



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**



Natália Oliveira Alves

**Estudos Estruturais e Ensaio Biológicos de Proteínas**

**Codificadas por Genes de *Micro-Exon* (MEG) de**

***Schistosoma mansoni***

São Carlos-SP

2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

Natália Oliveira Alves

**Estudos Estruturais e Ensaio Biológicos de Proteínas**

**Codificadas por Genes de *Micro-Exon* (MEG) de**

***Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

**Área de concentração:** Bioquímica e Biologia Molecular

**Orientador:** Dr. Ricardo DeMarco

São Carlos-SP

2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A474ee Alves, Natália Oliveira.  
Estudos estruturais e ensaios biológicos de proteínas codificadas por genes de *micro-exon* (MEG) de *Schistosoma mansoni* / Natália Oliveira Alves. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
57 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Biologia molecular. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Proteínas. 4. *Micro-exon*. I. Título.

CDD: 574.88 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

DECLARAÇÃO DE RESIDÊNCIA

São Carlos, 14 de novembro de 2014

Dissertação de Mestrado de

**NATÁLIA OLIVEIRA ALVES**

A FACTA FINANCIEIRA S/A - CREDITO, FINANCIAMENTO E INVESTIMENTO - inscrita no CNPJ nº 11.581.874/0001-20

Banca Examinadora

Declaro, de acordo com a Lei nº 7.111/73, que o(a) Sr(a) Prof. Dr. Ricardo De Marco é residente e domiciliado(a) em

(Logradouro) Rua Engenheiro Humberto  
nº 209, Condomínio  
CEP 13506-900, São Carlos, SP

*Ricardo De Marco*

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Aníbal

(Logradouro) Rua Engenheiro Humberto  
nº 209, Condomínio  
CEP 13506-900, São Carlos, SP

*Fernanda de Freitas Aníbal*

Prof. Dr. Rafael Victório Carvalho Guido

*Rafael VC Guido*

SÃO CARLOS – SP  
2014

Dedico este trabalho à toda minha família e ao meu noivo por acreditarem em mim e  
por ser a minha inspiração.

## **Agradecimentos**

À Deus e Nossa Senhora por sempre me trilhar.

Ao Prof. Dr. Ricardo DeMarco pela oportunidade e confiança depositada, pela orientação, dedicação, paciência, atenção e pelos seus ensinamentos durante toda a pós-graduação e a produção deste trabalho.

Aos meus pais, Débora, Elias, Joari e Daniela por proporcionar todas as oportunidades de aprendizado, o apoio, dedicação e amor. Por sempre acreditarem na minha capacidade e me incentivando ir além.

Aos meus avôs, José Jomer e Sebastiana por todo o carinho e preocupação.

Aos meus tios, Raquel, Harnoldo, Suse, Luis Antônio e José Jomer Junior por sempre estarem me apoiando em cada passo.

Aos meus irmãos, Arthur, Giulia Luisa, Diogo e Thiago por toda amizade, companheirismo e amor.

Ao meu amado noivo Victor por todo companheirismo, dedicação, pelos conselhos, pela amizade e carinho, por caminhar comigo todos os dias me ensinando e crescendo comigo, mas principalmente por fazer com que a vida seja mais bela.

As amigas Aline, Cristiane, Débora, Emeline, Heloísa, Lívia, Raissa, Sinara, Sumária e Thaisa por me acolher aqui em São Carlos, pelos conselhos, pelas as orientações pessoais e profissionais, por todo o ensinamento, por tornarem o ambiente de trabalho agradável e os cafés mais saborosos.

Aos pós-doutorandos José Luiz, Joci e Edson Crusca pelo auxílio, assistência e ensinamento no desenvolvimento da pesquisa.

As técnicas Bel, Andressa e Julia por todos os ensinamentos, pela dedicação, confiança e amizade.

Ao Grupo de Biofísica Sergio Mascarenhas da Universidade de São Carlos por permitir o desenvolvimento da minha pesquisa, me proporcionando todo auxílio necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo suporte financeiro, o qual proporcionou o desenvolvimento do trabalho e garantiu a minha sobrevivência e permanência em São Carlos.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade e oferecimento do curso de mestrado.

