristalização desse complexo dois *kits* foram utilizados. Um para a cristalização específica de complexos proteína-ácidos nucleicos, Natrix HT (Hampton Research), e o JBScreen JCSG ++ HTS (Jena Bioscience).

Além dos experimentos de co-cristalização e *soaking* com os tRNAs inteiros tentativas de cristalização com porções dos tRNAs também foram executadas. Quatro braços de tRNAs diferentes (braço variável dos tRNAs 04, 07 e SELC e braço acceptor do SELC) foram construídos como descritos no item 3.5.4 da secção de Materiais e Métodos. Os procedimentos de co-cristalização com essas porções dos tRNAs seguiram aos mesmos procedimentos executados para os tRNAs inteiros.

Todos os cristais obtidos foram resfriados em nitrogênio líquido.

Os experimentos de cristalização da *TbSerRS* com seus substratos, coleta de dados, refinamento dos modelos e análises estruturais foram realizados em colaboração com a Dr^a Beatriz Guimarães, cientista de linha responsável pela linha de luz Proxima1 do *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin – França). Estes experimentos fizeram parte de um estágio durante meu doutorado ao grupo coordenado pelo Dr. Andrew Thompson.

3.8.2 Coleta de dados e resolução estrutural

No total foram coletados dezesseis conjuntos de dados a 100 K na linha PROXIMA1 no *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin – França), no mês de dezembro de 2013, utilizando o detector PILATUS 6M (DECTRIS). Os dados coletados foram processados pelo programa *XDS*⁶⁴.

Em um experimento de difração de raios X toda informação da fase é perdida, obtendo-se apenas a intensidade e a posição relativa dos feixes difratados. Alguns métodos

foram desenvolvidos a fim de resolver o “problema da fase”. Um desses métodos, atualmente muito utilizado, é a substituição molecular onde as fases são determinadas a partir de um modelo de busca. A determinação das fases para a construção de nossos modelos foram determinadas através deste método utilizando o programa *Phaser*⁶⁵ e a SerRS de *Trypanosoma brucei* como modelo de busca (código do PDB: 3LSQ). O refinamento e a construção dos modelos foram realizados utilizando os programas *Buster*⁶⁶ e *Coot*⁶⁷. A qualidade dos modelos foi avaliada pelo programa *MolProbity*⁶⁸ e as figuras foram geradas pelo programa *PyMOL*⁶⁹.

Em colaboração com Dr. Humberto D’ Muniz Pereira um conjunto de dados foi coletado na linha I04-1 em *Diamond Light Source* (Didcot - Inglaterra).

3.9 Ultracentrifugação analítica

A ultracentrifugação analítica (AU) é uma técnica que usa a força do campo gravitacional para sedimentar partículas dissolvidas em solução. A velocidade de sedimentação de uma partícula depende de sua massa, do coeficiente de atrito, da densidade da partícula e da densidade da solução. Através dessa técnica é possível calcular a massa molecular (MM) para macromoléculas, avaliar a distribuição de diferentes oligômeros em uma dada solução e ainda calcular a estequiometria e constantes associação e dissociação envolvidas formação de complexos. Atualmente, existem dois tipos de ultracentrifugação analítica: velocidade de sedimentação (SV) e sedimentação em equilíbrio (SE). SV baseia-se na sedimentação da partícula utilizando altas velocidades, enquanto que, SE está baseada em princípios termodinâmicos sendo sensível a massa molecular. O processo de sedimentação é avaliado por meio da medida de absorvância ou índices de refração em comprimentos de ondas específicos em função do tempo⁷⁰. A medida que a macromolécula sedimenta há uma variação na concentração da amostra. Esta diferença de concentração em função do tempo é registrada como uma diferença de absorção. É possível obter informações quantitativas utilizando programas computacionais, como *SEDFIT*⁷¹, através da relação entre coeficiente de sedimentação (s), o coeficiente de difusão (D) e a massa molécula M (Equação 2).

$$M = \frac{sRT}{D(1 - V_{bar} \rho_f)} \quad (2)$$

onde ρ_f é a densidade do líquido, R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta, V_{bar} volume parcial específico da partícula.

A sedimentação em equilíbrio está baseada na equação de Lamm (Equação 3) que descreve a variação da concentração de espécies em função do tempo e da posição radial, sob influência da sedimentação e difusão na cela. Por meio deste método é possível determinar a massa molecular de macromoléculas com grande exatidão.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[rD \frac{\partial c}{\partial r} - s \omega^2 r^2 c(r, t) \right] \quad (3)$$

$c(r, t)$ representa a concentração de migração e difusão de uma solução de partículas monodispersas, ω é a velocidade angular do rotor, s é o coeficiente de sedimentação, D é o coeficiente de difusão.

Experimentos de ultracentrifugação analítica foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas – Brasil) em colaboração com o Prof. Dr. Júlio César Borges. Este experimento teve por objetivo avaliar a distribuição oligomérica da *TbSerRS* nativa em solução e a estequiometria de ligação *TbSerRS* – tRNA. As medidas de velocidade de sedimentação (SV) e de sedimentação em equilíbrio (SE) foram executadas na centrífuga analítica da *Beckman Coulter Optima™ XL-A*. Medidas de SV foram realizadas em corridas de 12 horas monitoradas no comprimento de onda de 276 nm na rotação de 25000 rpm a 7°C. Cinco concentrações diferentes da *TbSerRS* 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 e 1mg/mL, em 25 mM Hepes, pH 7.25, contendo 500 mM NaCl, 5% glicerol e 5mM β -mercaptetanol, foram utilizadas nestas medidas. Os dados de SV foram ajustados pelo programa SEDFIT⁷¹ e os coeficiente de sedimentação teórico, o coeficiente de difusão e a massa molécula *TbSerRS* teóricos foram estimados pelo programa Sednterp⁷².

O experimento de sedimentação em equilíbrio foi realizado a temperatura constante de 7°C sendo monitorado no comprimento de onda de 290 nm. As amostras foram submetidas a sedimentação em 7000, 9000 e de 1100 rpm por um período de 12 horas para cada velocidade. Para este experimento utilizamos a proteína na concentração de 4.7 µM, utilizando duas estequiometrias diferentes de interação proteína-tRNA, de 1:1 e 1:2. O *fitting* dos dados de absorbância *versus* raio da cela foi realizado pelo programa SedPhap⁷². A distribuição da proteína ao longo da cela foi fitada de acordo com a seguinte equação para a associação do sistema:

$$C = C_{\text{monômero}, r_0} \exp [M(1-V_{\text{barp}})\omega^2(r^2-r_0^2)/2RT] \quad (4)$$

onde C é a concentração de proteína na posição radial r, $C_{\text{monômero}, r_0}$ é a concentração de proteína na posição radial r_0 (posição radial inicial) e ω é a velocidade angular centrífuga.

Devido ao fato de dados reportados pela literatura demonstrarem que as SerRSs são diméricas, dois modelos de heteroassociação para a interação proteína-tRNA foram testados de acordo com as seguintes reações químicas:

Essas reações foram esquematizadas levando em conta as estequiometrias de interação proteína-tRNA 1:1 e 1:2. A massa molar e a absorbância molar foram calculadas pelo programa Sednterp⁷².

3.10 Medidas de cinética enzimática da *TbSerRS* selvagem

Com o objetivo de determinar a afinidade de ligação entre enzima e substrato e a eficiência catalítica da enzima, medidas de cinética foram realizadas para *TbSerRS* selvagem.

A seril-tRNA sintetase, como um membro da classe II das aaRSs, joga um papel essencial em todos os organismos vivos aminoacilando o tRNA^{Ser} e o tRNA^{Sec} com serina. O primeiro passo da reação de aminoacilação catalisada pela SerRS é a ativação da serina por Mg⁺² e ATP levando a formação de um intermediário estável (Ser-AMP), com liberação de pirofosfato inorgânico (PP_i). Posteriormente, ocorre a mudança do radical Ser do intermediário Ser-AMP para o tRNA, e subsequentemente no caso da via de biossíntese de selenocisteína, ocorre a conversão enzimática Ser-tRNA para Sec-tRNA. A fim de determinarmos se a *TbSerRS* encontrava-se ativa, ou seja, se ela era capaz de formar o intermediário Ser-AMP iniciamos testes de cinética enzimática. Para isso, utilizamos o *kit EnzChek® Pyrophosphate Assay Kit* (Molecular PROBES). Este *kit* pode ser utilizado para a quantificação de PP_i em solução ou para a determinação de PP_i liberado nas reações enzimáticas, como no caso das seril-tRNA sintetases que liberam PP_i no primeiro passo da reação de aminoacilação catalisada pela SerRS. Este *kit* fornece um método espectrométrico rápido para a medida do PP_i produzido através de reações bioquímicas. O *kit* inclui a enzima pirofosfatase inorgânica que catalisa a conversão de PP_i em duas moléculas de fosfato inorgânico (P_i). Na presença de P_i o substrato 2-amino-6-mercaptopurina ribonucleosídeo (MESG) é convertido enzimaticamente, pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP), em ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercaptopurina. A conversão de MESG resulta em uma mudança na absorbância de 330 nm, do substrato, para 360 nm pelo produto.

Inicialmente, pré-incubamos a enzima SerRS com ATP/Mg⁺² a 4°C por 30 minutos. Em seguida, a esta reação foi adicionado os reagentes do *kit*, descritos na Tabela 5, por 10 minutos a 22 °C. E então, iniciamos a reação catalisada pela SerRS com 1 mM de L-serina e imediatamente iniciamos a leitura da absorbância a 360 nm em função do tempo. O controle utilizado para o monitoramento da reação foi feito através da montagem da mesma reação descrita acima, utilizando o tampão de reação como o substrato para iniciar a reação ao invés de L-serina. Os experimentos iniciais de cinética enzimática foram realizados em colaboração com o Dr. Matheus Postigo.

Tabela 5 - Descrição das quantidades dos componentes utilizados para a detecção de PP_i no primeiro passo da reação de aminoacilação.

Componentes da Reação	Quantidades
Tampão reacional 20X	25 µL
Substrato MESG	100 µL
PNP	5 µL
Pirofosfatase inorgânica	5 µL
<i>ATP/MgCl₂</i> (100 mM / 20 mM)	50 µL (10 mM / 2 mM)
<i>L-Serina</i> (10 mM)	50 µL (1 mM)
<i>TbSerRS</i> (25 µM)	20 µL (1 µM)
Água Estéril	245 µL
Volume Final	500µL

Fonte: Elaborada pela autora.

Capítulo 4- Resultados e Discussão

4.1 Purificação da enzima seril-tRNA sintetase

Após a detecção de um RNA ligado a *TbSerRS* através da eletroforese em gel de poliacrilamida nativo (Figura 8 e 9) e por meio de análises executadas no *Qubit Quantitation Platform*, como descrito no item 3.3 da secção de Materiais e Métodos, a amostra foi adaptada a um novo tampão (25 mM Hepes – NaOH, pH 7.25, contendo 500 mM NaCl, 5 mM DTT e 5% glicerol).

Figura 8 - Gel de poliacrilamida nativo, corado com brometo de etídio: (1) Marcador de massa molecular; (2) *TbSerRS* tratada com RNase 37 °C; (3) *TbSerRS*; (4) *TbSerRS* tratada com RNase a 4 °C *overnight*.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Gel de poliacrilamida nativo corado com Comassie R 350 stain : (1) Marcador de massa molecular; (2) *TbSerRS* tratada com RNase 37 °C; (3) *TbSerRS*; (4) *TbSerRS* tratada com RNase a 4 °C *overnight*. Fonte: Elaborada pela autora.

Seguindo os passos de purificação, descritos no item 3.4 na secção de Materiais e Métodos, inicialmente, a amostra foi aplicada a cromatografia por afinidade sendo eluída a partir de 100 mM de imidazol. A quantidade majoritária da *TbSerRS* foi eluída em 250 mM de imidazol (Figura 10). Posteriormente, a amostra foi incubada com 15% de *nycodenz*, concentrada e aplicada à coluna de exclusão molecular.

Figura 10 - Análise por SDS-PAGE da referente a eluição da *TbSerRS* pela coluna de afinidade (Ni-NTA): (1) padrão de massa molecular, (2) *flow-through* (3), (4) e (5) lavagens com tampão A (25 mM Hepes / NaOH pH 7.25, 500 mM NaCl, 5% glycerol, 5mM DTT) contendo 25mM Imidazol), (6) e (7) lavagens com tampão A contendo 100 mM Imidazol), (8) eluição da quantidade majoritária da *TbSerRS* com tampão A contendo 250mM Imidazol. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Determinação da massa molecular e Raio de Stokes por meio da cromatografia de exclusão molecular

A determinação do raio de Stokes e da massa molecular da *TbSerRS* foi calculada através dos volumes de eluição obtidos por meio da cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna *Superdex* 200 HR 10/30 (GE) e proteínas de peso molecular e Raio de Stokes conhecidos. O perfil cromatográfico obtido para *TbSerRS* encontra-se ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Perfil cromatográfico, obtido pela cromatografia de exclusão molecular *Superdex* 200 HR 10/30 (GE) para a *TbSerRS*. O pico1: representa a eluição da *TbSerRS*. Pico2: representa a eluição do *nycodenz*. Fonte: Elaborada pela autora.

O volume de eluição da *TbSerRS* e de proteínas padrões (V_e) obtidos pelos perfis cromatográficos foram convertidos em K_{av} utilizando a seguinte equação:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0} \dots (5)$$

onde V_e é o volume de eluição da amostra, V_0 é o volume *flow-through* da coluna e V_c é o volume geométrico da coluna em mL.

O volume *flow-through* da coluna obtido pela aplicação do Dextran e o volume de coluna geométrico da *superdex* 200 10/30 (GE) é de 8.75 mL e de 23.56 mL, respectivamente.

A massa molecular referente ao pico do perfil cromatográfico obtido para *TbSerRS* e o raio de Stokes foram determinados utilizando os gráficos de calibração linear de K_{av} versus $\log MW$ (Figura 12) e, $(-\log K_{av})^{1/2}$ versus raio de Stokes (Figura 13), respectivamente. Estes gráficos foram obtidos a partir das proteínas descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Proteínas com massa molecular e Raio de Stokes utilizados para a obtenção das curvas de calibração K_{av} versus $\log MW$ e, $(-\log K_{av})^{1/2}$ versus raio de Stokes. O volume de eluição foi obtido a partir da coluna *Superdex* 200 HR 10/30 (GE) e do tampão: 25mM Hepes-NaOH, pH 7.25, contendo 500mM NaCl, 5% glicerol e 5mM DTT.

Padrões Moleculares	Massa Molecular (KDa)	Raio de Stokes (nm)	Volume de eluição (mL)
Ovoalbumina	43	3.05	16.36
Conalbumina	75	3.57	15.11
Aldolase	158	4.81	13.66
Ferritina	440	6.10	11.44
Thyroglobulina	669	8.5	10.23

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 - Curva de calibração linear K_{av} versus $\log MW$ para proteínas com massa molecular conhecida.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Curva de calibração linear $(-\log K_{av})^{1/2}$ versus raio de Stokes para proteínas com o Raio de Stokes conhecido. Fonte: Elaborada pela autora.

Por meio da curva de calibração, ilustrada na Figura 12, obtemos a equação para o cálculo da massa molecular, que é dada por:

$$\log MW = (3.14822 \pm 0.02886) + (- 2.93346 \pm 0.08323) K_{av} \quad (6)$$

E através da curva de calibração, ilustrada na Figura 13, obtemos a equação para o cálculo do Raio de Stokes, dada por:

$$\text{Raio Stokes} = (- 3.24517 \pm 0.7261) + (11.431 \pm 0.95732) * (- \log K_{av})^{1/2} \quad (7)$$

Então, utilizando as equações 6 e 7 e os volume de eluição obtido pelo perfil cromatográfico da *TbSerRS* calculamos a massa molecular e o raio de Stokes para *TbSerRS* nativa . Os resultados destes cálculos estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Massa molecular e raio de Stokes obtidos a partir das curvas de calibração para *TbSerRS* a para os picos ilustrados na Figura 11. Os Picos 1, 2 e 3 são referentes a *TbSerS*, ao *nycodenz* e a *TbSerRS* ligada ao tRNA endógeno, respectivamente.