## Resumo

O *Schistosoma mansoni* é o agente causador da esquistossomose mansônica, atingindo 249 milhões de pessoas em 78 países. Acredita-se que tal infecção é bem-sucedida devido a modulação do sistema imune do hospedeiro por meio de proteínas secretadas pelo parasita. Recentemente uma classe de proteínas derivadas de genes de *micro-exon* (MEGs) foi observada em análises proteômicas de secreções de esquistossômulo e ovo, e também associadas com glândulas de vários estágios de vida do parasita. Além disso, verificou-se que nenhuma destas proteínas apresentavam similaridade com proteínas de organismos de outros gêneros. Neste contexto, objetivo deste trabalho foi o estudo estrutural, a busca por parceiros protéicos e ensaios biológicos buscando possíveis funções para as proteínas codificadas por genes de *micro-exons* de *S. mansoni*: MEG-5, MEG-8.2 e MEG-12. Para os estudos de caracterização estrutural utilizamos a proteína MEG-5 expressa pelo sistema heterólogo (não obtivemos a expressão suficiente da proteína MEG-8.2) e inicialmente realizamos os ensaios de Dicroísmo Circular (CD). Este ensaio nos revelou a predominância de uma estrutura desordenada, devido a presença de um pico negativo nos intervalos de 180-200nm e a presença de picos de menor intensidade na faixa entre 220-240nm, indicando que parte da proteína pode apresentar estruturação. Tal estruturação foi observada nas predições de estrutura secundária realizadas nos programas SOPMA e Jpred3, em que, previram a presença de uma alfa-hélice na região C-terminal. Para a confirmação deste fato, realizamos uma análise do máximo de emissão de fluorescência no triptofano pela técnica de fluorescência intrínseca, pois a proteína possui um único triptofano presente na região da provável alfa-hélice. Constatamos que o máximo de emissão de fluorescência está em 330nm, indicando que este se encontra em ambiente mais hidrofóbico. Após a caracterização estrutural da MEG-5 buscamos parceiros protéicos por meio do ensaio de duplo híbrido realizando uma varredura em bibliotecas de cDNA de leucócitos, obtendo dois possíveis parceiros. A proteína CHMP1B foi a que mais nos chamou atenção, por fazer parte da formação do corpo vesicular e estar relacionada aos processos de apresentação de antígenos. O peptídeo codificado por MEG-12 apresenta uma característica peculiar de uma hélice anfipática, predita pelo programa Jpred3, e um caráter hemolítico. Sua ação em eritrócitos foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), que verificou mudanças morfológicas das células, sugerindo a perturbação na membrana até o rompimento. O peptídeo é secretado na região do esôfago podendo estar relacionado com a digestão de eritrócitos realizada pelo parasita. Por tanto, estas duas proteínas demonstram ser importantes na relação parasito-hospedeiro e possíveis alvos para criação de medicamentos ou vacinas mais eficientes.

**Palavras chaves:** *Schistosoma mansoni*. Proteínas. *Micro-exon*.

## Abstract

*Schistosoma mansoni* is the causative agent of Schistosomiasis, reaching 249 million people in 78 countries. It is believed that this infection is successful due to modulation of the host immune system through proteins secreted by the parasite. Recently a class of proteins derived from micro-exon genes (MEGs) was observed in proteomic analyses of schistosomula and egg secretions of *S. mansoni*, and also associated with glands of several stages of the parasite life. Furthermore, they found that none of these proteins showed similarity to proteins of organisms from other genres. In this context, aim of this work was the structural study, the search for protein partners and biological assays seeking possible roles for the proteins encoded by genes of micro-exons of *S. mansoni*: MEG-5, MEG-8.2 e MEG-12. For structural characterization studies we used MEG-5 protein expressed by heterologous system (the expression of MEG-8.2 protein was not obtained) and initially performed tests Circular Dichroism (CD). This essay revealed the predominance of one disordered structure due to the presence of a negative peak in the ranges of 180-200nm and the presence of lower intensity peaks in the range 220-240nm, indicating that part of the protein may present structure. Such structure was observed in the secondary structure predictions performed in SOPMA and Jpred3 programs, wherein the presence of a predicted alpha-helix in the C-terminal region. To confirm this fact, we performed an analysis of the maximum emission of tryptophan fluorescence by the technique of intrinsic fluorescence, because the protein has a single tryptophan present in the probable alpha-helical region. We note that the maximum fluorescence emission is at 330nm, indicating that it is in more hydrophobic environment. After the structural characterization of MEG-5 protein we seek partners through the assay two-hybrid system performing a scan on leukocyte cDNA libraries, yielding two possible partners. The CHMP1B protein was the one that drew the most attention in for being part of the formation of vesicular body and be related to the processes of antigen presentation. The synthetic peptide MEG-12 has a peculiar characteristic of an amphipathic helix predicted by Jpred3 program, and hemolytic character. This action was best observed by scanning electron microscopy (SEM), to be verifies in a clear disruption of the membrane to the breakup. The peptide is secreted into the esophagus may region associated with the digestion of erythrocytes made by the parasite. Therefore, these two proteins are shown to be important in the host-parasite relationship and possible targets for drugs or creation of more efficient vaccines.