Amostras	Volume de eluição – <i>Superdex 200 HR 10/30</i>	Massa Molecular (KDa)	Raio de Stokes (nm)
Pico 1	14.37	108.2 ± 0.9	4.1 ± 1.0
Pico 2	-	-	-
Pico 3	12.9	159.0 ± 0.9	4.7 ± 1.0

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os dados da Tabela 7 verificamos que a massa molecular e o Raio de Stokes encontrados para a *TbSerRS* é de (108.2 ± 0.9) KDa e (4.1 ± 1.0) nm, respectivamente. Este valor de massa molecular apresenta um erro relativo de 0.5% em relação a massa teórica calculada pela sequência de aminoácidos (107.6 KDa). Ao compararmos o valor do Raio de Stokes e da massa molecular, obtidos pelas novas adaptações no processo de purificação, com os valores encontrados antes da remoção do RNA endógeno, observamos que valores atuais são menores. O que pode indicar a possível a remoção do RNA ligado a *TbSerRS*. Estes valores, tanto para a massa molecular quanto para o raio de Stokes, corroboram com o estado ativo da enzima (dimérico) descrito na literatura²⁶.

4.3 Espalhamento de luz dinâmico da *TbSerRS*

Este experimento foi realizado com o intuito de obtermos o raio hidrodinâmico e podermos comprar com o Raio de Stokes, obtido pela cromatografia de exclusão molecular, e com o raio de giração obtido pelo espalhamento de raios X a baixo ângulo. A medida realizada com a *TbSerRS* nativa a 10 mg/mL encontra-se descrita na figura abaixo.

Figura 14 - Medida de espalhamento de luz dinâmico da *TbSerRS* nativa realizada no *Zetasizer uV Protein Sizer Analyzer* a temperatura de 10⁰C. Fonte: Elaborada pela autora.

O raio hidrodinâmico obtido pra *TbSerRS* foi de (4.88 $\pm$ 5.76) nm. Neste experimento não levamos em conta o valor da massa molecular obtida. Isso devido ao fato de que os cálculos realizados para a massa molecular pelo *Zetasizer uV Protein Sizer Analyzer*

(Malvern) utilizam somente proteínas globulares e, como as SerRSs são proteínas que, normalmente, possuem um N-terminal em forma de um braço, representado por duas hélice- α o erro introduzido nos cálculos dessa massa molecular seria razoável.

4.4 Amplificação do gene de inserção de selenocisteína-tRNA^{Sec} (*selC*) e das isoformas do tRNA^{Ser}

Os genes *selC* e os das isoformas do tRNA^{Ser} foram amplificados, como descritos no item 3.5.1 da secção de Materiais e Métodos.

Figura 15 - Análise em gel de agarose da amplificação correspondente aos genes *selC* e das isoformas do tRNA^{Ser} de *Trypanosoma brucei*. 1) padrão de massa molecular 1Kb Plus (Fermentas). 2) gene para o tRNA^{Ser} 03a (103pb), 3) gene para o tRNA^{Ser} 03b (103pb), 4) gene para o tRNA^{Ser} 04 (103pb), 5) gene para o tRNA^{Ser} 07 (103pb) e 6) gene *selC* (112pb). A seta evidencia a amplificação correspondente aos fragmentos. Fonte: Elaborada pela autora.

Através da análise da eletroforese em gel de agarose acima, verificou-se que os fragmentos foram corretamente amplificados.

Posteriormente, os produtos purificados do gel de agarose 2% através do kit de purificação *Perfectprep Gel Clean Up* (Eppendorf) foram submetidos ao processo de transcrição *in vitro*. Os transcritos purificados foram solubilizados em água livre de RNase, enovelados e mantidos a temperatura de -20°C .

4.5 Ultracentrifugação analítica

A análise dos dados de velocidade de sedimentação da *TbSerRS* mostra que a proteína se apresenta homogênea na faixa de concentração entre 0,2 - 1,0 mg/mL, conforme apresentado na curva de $c(S)$ em função do valor do coeficiente de sedimentação a 20°C $s_{20,w}$ (Figura 16). Os valores de s obtidos nos ajuste da curva de $c(S)$ foram corrigidos para as condições padrões (água, 20°C), e por regressão linear foi realizada a extrapolação para concentração infinitamente diluída com o intuito de determinarmos $s_{20,w}^0$. O valor de $s_{20,w}^0$ e da massa molecular foi de (4.99 ± 0.02) S e 106 ± 1 kDa, respectivamente. Estes dados sugerem que a *TbSerRS* se comportou como um dímero em solução.

Figura 16 - Distribuição contínua dos coeficientes de sedimentação da *TbserRS* para cinco concentrações diferentes 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 mg/mL. Fonte: Elaborada pela autora.

Análises da estrutura cristalográfica apresentada no modelo da seril-tRNA sintetase (código do PDB: 3LSQ) pelo programa HydroPro sugere o valor de $s_{20,w}$ de 5,58 S. Comparado ao resultado experimental, este dado sugere que a estrutura cristalográfica é levemente mais globular do que a proteína em solução. Provavelmente as estruturas em hélices- α da região do N-terminal devem apresentar uma determinada flexibilidade e assumir uma forma mais aberta em solução comparada ao modelo cristalográfico.

Os dados de sedimentação em equilíbrio para a SerRS confirmam seu estado oligomérico na forma dimérica e MM de 113 ± 3 kDa. Através das análises dos experimentos de ultracentrifugação analítica de sedimentação em equilíbrio verificamos que a distribuição da proteína ao longo da cela foi ajustada pelos dois modelos de heteroassociação utilizados para a interação proteína-tRNA. 1:1 e 1:2 (Tabela 8). Podemos supor que ocorreu a interação proteína-tRNA, mas não podemos determinar com precisão a estequiometria deste complexo.

Tabela 8 - Constantes de dissociação obtidas a partir da sedimentação em equilíbrio para dois modelos de heteroassociação para a interação *Tb*SerRS-tRNA levando em consideração a estequiometria de 1:1 e 1:2.

Célula	Amostra	Análises de espécies (kDa)	Heteroassociação (<i>Global analysis</i>)				
			A + B $\leftrightarrow$ AB		A + B + B $\leftrightarrow$ {AB} + B $\leftrightarrow$ ABB		
			K _D (μ M)	Chi ²	K _{D1} (μ M)	K _{D2} (μ M)	Chi ²
1	SerRS	113 $\pm$ 3 ⁸	-	-	-	-	-
2	SerRS-tRNA (03A)	-	1,00 $\pm$ 0,04	6,6 e ⁻¹	1,8 $\pm$ 0,1	8,2 $\pm$ 0,3	7,5 e ⁻¹
3	SerRS-tRNA (03B)	-	1,01 $\pm$ 0,04	5,8 e ⁻¹	1,0 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	5,5 e ⁻¹
5	SerRS-tRNA (04)	-	1,1 $\pm$ 0,2	5,4 e ⁻¹	0,8 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,5	5,3 e ⁻¹
6	SerRS-tRNA (07)	-	32 $\pm$ 2	4,6 e ⁻¹	43 $\pm$ 3	154 $\pm$ 6	4,4 e ⁻¹
7	SerRS-SelC	-	1,08 $\pm$ 0,08	7,3 e ⁻¹	1,4 $\pm$ 0,1	6,1 $\pm$ 0,3	7,3 e ⁻¹

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Espalhamento de raios X a baixo ângulo

Medidas de SAXS foram realizadas com a *Tb*SerRS na forma apo em diferentes concentrações, a fim de verificarmos o estado oligomérico, em solução e em diferentes concentrações (1, 3 e 10mg/mL) . As curvas de espalhamento de raios X em diferentes concentrações da *Tb*SerRS na forma nativa obtidas pelos procedimentos padrão do programa ATSAS⁵⁸ estão ilustradas na Figura 17.

Figura 17 - Curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo para a *TbSerRS* nativa nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/mL. O inserto ilustra as cores das curvas correspondentes a cada concentração. Fonte: Elaborada pela autora.

Nota-se que à medida que a concentração da enzima é aumentada as curvas de espalhamento não sofrem mudanças drásticas no início da curva o que indica a ausência de agregação da enzima até a concentração de 10mg/mL. Os procedimentos seguintes foram realizados com a proteína nessa concentração. A curva de espalhamento da *TbSerRS* na forma nativa a 10 mg/mL está representada na Figuras 18.

Figura 18 - Curva de espalhamento da *TbSerRS* nativa em solução a concentração de 10mg/mL. Fonte: Elaborada pela autora.