**Key words:** *Schistosoma mansoni*. Protein. *Micro-exon*

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Esquema do ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> . .....	4
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da estrutura dos genes 14 membros da família de MEG. ....	6
<b>Figura 3</b> – Esquema representativo do sistema da SUMO fusão. ....	13
<b>Figura 4</b> - Eletroforese em gel de agarose 0.8%. ....	30
<b>Figura 5</b> - Análise da purificação da proteína MEG-5. ....	32
<b>Figura 6</b> - Análise da indução da proteína MEG-8.2 . ....	33
<b>Figura 7</b> - Espectro de dicroísmo circular da proteína MEG-5 após purificação em coluna de exclusão molecular (AKTA). ....	34
<b>Figura 8</b> - Resumo do resultado da predição de estrutura secundária da proteína MEG-5 (sequência sinal excluída) utilizando o programa Jpred3. ....	35
<b>Figura 9</b> - Análise da polaridade da alfa-helice predita para a proteína MEG-5 utilizando o programa HeliQuest. ....	35
<b>Figura 10</b> – Espectro de emissão de fluorescência intrínseca da proteína MEG-5..	36
<b>Figura 11</b> - Análise da conformação estrutural por dicroísmo circular da proteína MEG-5. ....	38
<b>Figura 12</b> - Eletroforese em gel de agarose 0.8% - ensaio de duplo híbrido. ....	39
<b>Figura 13</b> - Ensaio da $\beta$ -galactosidase. Teste de autoativação para a construção MEG-5pBTM116. ....	40

<b>Figura 14</b> - Ensaio de $\beta$ -galactosidase para as colônias transformadas com MEG-5pBMT116 e biblioteca de cDNA de leucitos humanos. ....	<b>42</b>
<b>Figura 15</b> - Análise da polaridade da alfa-hélice predita (correspondente a região central da alfa hélice correspondente as bases 14 a 31) para a proteína MEG-12 utilizando o programa HeliQuest. ....	<b>45</b>
<b>Figura 16</b> - Gráfico representativo da diluição seriada do peptídeo MEG-12. Relação porcentagem de eritrócito lisado e a concentração do peptídeo .....	<b>46</b>
<b>Figura 17</b> - Gráfico representativo da porcentagem de eritrócito lisado em relação ao tempo de incubação. ....	<b>47</b>
<b>Figura 18</b> - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). ....	<b>49</b>

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Sequência de nucleotídeos (*primers*) desenhados para a amplificação dos genes por PCR, expressão heteróloga. .... 12

**Tabela 2** - Tampões para análise de CD variando o pH. .... 18

**Tabela 3** - Sequência de nucleotídeos (*primers*) desenhados para a amplificação dos genes por PCR para o ensaio de duplo híbrido. .... 19

**Tabela 4** - Meios de cultura seletivos para leveduras, utilizados no ensaio de duplo híbrido. .... 25

**Tabela 5** – Candidatas a possíveis parceiros protéicos da MEG-5. .... 42

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>10</b>
<b>3. Material e Métodos</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Expressão Heteróloga</b>	<b>12</b>
3.1.1 Amplificação por PCR	12
3.1.2 Expressão e Purificação	14
3.1.3 Caracterização Estrutural	16
<b>3.2 Duplo Híbrido</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Síntese do Peptídeo MEG-12</b>	<b>25</b>
3.3.1 Ensaio Hemolítico	25
3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	27
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Expressão Heteróloga</b>	<b>29</b>
4.1.1 Amplificação, Clonagem e Subclonagem	29
4.1.2 Expressão e Purificação da Proteína MEG-5	29
4.1.3 Caracterização Estrutural da Proteína MEG-5	32
<b>4.2 Duplo Híbrido</b>	<b>37</b>
<b>4.3 MEG-12 – Estudos Biológicos</b>	<b>44</b>
<b>5. Conclusões</b>	<b>51</b>
<b>6. Referências</b>	<b>55</b>

# Introdução

---

## 1. Introdução

A esquistossomose, também denominada de esquitossomíase, bilharioze ou barriga d'água, é causada por um helminto trematódeo do gênero *Schistosoma* que têm como principais agentes etiológicos, para o homem, as espécies *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. mansoni* (REY et al., 2002).

Comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, é um sério problema de saúde pública e acarreta prejuízos socioeconômicos. Acredita-se que, cerca de 249 milhões de pessoas em 78 países são acometidas pela doença, apesar de extenuante os esforços de controle (OMS, 2014).

Presume-se que as espécies do gênero *Schistosoma* chegaram às Américas como consequência do tráfico de escravos e com os imigrantes orientais e asiáticos, nos quais foram detectados numerosos indivíduos parasitados pelo *S. haematobium* e *S. japonicum*. Entretanto, apenas o *S. mansoni* se fixou aqui no Brasil, como consequência da presença de hospedeiros intermediários, como as espécies de molusco do gênero *Biomphalaria*, e pelas condições ambientais semelhantes às da região de origem (NEVES et al., 2005).