O raio de giração (R_g), que correspondente a distância média quadrática dos elétrons ao seu centro de gravidade, pode ser obtido por meio do gráfico de Guinier. Guinier observou que quando q tende a zero, a curva de intensidade pode ser descrita como uma função exponencial.

$$I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (8)$$

Para um sistema monodisperso o gráfico de Guinier é representado por uma reta $\ln$ (Intensidade) versus q^2 que intercepta $I(0)$ e, portanto, a inclinação dessa reta é o R_g ⁷³. O raio de giro calculado pela aproximação de Guinier para *TbSerRS* nativa foi de 3.63 nm (Figura 19).

Figura 19 - Gráfico de Guinier ($\ln$ Intensidade versus q^2) da *TbSerRS* nativa a concentração de 10mg/mL, utilizando 22 pontos iniciais. Fonte: Elaborada pela autora.

A dimensão máxima ($D_{\text{máx}}$) e o R_g calculados a partir da função de distribuição de distâncias, $P(r)$, obtidos pelo programa GNOM⁵⁹ para a *TbSerRS* nativa foram de 122 Å e 3.73 nm, respectivamente (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico da função de distribuição de distância, $P(r)$ versus r , para a *TbSerRS* nativa obtido pelo programa GNOM⁵⁹. Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com os cálculos executados por meio do programa SAXSmoW⁶⁰ nota-se a existência de dímeros em solução para *TbSerRS* na forma nativa (Figura 21).

Figura 21 - Cálculo da massa molecular e número de subunidades em solução da *TbSerRS* nativa obtidos pelo SAXS MoW⁶⁰. Fonte: Elaborada pela autora através do programa SAXSMOW⁶⁰.

A sobreposição da curva de espalhamento experimental com a curva do modelo de alta resolução (PDB: 3LSQ) gerada pelo CRY SOL⁶² produziu um χ^2 de 2.75 (Figura 22).

Figura 22 - Sobreposição das curvas de espalhamento experimental da *TbSerRS* nativa com a curva do modelo de alta resolução (PDB:3LSQ) gerada pelo software CRY SOL⁶². Fonte: Elaborada pela autora.

Modelos de átomos *dummy* foram gerados através do programa DAMMIN⁶¹ utilizando 5642 átomos *dummy*. A sobreposição do modelo *ab initio* a baixa resolução com a estrutura cristalográfica realizada pelo programa SUPCOMB⁶³ está ilustrado na Figura 23.

Figura 23 - A sobreposição do modelo *ab initio* a baixa resolução com a estrutura cristalográfica (PDB:3LSQ) realizada pelo programa SUPCOMB⁶³ considerando a simetria de ordem 1. O modelo de alta resolução está representado pela estrutura em *cartoon* (hélices- α e folhas- β), com o de baixa resolução (*TbSerRS* nativa) representado pelas esferas. Os modelos estão rotacionados de 90° em relação aos eixos x e y. Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da sobreposição da curva de espalhamento do modelo cristalográfico com a curva experimental obtida pelo SAXS ter produzido um bom ajuste, o modelo cristalográfico não se encaixou perfeitamente no envelope gerado por SAXS. Outros modelos foram gerados considerando simetria de ordem 1 e de ordem 2 utilizando também o programa GASBOR⁶² mas, não obtivemos diferenças significativas quando comparamos com os dados obtidos pelo programa DAMMIN⁶¹. Observa-se que esta sobreposição não foi perfeita na região do N-terminal. Esta região é composta pelo braço-hélice, composto de duas hélices- α , e é considerada uma região flexível. Estas hélices são responsáveis pela interação com o tRNA e, provavelmente, a formação do complexo poderia estabilizar esta região produzindo um melhor encaixe no envelope molecular. Além disso, a técnica de ultracentrifugação analítica mostrou que o modelo cristalográfico é levemente mais globular que a proteína em solução, o que explicaria o fato da sobreposição desse modelo no envelope de SAXS não ser perfeita.

Os dados obtidos por SAXS corroboram com dados obtidos por gel filtração e pelo espalhamento de luz dinâmico apontando que a *TbSerRS* nativa se comporta como dímero em solução.

Dados de SAXS em interação com os tRNA foram coletados no SOLEIL Synchrotron na linha SWING. A amostra antes de sofrer o processo de espalhamento foi aplicada a um HPLC. Durante o experimento, através da análise dos cromatogramas verificamos que a ligação do complexo foi desfeita. Isso pode ser devido a fraca interação entre o complexo *TbSerRS*-tRNA.

4.7 Cristalografia por difração de raios X da seril-tRNA sintetase

4.7.1 Cristalização e coleta de dados da seril-tRNA sintetase

Os melhores cristais obtidos para a *TbSerRS* nativa cresceram em: 2.4 M de malonato de sódio, pH = 7.0, 10 mM MgCl₂, a temperatura de 18 °C, por aproximadamente quatro dias, difratando a resolução de 1.8 Å (Figura 24). A partir destes cristais experimentos de *soaking* foram realizados com o tRNA^{Sec}; com as isoformas do tRNA^{Ser}; com os braços variável dos tRNAs 04, 07 e SELC; com o braço acceptor do SELC; L-serina e com dAMP. Através dessa metodologia treze conjuntos de dados foram coletados. Todas as condições de *soaking* nas quais os cristais foram obtidos e as resoluções das coletas de dados de cada um dos cristais estão sumarizadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Soaking realizado com os diferentes substratos da *TbSerRS*: dAMP (2'-deoxiadenosina 5'-monofosfato), L-serina, tRNA^{Sec} (SELC), isoformas do tRNA^{Ser}, braço variável 4, braço variável 7, braço variável SELC e braço acceptor SELC, utilizando o cristal obtido para a enzima nativa (condição: 2.4 M de malonato de sódio, pH 7.0, 10 mM MgCl₂). Nesta tabela estão dispostos as diferentes combinações entre os substratos, o tempo de *soaking* e a resolução que estes cristais difrataram utilizando 20% de glicerol como agente crioprotetor. As coletas de dados desses cristais foram realizadas no *SOLEIL Synchrotron* (Saint Aubin – França).

Substratos	Tempo de <i>Soaking</i>	Resolução (Å)
2mM dAMP	<i>Overnight</i>	1.75
2mM dAMP 4 mM serina	<i>Overnight</i>	1.8
Braço variável 7	<i>Overnight</i>	1.9
Braço variável 4 2mM serina 4mM dAMP	<i>Overnight</i>	1.8
Braço variável 7 2mM serina 2mM dAMP	<i>Overnight</i>	2.45
Braço variável SELC	<i>Overnight</i>	3.6
Braço variável SELC 2mM serina 2mM dAMP	<i>Overnight</i>	1.85
Braço acceptor SELC	<i>Overnight</i>	1.9
Braço acceptor SELC 2mM serina 2mM dAMP	<i>Overnight</i>	1.85
Braço variável SELC Braço acceptor SELC	<i>Overnight</i>	2.25
Braço variável SELC Braço acceptor SELC 2mM serina 2mM dAMP	<i>Overnight</i>	1.85
tRNA SELC	10 minutos	2.5
tRNA 07	5 minutos	1.95

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos experimentos de co-cristalização obtivemos cristais em complexo com L-serina e com uma isoforma do tRNA^{Ser}, tRNA 03B. Estes cristais cresceram em: 2.4 M de malonato de sódio, pH 7.0, 2 mM de L-serina e 10 mM de MgCl₂ (Figura 24); e em 100 mM Tris, pH 8.3, 24% PEG 400, 200 mM MgCl₂ (Figura 25), respectivamente. Os dados coletados com L-serina difrataram a 2.05 Å de resolução, enquanto que, com o tRNA 03B a 7.0 Å de resolução.

Figura 24 – Cristais obtidos pelo método de difusão de vapor *sitting drop*. No lado esquerdo da figura está representado cristais obtidos na co-cristalização da TbSerRS com L-serina (condição de cristalização: 2.4 M de malonato de sódio, pH 7.0, 2 mM de L-serina e 10 mM de MgCl₂). A direita está representado os cristais obtidos para a TbSerRS nativa. Esses cristais foram corados com *Izit Crystal Dye* (HAMPTON RESEARCH) indicando formação de cristais com arranjo de moléculas de proteína. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 25 - Monocristal obtido na co-cristalização da TbSerRS em complexo com o tRNA 03b em 100 mM Tris, pH 8.3, 24% PEG 400, 200 mM MgCl₂. A figura ilustra a montagem do cristal no *loop* no momento da coleta de dados. Fonte: Elaborada pela autora.