O gênero *Schistosoma* apresenta-se como vermes dióicos, com acentuado dimorfismo sexual. As fêmeas adultas possuem uma morfologia cilíndrica, mais delgada e alongada, uma cor acinzentada por possuírem em seu tubo digestório um pigmento derivado da digestão do sangue (hemozoína) e duas pequenas ventosas. Os machos adultos possuem um seguimento anterior volumoso, exibindo duas ventosas, uma oral e outra pedunculada, sua cor é branca e apresentam o canal ginecóforo, onde as fêmeas se alojam (REY et al., 2002).

O *S. mansoni* adulto alimenta-se de sangue do hospedeiro definitivo e possui um aparelho digestório simples e incompleto, sendo a boca o único orifício, e em função da

falta de um ânus a excreção ocorre por meio de regurgito. A digestão ocorre principalmente no esôfago (REY et al., 2002; LI et al., 2013).

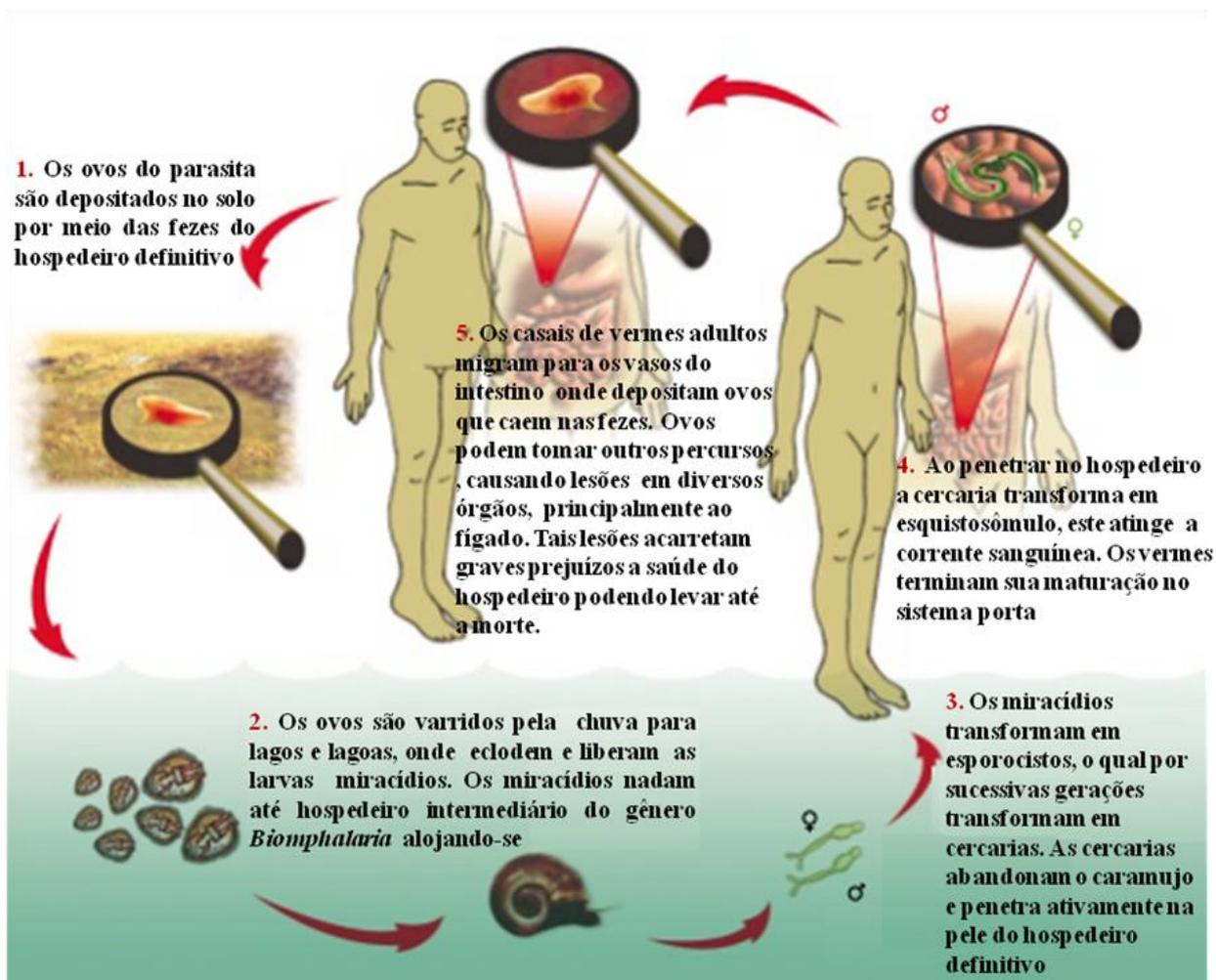
O esôfago possui duas porções: anterior e posterior, o revestimento tegumentar apresenta uma arquitetura de superfície mais altamente especializada comparada o tegumento normal. Na porção anterior o citoplasma contém corpos discóides característicos do tegumento e vesículas multilaminadas, já na porção posterior as vesículas são substituídas por uma inclusão secretora distinta. Os corpos celulares, onde as várias inclusões originam, são numerosos nas duas porções do esôfago, mas em especial no esôfago posterior, onde se apresentam de forma compacta devido ao acúmulo em espaço restrito. As inclusões no esôfago posterior contêm um núcleo cristalino dispostas em camadas paralelas, e em algumas vezes circulares, são denominadas de “vesículas cristalóides” (WILSON; BARNES, 1974; BOGITSH; CARTER, 1977; LI et al., 2013).