A fim de determinarmos as posições dos átomos de magnésio na estrutura da proteína nativa um conjunto de dados foi coletado a baixa energia (6.5 Kev). Este conjunto difratou a resolução 2.4 Å e através dele obtivemos um mapa de dispersão anômala utilizando um único comprimento de onda, onde o sinal anômalo do magnésio pôde ser maximizado.

Em colaboração com o Dr. Humberto D' Muniz Pereira uma única coleta de dados foi realizada no *Diamond Light Source* (Didcot, Inglaterra) para o complexo SerRS-tRNA^{Ser} (03B). Este complexo foi obtido utilizando a técnica de *soaking* como descrito anteriormente. Através desse cristal obtivemos um conjunto de dados a 2.35 Å de resolução.

4.7.2 Processamento e refinamento inicial dos dados cristalográficos da seril-tRNA sintetase nativa e complexada a L-serina, dAMP e a uma isoforma do tRNA^{Ser}

Devido ao fato de que as coletas desses conjuntos de dados foram realizadas no final do mês dezembro de 2013 não tivemos tempo hábil para iniciarmos a determinação das fases e o refinamento dos modelos de todos os conjuntos de dados. Todos os conjuntos de dados foram processados, mas, somente os dados para *TbSerRS* nativa, *TbSerRS*-serina e *TbSerRS*-dAMP foram levadas até o processo inicial de refinamento. Nas tabelas abaixo seguem as estatísticas para o processamento dos dados desses conjuntos e o refinamento inicial dos modelos. Além do processamento dos dados do complexo *TbSerRS*-tRNA^{Ser}(03b).

Tabela 10 - Estatística do processamento e do refinamento dos dados cristalográficos coletados para a *TbSerRS* nativa e para o complexo *TbSerRS*-serina.

	<i>TbSerRS</i> native	<i>TbSerRS</i> -serina
Comprimento de onda (Å)	0.9801	0.9801
Grupo especial	H 3 2	H 3 2
Parâmetros de rede (Å, °)	a = 178,100, b = 178,100, c = 246,750 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	a = 177.850, b = 177.850, c = 247.220 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Resolução (Å)	48.17 – 1.80 (1.864 – 1.80)	47.08 – 2.05 (2.123 – 2.05)
Reflexões totais	711583	537756
Reflexões únicas	138310	93881
Multiplicidade	5.0 (5.0)	5.5(5.7)
Completeza (%)	99.80 (98.80)	99.70 (99.40)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.20 (1.8)	10.4 (1.8)
R _{merge} (%)	0.110 (0.807)	0.816 (0.137)
N ₀ . de moléculas na unidade assimétrica (Z)	2	2
Conteúdo de Solvente (%)	50.10	57.3
Refinamento		
Resolução (Å)	1.80	2.05
R _{work} / R _{free}	0.1846 / 0.1984	0.1817 / 0.2829
B _{factor} médio (Å ²)	38.10	48.0
Rmsd de comprimento de ligação (Å)	0.012	0.012
Rmsd de ângulo de ligação (°)	1.57	1.63
Gráfico de Ramachandarn (%)		
Resíduos com ϕ, ψ em regiões favoráveis	99	98.0
Resíduos com ϕ, ψ em regiões permitidas	1	2
Números de outliers de ϕ, ψ (resíduos)	0	0

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Estatística do processamento e do refinamento dos dados cristalográficos coletados para os complexos *TbSerRS*-dAMP e *TbSerRS*-tRNA^{Ser} (03b).

	<i>TbSerRS</i> – dAMP	<i>TbSerRS</i> -tRNA ^{Ser} (03b)
Comprimento de onda (Å)	0.9801	0.920
Grupo especial	H 3 2	H 3 2
Parâmetros de rede (Å, °)	a = 177.900, b = 177.900, c = 247.380 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$	a = 178.080, b = 178.080, c = 249.740 $\alpha = \beta = 90, \gamma = 120$
Resolução (Å)	48.23 – 1.75 (1.813 – 1.75)	56.76 – 2.41 (10.52 – 2.35)
Reflexões totais	946485	93008
Reflexões únicas	138161	4660
Multiplicidade	6.9 (6.8)	6.8 (7.0)
Completeza (%)	99.90 (99.70)	99.87 (99.96)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14.00 (2.3)	17.3 (2.7)
R _{merge} (%)	0.040 (0.876)	0.095 (0.693)
N ₀ . de moléculas na unidade assimétrica (Z)	2	2
Conteúdo de Solvente (%)	55.30	47.58
Refinamento		
Resolução (Å)	1.75	2.35
R _{work} /R _{free}	0.1729/0.1910	0.2327/0.2625
B _{factor} médio (Å ²)	38.90	32.70
Rmsd de comprimento de ligação (Å)	0.012	0.008
Rmsd de ângulo de ligação (°)	1.57	1.14
Gráfico de Ramachandarn (%)		
Resíduos com ϕ, ψ em regiões favoráveis	99	95.83
Resíduos com ϕ, ψ em regiões permitidas	1	2.74
Números de outliers de ϕ, ψ (resíduos)	0	7

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7.3 Análises preliminares das estruturas da seril-tRNA sintetase nativa e complexada a L-serina e ao dAMP

Todas as análises estruturais descritas abaixo são baseadas em refinamentos iniciais. Essas estruturas ainda estão em fase de refinamento.

4.7.3.1 Seril-tRNA sintetase nativa

A estrutura da *TbSerRS* nativa apresentou valores de R_{work} e R_{free} de 0.1846 e 0.1984, respectivamente. Esses valores demonstraram estatística e uma completeza dos dados de boa qualidade. O gráfico de *Ramachandran* revela que 99 % dos resíduos apresentam-se em regiões favoráveis e, apenas 1 % está em regiões permitidas demonstrando assim uma boa qualidade do modelo gerado. Esta estrutura cristalográfica a 1.80 Å de resolução forma um homodímero composto de 466 resíduos de aminoácidos por monômero. Cada monômero possui um domínio N-terminal bastante flexível e um domínio central catalítico formado de sete folhas- β antiparalelas conectadas por duas α -hélices (Figura 26). Estes domínios são bem característicos das aaRSs da classe II. Existem basicamente quatro regiões flexíveis: a região do N-terminal, um *loop* localizado entre os resíduos 400 – 418 e duas regiões de *gaps*. Um *gap* está localizado entre os resíduos 244 - 245 no monômero A e 242 - 243 no monômero B e, o outro está localizado entre os resíduos 298 - 304 no monômero A e 298 – 305 no monômero B. Através do alinhamento entre os monômeros 900 C α foram sobrepostos com RMSD de 0.6. A maior diferença entre os monômeros reside na porção N-terminal e no *loop* (400 – 418). Este *loop* é orientado em direção ao N-terminal no monômero B, já no monômero A ele é orientado em uma direção oposta. A interface dimérica é composta por 38 resíduos no monômero A e 51 resíduos no monômero B totalizando uma área de 2384.1 Å². Sendo que apenas 25 desses resíduos interagem entre si por ligações de hidrogênio.

Figura 26- Estrutura nativa da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* a 1.8 Å de resolução. Esta estrutura é composta de um homodímero (monômero A colorido e monômero B em rosa), sendo que cada monômero é composto do domínio N-terminal (azul) e um domínio central catalítico representado pelos motivos 1, 2, e 3 coloridos em ciano, amarelo e vermelho, respectivamente. Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.3.2 Seril-tRNA sintetase em complexo com L-serina

A estrutura da *TbSerRS* complexada a L-serina apresentou valores de R_{work} e R_{free} de 0.1817 e 0.2829, respectivamente. Esses valores também demonstraram estatística e uma completude dos dados de boa qualidade. O gráfico de Ramachandran revela que 98 % dos resíduos apresentam-se em regiões favoráveis e, apenas 2 % estão em regiões permitidas.