Além da estrutura do esôfago ser fundamental para a digestão, em um estudo realizado por Hall *et al.* (2011) analisando o regurgito do *Schistosoma*, demonstrou a presença de algumas proteínas hidrolíticas e transportadoras, sugerindo que estas são necessárias para a degradação de eritrócitos e constituintes no plasma do hospedeiro, e também podem facilitar a absorção de lipídeos e de íons inorgânicos. Presumindo que a digestão é predominantemente extracelular, com as fases finais possivelmente intracelulares; acumulado subprodutos são periodicamente eliminado a partir do intestino cego final por regurgitação.

No ciclo natural do *S. mansoni* (figura 1) o homem é o hospedeiro definitivo, apresentando a fase adulta e a reprodução sexuada, habitando preferencialmente nas vênulas do plexo hemorroidário superior e nos ramos mais finos das veias mesentéricas inferior, onde põe seus ovos, atravessando a mucosa intestinal, sendo eliminados junto

às fezes. No meio externo os ovos são lançados ou arrastados para água, ocorrendo à eclosão por hipotonicidade do meio, liberando larvas chamadas de miracídios. Os miracídios nadam até encontrar um hospedeiro intermediário, caramujo do gênero *Biomphalaria*, penetrando em seus tecidos e transformando-se em um novo tipo larvário, o esporocisto. Os esporocistos reproduzem por poliembrionia, gerando esporocistos-filhos e posteriormente larvas infectantes ao hospedeiro definitivo, denominadas de cercárias. As larvas abandonam o hospedeiro invertebrado, nadando em direção a superfície da água até encontrar um hospedeiro vertebrado, penetrando ativamente pela pele. As cercárias se transformam em esquitossômulo (última forma larvária do parasita), os quais ganham a grande circulação, coração, depois a pequena circulação, pulmão e em seguida o sistema porta intra-hepático alcançando a fase adulta. O ciclo evolutivo se completa quando os vermes adultos migram para os vasos do intestino do hospedeiro, fixando-se por meio de ventosas, onde a fêmea inicia a postura de até 3 mil ovos por dia (REY et al., 2002).

**Figura 1** – Esquema do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*



Fonte: Modificado de Verjovski-Almeida *et al.*, 2004.

A esquistossomose é caracterizada como uma doença crônica, pela presença de vermes adultos vivendo no sistema mesentérico por décadas. Os ovos viáveis são os grandes responsáveis resposta inflamatória. Esta reação inflamatória granulomatosa pode levar a um aumento da mortalidade porque a doença resulta em hepatoesplenomegalia, fibrose hepática e ascite (EL-CHEIKH *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

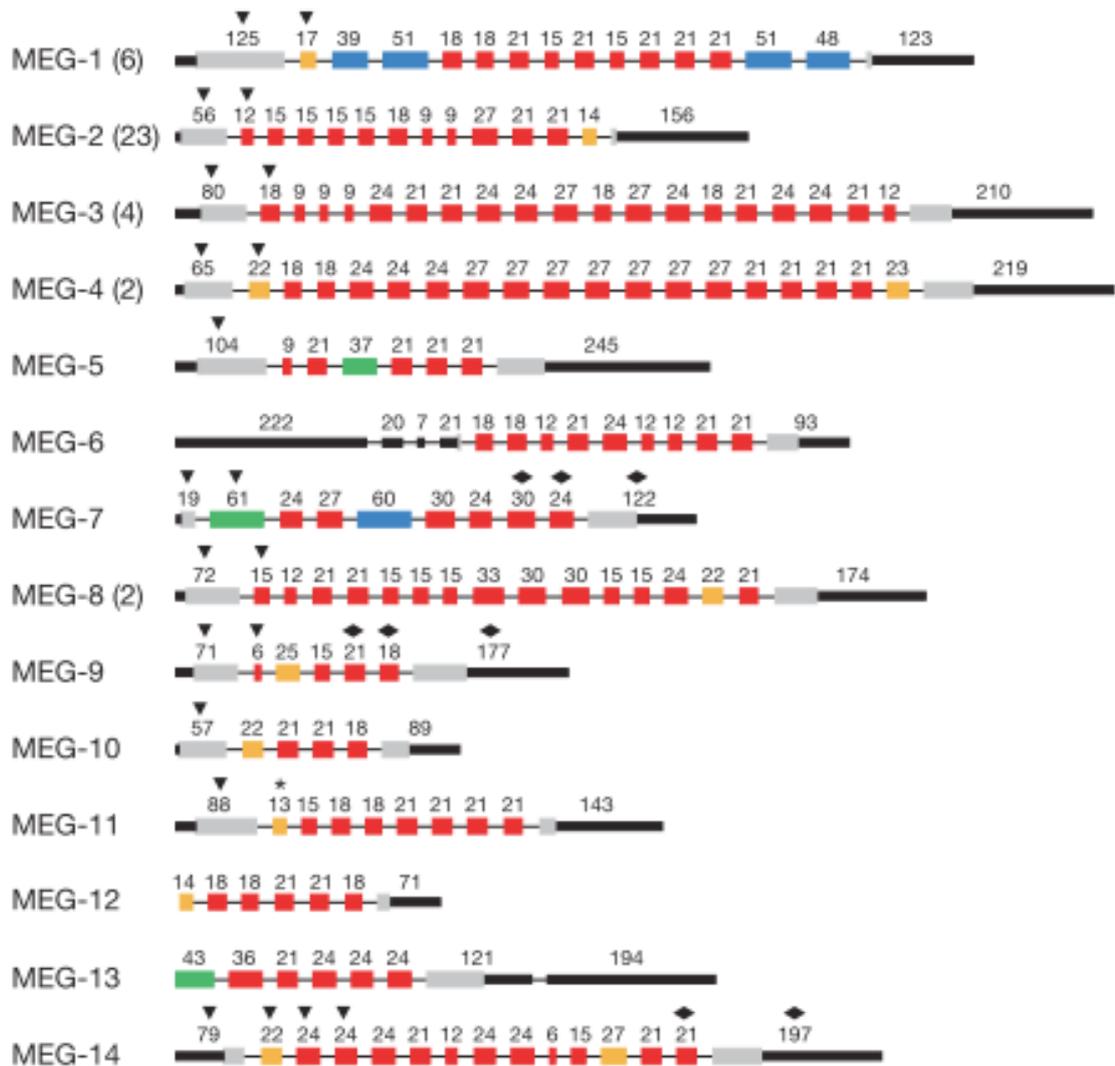
Espécies de organismos parasitários apresentam um grau variável de especificidade, sendo de suma importância a compatibilidade fisiológica para o sucesso vital. Os fatores dentro dos hospedeiros que definem a compatibilidade fisiológica são: disponibilidade de nutrientes adequados e suficientes, condições físicas e químicas, e

evasão imunológicas que permitem ao parasita o desenvolvimento até a fase de amadurecimento e reprodução. Além disso, uma vez que uma relação parasita-hospedeiro tem evoluído, o parasita e o hospedeiro estão presos em uma corrida armamentista evolucionária, “A Hipótese da Rainha Vermelha” (LIVELY; DYBDAHL, 2000). Neste contexto, presume-se que o sucesso do parasita se manifesta a nível molecular, na tentativa de modular as interações para que fiquem semelhantes causando o mínimo de perturbação ao hospedeiro (KOEHLER et al., 2007). Os mecanismos que fazem ocorrer estas modulações vêm sendo estudadas, e tem como principal foco as interações entre proteínas do parasita e hospedeiro.

Em 2009 Berriman *et al.*, publicou a sequência do genoma de *S. mansoni*, que proporcionou a descoberta de um grupo de família de proteínas que são transcritas por genes com *micro-exons*, realizada por DeMarco *et al.*, (2010). Os *micro-exons* são pequenas sequências codificadas, ou seja, são exons muito curtos, apresentando 9 a 36 pares de bases, são descritos em alguns organismos, podendo variar 0,5 a 1,6% do total de genes (VOLFOVSKY et al., 2003) já em *S. mansoni* no grupo descoberto a porcentagem é 75 % da sequência de codificação, sendo notável quando comparado a outros organismos.