Esta estrutura apresenta as mesmas regiões flexíveis da estrutura nativa. Em cada monômero no domínio central catalítico, formado pelos motivos 1, 2 e 3, foi encontrada uma densidade que indicaria a presença de L-serina. Após o ciclo de refinamento com este substrato notamos que o mesmo não produziu um encaixe perfeito. Diante disso, levantamos a hipótese que, possivelmente, uma molécula de glicerol poderia ter ocupado a região do sítio ativo ao invés da L-serina. Isso devido à estrutura química dos mesmos serem semelhantes e,

devido ao fato de que esta molécula foi utilizada desde o processo de lise celular. Então, executamos um ciclo de refinamento com o glicerol localizado no sítio ativo da enzima e, verificamos que a substituição pelo glicerol produziu uma solução adequada. Através de mais alguns ciclos de refinamento duas moléculas de glicerol por monômero foram localizadas na região do sítio ativo (Figura 27). A primeira e a segunda molécula de glicerol interage com a *TbSerRS* por ligações de hidrogênio através dos resíduos Thr430, Arg295, Phe309 e Lys316, Glu384, Thr425, respectivamente. A Figura 28 ilustra todas as interações com estes resíduos para cada uma das moléculas de glicerol.

Figura 27 - Estrutura da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* a 2.05 Å de resolução evidenciando a ligação de duas moléculas de glicerol na região do sítio ativo. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 28 - Representação dos resíduos que compõem a região do sítio ativo da *TbSerRS* em interação com duas moléculas de glicerol (Gol). As linhas pontilhadas em verde representam as ligações de hidrogênio. O lado esquerdo da figura mostra as ligações com uma molécula de Gol e o lado direito evidencia a segunda molécula de Gol. Fonte: Elaborada pela autora através do PDBsum¹.

Por meio do alinhamento estrutural da *TbSerRS* nativa com a *TbSerRS* ligada a duas moléculas de glicerol foram sobrepostos 911 Ca com RMSD de 0.15. Através dessa sobreposição, verificamos que as estruturas são muito similares inclusive apresentam as mesmas regiões flexíveis e de *gaps*. Após mais alguns ciclos de refinamentos da *TbSerRS* nativa, notamos também, a existência de duas moléculas de glicerol localizadas na mesma região do sítio ativo, além de, outras densidades que poderiam indicar a presença do íon malonato. Portanto, não conseguimos determinar a estrutura cristalográfica do complexo *TbSerRS*-serina, provavelmente, devido ao glicerol ter ocupado a mesma região do sítio ativo da L-serina. Uma alternativa para obtermos este complexo seria tentarmos deslocar o glicerol da região do sítio ativo através da diminuição de sua porcentagem no tampão utilizado e do aumento da quantidade de L-serina no processo de cristalização.

4.7.3.3 Seril-tRNA sintetase em complexo com dAMP

A estrutura da *TbSerRS* em complexo com dAMP apresentou valores de R_{work} e R_{free} de 0.1729 e 0.1910, respectivamente. O gráfico de Ramachandran revela que 99 % dos

resíduos apresentam-se em regiões favoráveis e, apenas 1 % está em regiões permitidas. Nesta estrutura não conseguimos modelar apenas a região que está localizada entre os resíduos 256 – 257. Uma molécula do análogo não hidrolisável de AMP (dAMP) por monômero foi encontrada na região do sítio ativo, região esta ocupada pelo glicerol na estrutura da *TbSerRS* nativa. O dAMP é estabilizado por meio de ligações de hidrogênio pelos resíduos Arg295, Glu297, Glu384, Val311 e Lys316.

Através da sobreposição estrutural deste complexo com a estrutura da *TbSerRS* nativa notamos que duas principais mudanças ocorreram: os *gaps* presentes na *TbSerRS* nativa tornaram-se bem estruturados e o N-terminal mudou sua orientação. Portanto, a ligação do dAMP a *TbSerRS* mostra que o ele é capaz de deslocar as duas moléculas de glicerol do sítio ativo e sua ligação favorece a estabilização de regiões flexíveis.

Figura 29 – Representação do sítio de ligação da estrutura da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* a 1.75 Å de resolução em complexo com o análogo não hidrolisável de AMP. O mapa (*omit map*) $2F_o - F_c$ (nível de contorno 1σ) com o modelo sobreposto evidencia a região central de densidade eletrônica de ligação ao análogo não hidrolisável de AMP. Os *sticks* vermelhos e azuis representam os resíduos que fazem interações de hidrogênio com o dAMP. Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.3.4 Seril-tRNA sintetase em complexo com uma isoforma do tRNA^{Ser}

Os valores de R_{work} e R_{free} para o complexo SerRS-tRNA^{Ser} (03b) são de e 0.2327, 0.2625 respectivamente. O gráfico de Ramachandran mostra que 95.83 % dos resíduos apresentam-se em regiões favoráveis e, apenas 1.43 % estão em regiões não permitidas. Através da análise da estrutura cristalográfica deste complexo a resolução de 2.35 Å, nota-se a presença de densidade localizada próxima ao sítio ativo (Figura 30). Devido ao tRNA^{Ser} ser uma molécula de aproximadamente 30 KDa seria um pouco improvável que, através da metodologia de *soaking*, ele conseguisse se ligar totalmente as moléculas de proteína por meio dos canais de solvente na rede cristalina. Essa densidade poderia indicar a presença de ligação de uma porção do RNA transportador, mas, uma vez que poucos ciclos de refinamento foram realizados ainda não podemos confirmamos a presença ou não da ligação de uma região do tRNA nesta estrutura. .

Figura 30 - Densidade eletrônica $2F_o-F_c$ (nível de contorno 1σ) com o modelo sobreposto evidenciando a região central de densidade eletrônica, a qual poderia indicar a região de ligação de uma porção do tRNA^{Ser}. Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.3.5 Comparação estrutural entre a seril-tRNA sintetase nativa, em complexo com dAMP e o modelo 3LSQ

No mesmo ano em que nós conseguimos cristalizar a *TbSerRS* MERRIT e colaboradores depositaram a estrutura nativa da SerRS (código do PDB: 3LSQ). Diante disso, nós continuamos nossos experimentos na tentativa de conseguirmos a estrutura da *TbSerRS* em complexo com seus substratos.

A sobreposição estrutural do nosso modelo cristalográfico para a enzima nativa com o 3LSQ (RMSD = 0.78) mostrou que existe uma região de aproximadamente 28 resíduos, localizada entre os resíduos 72 – 100 no monômero A, que se encontra ausente na estrutura depositada no PDB. Estes resíduos fazem parte do N-terminal que é umas das regiões de ligação ao tRNA. Através da análise de contatos cristalinos notamos que em nossa estrutura, tanto o monômero A quanto o B, faz contatos cristalinos com outra molécula da cela unitária. Enquanto que, para o modelo 3LSQ, apenas o monômero B faz contatos cristalinos com outra molécula. Então, possivelmente a região entre os resíduos 72 – 100, presente em nosso modelo, é ausente no monômero A do modelo 3LSQ devido a flexibilidade dessa região não ser estabilizada por contatos cristalinos. Através da sobreposição estrutural, além do N-terminal do modelo 3LSQ seguir uma orientação oposta ao da nossa estrutura nativa e ao do complexo com dAMP, notamos também que a região não modelada em nossas estruturas, localizada entre os resíduos 244 - 245 (monômero A) e 243 – 244 (monômero B), encontra-se bem estruturada (α -hélices). Em contrapartida, somente na estrutura em complexo com o dAMP a região entre os resíduos 298 - 304 (monômero A) e 298 – 305 (monômero B) foi modelada. Esta região fica próxima a região do sítio ativo e, provavelmente, a ligação do dAMP a estabilizou.

Figura 31 - Estrutura da seril-tRNA sintetase de *Trypanosoma brucei* nativa (amarelo) sobreposta com a estrutura do complexo *TbSerRS*-dAMP (rosa) e com a estrutura depositada no PDB sob o código 3LSQ (púrpura). Os *gaps* localizados entre os resíduos 243 – 244 e 298 – 305 e o loop (400- 418) também estão indicados na figura. A sobreposição dos $C\alpha$ entre a *TbSerRS* nativa e o complexo *TbSerRS*-dAMP apresentou um RMSD de 0.3 e a sobreposição da *TbSerRS* nativa com o modelo 3LSQ apresentou um RMSD de 0.78. Fonte: Elaborada pela autora.

Nós propomos que existam quatro regiões flexíveis em nosso modelo para a estrutura nativa: região do N-terminal, região dos *gaps* entre os resíduos 244 – 245 (monômero A) ou 243 - 244 (monômero B), e 298 – 304 (monômero A) ou 298 – 305 (monômero B) e o *loop* localizado entre os resíduos 400 – 418. Esta flexibilidade pode ser confirmada pelo alto valor de B_{factor} apresentado por elas (Figura 32). De um modo geral quando a *TbSerRS* é ligada ao dAMP algumas dessas regiões tornam-se estruturadas e, conseqüentemente, são estabilizadas diminuindo o valor do B_{factor} de cada região.

Figura 32 – Estruturas cristalográficas evidenciando as regiões com maiores valores de B_{factor} (regiões coloridas em vermelho, amarelo e alaranjado). A) Estrutura da *TbSerRS* nativa. B) Estrutura da *TbSerRS* em complexo com dAMP. Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Medidas de cinética enzimática da *TbSerRS* selvagem

A seril-tRNA sintetase, como um membro da classe II das aaRSs é responsável por aminoacilar o tRNA^{Ser} e o tRNA^{Sec} com serina. O primeiro passo da reação de aminoacilação catalisada pela SerRS é a ativação da serina por Mg^{+2} e ATP levando a formação de um intermediário estável (Ser-AMP) com liberação de pirofosfato inorgânico (PP_i). Através do kit *EnzChek® Pyrophosphate Assay Kit* (Molecular PROBES) constatamos o consumo de PP_i liberado na reação enzimática pela *TbSerRS* através do monitoramento do aumento de absorbância em função do tempo.

Através do gráfico, Absorbância *versus* Tempo (Figura 33), nota-se o aumento da absorbância em função do tempo indicando conversão de PP_i em moléculas de P_i e, consequente conversão de MESG em ribose 1-fosfato e 2-amino-6-mercapto-7-metil purina. Indicando que, provavelmente, PP_i foi liberado pelo primeiro passo da reação de aminoacilação catalisada pela SerRS. Portanto, por meio deste experimento podemos verificar que a *TbSerRS* encontra-se ativa.

Diante do estabelecimento das condições em que a enzima encontra-se ativa iniciaremos medidas a fim de determinarmos os parâmetros cinéticos: $V_{\max}$ e K_{cat} (atividade específica) e K_m do substrato e do co-fator. Determinando assim, a afinidade de ligação entre a enzima e substrato e a eficiência catalítica da mesma.

Figura 33 - Medida da detecção de conversão do MESG através do consumo de PP_i obtido no primeiro passo da reação de aminoacilação catalisada pela *TbSerRS*. Fonte: Elaborada pela autora.

Capítulo 5- Conclusões e Perspectivas

5.1 Conclusões e perspectivas do trabalho

Através da utilização das técnicas de cromatografia por exclusão molecular, espalhamento de luz dinâmico, espalhamento de raios X a baixo ângulo e ultracentrifugação analítica verificamos que a seril-tRNA sintetase de *Trypanosma brucei* apresenta-se como dímero em solução sob determinadas condições. Estes dados corroboram com dados disponíveis na literatura para as enzimas da classe II das aminoacil-tRNA sintetases²⁶. Além disso, dados de cristalografia por difração de raios X mostraram que os monômeros que compõem esse dímero são muito semelhantes, diferindo apenas em regiões de alta flexibilidade como a região do N-terminal, de *gaps* e de *loop*. E, por meio de medidas de cinética enzimática verificamos que a enzima encontra-se ativa realizando eficientemente o primeiro passo da reação de aminoacilação.

Análises da interação proteína-tRNA por meio da metodologia de ultracentrifugação analítica puderam comprovar a formação do complexo, mas não a determinação com precisão de sua estequiometria. Isso devido ao bom ajuste dos dados a dois modelos de heteroassociação.

A análise estrutural descrita a partir de alguns ciclos de refinamento das estruturas cristalográficas da *TbSerRS* nativa e em complexo com um análogo não hidrolisável de AMP, mostrou que a enzima é capaz de ligar duas moléculas de glicerol e apenas uma molécula de dAMP em cada monômero na região do sítio ativo, respectivamente. Com relação a estrutura do complexo *TbSerRS*-tRNA^{Ser} notamos a existência de uma região no mapa de densidade eletrônica que aponta para uma possível ligação de uma parte do tRNA a enzima.

Muitos experimentos foram iniciados e ainda não foram finalizados em tempo hábil para serem descritos neste trabalho. Doze estruturas cristalográficas foram processadas e serão levadas ao processo final de refinamento a fim de verificarmos a existência da ligação

aos substratos utilizados (Tabela 9). Além disso, análises estruturais mais detalhada deverão ser realizadas para as estruturas da *TbSerRS* nativa, em complexo com dAMP e em ligação com uma possível região do tRNA^{Ser}, após o término do processo de refinamento. Através dessas estruturas, poderemos descrever quais mudanças conformacionais e quais os tipos de interações a *TbSerRS* sofre durante o processo de aminoacilação. Após essas análises, se confirmada a presença dos substratos, mutantes poderão ser construídos a fim de determinarmos a importância dos resíduos envolvidos na ligação do complexo. Essa importância poderá ser avaliada pelos estudos de cinética enzimática os quais poderão determinar a afinidade de ligação entre a enzima e substrato e a eficiência catalítica da enzima. Se confirmada a ausência de formação do complexo SerRS-tRNA, tanto para o tRNA inteiro quanto para as regiões menores, a técnica de espectrometria de massas de troca hidrogênio-deutério poderá ser utilizada para determinarmos quais resíduos estão envolvidos nesta ligação.

Referências

- 1 LASKOWSKI, R.A. et al. PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 488–490, 1997.
- 2 WESSJOHANN, L.A. et al. Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. **Biological Chemistry**, v. 388, n.10, p. 997–1006, 2007.
- 3 WHANGER, P.D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 21, n.3, p. 223–232, 2002.
- 4 FERGUSON, L.R. et al. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. **Mutation Research: fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 733, n. 1-2, p.100–110,2012.
- 5 MOGHADASZADEH, B.; BEGGS, A.H. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. **Physiology**, v. 21, p. 307–315, 2006. PMID: 16990451
- 6 GROMER, S. et al. Human selenoproteins at a glance. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 62, n.21, p. 2414–2437, 2005.
- 7 GLADYSHEV, V.N.; HATFIELD, D.L. Analysis of selenocysteine-containing proteins. In: COLIGAN, J. E. et al.(Ed.) **Current Protocols in Protein Science**. New York: John Wiley,2001. cap. 3, unit 3.8.
- 8 PAPP, L.V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n.7, p. 775–806, 2007.
- 9 JOHANSSON, L. et al. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n.1, p. 1–13, 2005.
- 10 DUFFIELD, A.J.; et al. An estimation of selenium requirements for New Zealanders. **American Journal of Clinical Nutrition**,v.70, n.5, p.896–903,1999.
- 11 BÖSL, M.R. et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n.9, p. 5531–5534, 1997.
- 12 LEVY, J.B. et al. Selenium deficiency, reversible cardiomyopathy and short-term intravenous feeding. **Postgraduate Medical Journal**, v.70, n.821, 235–236, 1994.
- 13 BÖCK, 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.

-
- 14 LEINFELDER, W. et al. Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine. **Nature**, v. 331, n.6158, p. 723–725, 1988.
- 15 GLASS, R.S. et al. Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. **Biochemistry**, v. 32, n.47, p. 12555–12559, 1993.
- 16 BURK, R.F. Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. **FASEB Journal**, v. 5, n.9, p. 2274–2279, 1991.
- 17 ALLMANG, C. et al. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n.9, p. 1415–1423, 2009.
- 18 FISCHER, N. et al. Towards understanding selenocysteine incorporation into bacterial proteins. **Biological Chemistry**, v. 388, n.9, p. 1061–1067, 2007.
- 19 XU, X.-M. et al. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 404, n.1, p. 115–120, 2007.
- 20 TUJEBAJEVA, R.M. et al. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. **EMBO Reports**, v. 1, n.2, p. 158–163, 2000.
- 21 FAGEGALTIER, D. et al. Characterization of mSelB, a novel mammalian elongation factor for selenoprotein translation. **EMBO Journal**, v. 19, n.17, p. 4796–4805, 2000.
- 22 CHAVATTE, L. et al. Ribosomal protein L30 is a component of the UGA-selenocysteine recoding machinery in eukaryotes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n.5, p. 408–416, 2005.
- 23 XU, X.-M. et al. Evidence for direct roles of two additional factors, SECp43 and soluble liver antigen, in the selenoprotein synthesis machinery. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n.50, p. 41568–41575, 2005.
- 24 XU, X.-M. et al. Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. **PLoS Biology**, v. 5, n.1, p. e4, 2007.
- 25 YUAN, J. et al. RNA-dependent conversion of phosphoserine forms selenocysteine in eukaryotes and archaea. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.50, p. 18923–18927, 2006.
- 26 BEUNING, P.J.; MUSIER-FORSYTH, K. Transfer RNA recognition by aminoacyl-tRNA synthetases. **Biopolymers**, v. 52, n.2, p. 1–28, 1999.
- 27 STURCHLER, C. et al. Unique secondary and tertiary structural features of the eucaryotic selenocysteine tRNA(Sec). **Nucleic Acids Research**, v. 21, n.5, p. 1073–1079, 1993.
- 28 COMMANS, S.; BÖCK, A. Selenocysteine inserting tRNAs: An overview. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, n.3, 335–351, 1999.