Em experimentos envolvendo métodos proteômicos, realizados com predições “*in silico*” baseados em sequências de EST (*Expressed Sequence Tags*) e no genoma do *S. mansoni*, permitiram distinguir genes de um grupo de 24 famílias por possuírem uma estrutura contendo vários *micro-exons* (com 9 a 36 pares de bases). Também foi observado que os grupos que apresentavam estas estruturas, todos codificam proteínas que possuíam similaridade somente com outras proteínas provenientes de organismos do gênero *Schistosoma*, indicando especificidade em suas funções (DeMARCO et al., 2010). A figura 2 ilustra alguns membros desta família.

**Figura 2-** Representação esquemática da estrutura dos genes 14 membros da família de MEG. Em parêntese está o total de isoformas de cada membro. Cada caixa representa um exon e o numero representa o tamanho em nucleotídeos. As caixas vermelhas são exons múltiplos de 3pb, as laranjas são as indivisíveis por 3pb, as verdes são exons longo maiores de 36pb e divisíveis por 3pb, a azul também são exons longos mais indivisíveis por 3pb, as cinza são exons putativo e as em preto são regiões não traduzidas (UTR). Triângulos e os losangos pretos indicam previsões de exons que codificam peptídeos sinal e hélices transmembrana, respectivamente.



Fonte: Berriman *et al.*, 2009.

Outro ponto muito importante é que o grupo de proteínas codificadas por genes *micro-exon* (PCMs) estavam presentes em secreções de esquitossômulo e ovo do parasita juntamente com o fato que praticamente todas as PCMs possuem um peptídeo sinal previsto em sua sequência, sugerem que grande maioria das proteínas desta família

estejam sendo secretadas para o meio externo, sendo expostas ao sistema imune do hospedeiro (DeMARCO et al., 2010). Em vermes adultos algumas PCMs, MEG-4.1, MEG-4.2 e MEG-14, foram localizadas na glândula do esôfago (LI et al., 2013), enquanto que em esquistosomulos MEG-3.2 estava associada a glândula da cabeça do parasita. Acredita-se que outras PCMs podem estar sendo secretadas a partir das células sub-tegmentais ou por glândulas do parasita, exercendo assim um papel importante na relação parasito-hospedeiro.

Foi verificado que MEGs podem gerar diversos transcritos por meio do *splicing* alternativo. Conseqüentemente tais transcrições variantes podem gerar muitas isoformas de proteínas a partir de cada MEG, sendo em maioria com pequenas diferenças de peso molecular e pI (ponto isoelétrico). Análise utilizando cDNA de ovos, esquistossômulos e vermes adultos mostrou que cada estágio do ciclo de vida produz um repertório diferente de transcritos. Esses eventos permitem fornecer uma explicação para a manutenção de pequenos exons simétricos, pois pequenas porções podem ser removidas de um transcrito sem alterar o quadro de leitura (DeMARCO et al., 2010).

As PCMs podem ter grande importância na interação parasito-hospedeiro, visto que elas são secretadas e estão expostas ao sistema imune do hospedeiro definitivo. Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo sugerem a interação da proteína MEG-14 com uma proteína humana S100A9, cuja função está associada ao estímulo de processos inflamatórios (ORICIA, et al., 2014)

A esquistossomose é uma doença negligenciada e a segunda parasitose que mais mata no mundo. Em 2011 verificou-se que 6,3 milhões de Brasileiros notificados estavam infectados com *S. mansoni* (BRASIL, 2011).

Atualmente a única droga utilizada para o tratamento da infecção por esquistossomose é o praziquantel, o qual não impede a reinfecção e nem garante que não

haverá o desenvolvimento da resistência do parasita a droga (DeMARCO et al., 2010). Portanto, o estudo de novos alvos para desenvolvimentos de drogas e vacinas é de grande importância para o controle desta doença e tal propósito parece estar diretamente associado com o estudo das MEGs, de suas reais funções e interações com o sistema imune hospedeiro. A descrição mais detalhada destas proteínas tem o potencial para a criação de novas drogas ou outros tratamentos para o controle da esquistossomose.

# Objetivos

---

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterização estrutural e funcional das proteínas codificadas por genes de *micro-exons* de *S. mansoni*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Expressão em sistema heterólogo das proteínas codificadas pelos genes de micro-exons (MEGs), MEG-5 e MEG-8.2;

Avaliar a estruturação das proteínas codificadas pela MEG-5, por técnicas de Dicroísmo Circular (CD), Fluorescência intrínseca e infusão da proteína inteira no espectrômetro de massa;

Identificação de possíveis parceiros para o produto protéico das MEG-5, por meio de ensaios de duplo híbrido em leveduras utilizando como isca uma bibliotecas de cDNA de leucócitos humanos;

Realização de ensaios biológicos com o peptídeo da MEG-12, análise da ação hemolítica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) em eritrócitos expostos ao peptídeo.