- 29 YAREMCHUK, A.D. et al. A new crystal form of the complex between seryl-tRNA synthetase and tRNA(Ser) from *Thermus thermophilus* that diffracts to 2.8 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 310, n.2, p. 157–161, 1992.
- 30 GESLAIN, R. et al. Trypanosoma seryl-tRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNA^{Sec}. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n.50, p. 38217–38225, 2006.
- 31 REGAN, L. et al. Polypeptide sequences essential for RNA recognition by an enzyme. **Science**, v. 235, n.4796, p. 1651–1653, 1987.
- 32 YOKOYAMA, S. et al. Modified nucleosides and codon recognition. **tRNA: structure, biosynthesis, and function**, Washington: ASPM Press, 1995. p. 207–223.
- 33 ITHO, Y. et al. Crystallographic and mutational studies of seryl-tRNA synthetase from the archaeon *Pyrococcus horikoshii*. **RNA Biology**, v.5, n.3, p. 169-177, 2008.
- 34 BURBAUM, J. J. et al. Understanding structural relationship in proteins of unsolved three-dimensional structure. **Proteins**, v.7, n.2, p. 99-11, 1990.
- 35 HOUNTONDI, C. et al. Sequence similarities among the family of aminoacyl-tRNA synthetases. **Biochimie**, v. 68, n.9, p. 1071-1078, 1986.
- 36 BOREL, F. et al. Seryl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: implication of its N-terminal domain in aminoacylation activity and specificity. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n.15, 2963-2969, 1994.
- 37 ERIANI, G. et al. Role of dimerization in yeast aspartyl-tRNA synthetase and importance of the class II invariant proline. **PNAS**, v. 22, n.22, p. 10816-10820, 1993.
- 38 ERIANI, G. et al. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. **Nature**, v. 347, n.6289, p. 203–206, 1990.
- 39 BEBENEK, A. DNA replication fidelity. **Postepy Biochemii**, v. 54, n. 1, p. 43–56, 2008.
- 40 KAWAKAMI, K. et al. Differential regulation of two genes encoding lysyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*: lysU-constitutive mutations compensate for a lysS null mutation. **Molecular Microbiology**, v. 6, n.13, p. 1739–1745, 1992.
- 41 ROCHA, R. et al. Unveiling the structural basis for translational ambiguity tolerance in a human fungal pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n.34, p. 14091–14096, 2011.
- 42 CAETANO-ANOLLÉS, G. et al. Structural Phylogenomics Retrodicts the Origin of the Genetic Code and Unveils the Evolutionary Impact of Protein Flexibility. **PLoS ONE**, v. 8, n.8, p. 1-21, 2013.
- 43 HOFREITER, M. et al. Ancient DNA. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n.5, p. 353–359, 2001.

- 44 HOU, Y.M.; SCHIMMEL, P. Evidence that a major determinant for the identity of a transfer RNA is conserved in evolution. **Biochemistry**, v. 28, n.17, p. 6800–6804, 1989.
- 45 SÖLL, D.; RAJBHANDARY, U. L. **tRNA:structure biosynthesis, and function**. Washington: ASPM Press,1995.572p.
- 46 REGAN, L. et al. Polypeptide sequences essential for RNA recognition by an enzyme. **Science**, v.235, n.4796, p. 1651-1653, 1987.
- 47 RIBAS DE POUPLANA, L.; SCHIMMEL, P. Two classes of tRNA synthetases suggested by sterically compatible dockings on tRNA acceptor stem. **Cell**, v.104, n.2, p.191-193, 2001.
- 48 APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I. Mitochondrial RNA processing in trypanosomes. **Research in microbiology**, v. 162, n.2, , p. 655–663, 2011.
- 49 VICKERMAN, K. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. **British medical bulletin**, v. 41, n.2, p. 105–114, 1985.
- 50 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:
<<http://apps.who.int/bookorders/anglais/home1.jsp>>. Acesso em: 1 de janeiro de 2014.
- 51 MATTHEWS, K.R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of cell science**, v. 118, n.2, p. 283–290, 2005.
- 52 DPDx Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/dpdx/>>. Acesso em: 1 de janeiro de 2014.
- 53 Costa, F. C. Validação da via de Biossíntese de Selenocisteína e Selenoproteína em *Trypanosoma* por RNA de Interferência. 2012. p. 117 Tese - Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética evolutiva e Biologia Molecular, São Carlos, 2012.
- 54 CASSAGO, A. et al. Identification of *Leishmania* selenoproteins and SECIS element. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 149, n.2, p. 128–134, 2006.
- 55 COSTA, F.C. et al. Oxidative stress protection of *Trypanosomes* requires selenophosphate synthase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n.1, p. 47–50, 2011.
- 56 LOBANOV, A. et al. Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n.14, p. 4012–4024, 2006.
- 57 GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J.(Ed.).**Proteomics protocols handbook**. New York: Springer Verlag, 2005.v.112, p. 571–607.
- 58 KONAREV, P. V. et al. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis. **Journal of Applied Crystallography**, v. 39, p. 277–286, 2006. doi:10.1107/S0021889806004699.

- 59 SVERGUN, D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, p.495–503, 1992 doi:10.1107/S0021889892001663.
- 60 FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 101–109, 2010. doi: 10.1107/S0021889809043076.
- 61 SVERGUN, D.I. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. **Biophysical Journal**, v. 76, n.6, p. 2879–2886, 1999.
- 62 SVERGUN, D. et al. A Program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. **Journal of Applied Crystallography**, v. 28, p.768–773, 1995. doi: 10.1107/S0021889895007047.
- 63 KOZIN, M.B.; SVERGUN, D.I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **Journal of Applied Crystallography**, v. 34, p.33–41, 2001. doi: 10.1107/S0021889800014126.
- 64 KABSCH, W. Xds. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 66, p. 125–132, 2010. doi: 10.1107/S0907444909047337
- 65 MCCOY, A.J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n.4, p. 658–674, 2007.
- 66 BRICOGNE, G. et al. **BUSTER**: version 1.10.0. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd., 2011.
- 67 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 60, n.12, p. 2126–2132, 2004.
- 68 DAVIS, I.W et al. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W615–W619, 2004. doi: 10.1093/nar/gkh398.
- 69 DELANO, W.L. **The PyMOL molecular graphics system**: version 1.2002. Disponível em:< <http://www.pymol.org>>. Acesso em: 25 nov. 2013.
- 70 LEBOWITZ, J. et al. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: a tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n.9, p. 2067–2079, 2002.
- 71 SCHUCK, P. et al. SEDFIT-MSTAR: molecular weight and molecular weight distribution analysis of polymers by sedimentation equilibrium in the ultracentrifuge. **The Analyst**, v. 139, n. 1, p. 79–92, 2014.
- 72 VISTICA, J. et al. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. **Analytical Biochemistry**, v. 326, n. ,p. 234–256, 2004. doi: 10.1016/j.ab.2003.12.014

-
- 73 GUINIER, A.; FOURNET, G. Small angle scattering of X-rays. **Journal of Polymer Science**, v. 19, n.3, p. 268, 1955.
- 74 KAWAKAMI, K.; ITO, K.; et al. Differential regulation of two genes encoding lysyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*: lysU-constitutive mutations compensate for a lysS null mutation. **Molecular microbiology**, v. 6, p. 1739–1745, 1992.
- 75 STUART, K. et al. RNA editing in kinetoplastid protozoa. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 61, n.1, p. 105–120, 1997.
- 76 WEYGAND-DURASEVIC, I. et al. The C-terminal extension of yeast seryl-tRNA synthetase affects stability of the enzyme and its substrate affinity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.5, p. 2455-2461, 1996.