# **Material e Métodos**

---

### 3. Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

#### 3.1 Expressão Heteróloga

##### 3.1.1 Amplificação por PCR

Inicialmente, extraímos o mRNA do parasita e realizamos a técnica de RT-PCR (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase) para obtenção do cDNA e a amplificação das sequências específicas dos transcritos dos dois genes de interesse (tabela 1). Os *primers* foram desenhados a partir da sequência codificadora depositada no banco de dados público, GenBank, o código para identificação da MEG-5 e MEG-8.2 são Smp\_152580 e Smp\_172180 respectivamente.

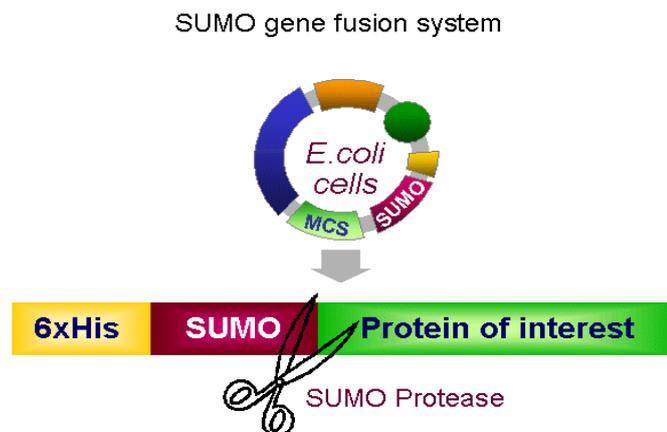
**Tabela 1-** Sequência de nucleotídeos (primers) desenhados para a amplificação dos genes por PCR, expressão heteróloga.

Proteína e vetor	Primer Forward	Primer Reverse
MEG-5pETSUMO	<i>Bam</i> HI- GGATCCA GTGGAAGACAACCAAAGTTTGTAACG	<i>Xho</i> I - CTCGAGTCATGGTAACCCCAATGATTG
MEG-8.2pETSUMO	<i>Bam</i> HI- GGATCCA AGTTTGAACATACAACATCAGGAATCAG	<i>Xho</i> - CTCGAGGACAGTAAAAGATTTAACTCCAGTAATAAG

As construções para os dois genes foram realizadas no vetor pET-SUMO, que possibilita a expressão da proteína heteróloga em fusão com a proteína SUMO e uma cauda de hexahistidina (figura 3). As fusões em SUMO podem aumentar a solubilidade e a expressão de proteínas recombinantes, outra vantagem é a presença de uma estrutura

terciária que é especificamente reconhecida e clivada por uma enzima de processamento ubiquitina-proteína a SUMO-protease que resulta na produção correta da proteína nativa. Optou-se pela utilização deste sistema devido ao fato de que experimentos anteriores utilizando o vetor pET28a, não obtivemos sucesso na expressão destas duas MEGs.

**Figura 3** – Esquema representativo do sistema da SUMO fusão



Fonte: Hall, 2004.

Para a realização da reação de PCR com volume final 50µl foi utilizado 5µl de tampão High Fidelity (Fermentas) 10x contendo MgCl<sub>2</sub>, 1µl de dNTP a 10mM, 1µl de MEG-5 forward *Bam*HI, 1µl de MEG-5 reverse *Xho*I, 1µl de cDNA de *S. mansoni* (aproximadamente 1µg), 0,5µl Taq polimerase High Fidelity (Fermentas) e 40µl de água milliQ. Após a preparação da reação, a mesma foi levada para o termociclador (Veriti 96 well, Applical Biosystems) sob as seguintes condições: 3 minutos a 94°C, seguidos de 18 ciclos (30 segundos a 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C) e por fim, 10 minutos a 72°C.

A análise do produto do PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com o kit WizardPCR Clean-up (Promega). Posteriormente, os

fragmentos de MEG-5 (220pb) e MEG-8.2 (550pb) foram ligados ao vetor de propagação pGEM-T easy (Promega) com peso molecular 3018pb e inseridos por choque térmico em bactérias competentes DH5 $\alpha$  (*Escherichia coli*). Para a análise do inserto, foi realizada a extração do DNA plasmidial e a clivagem por enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Um sequenciamento foi realizado com o intuito de verificar possíveis mutações.

Na etapa de subclonagem, os clones positivos foram clivados novamente e purificados pelo kit Wizard PCR *Clean-up*, quantificados e inseridos nos vetores de expressão pETSUMO. Os plasmídeos recombinantes, novamente, foram inseridos em células competentes DH5 $\alpha$  (*E. coli*) e posteriormente o DNA plasmidial foi extraído e clivado com as enzimas de restrição específicas para cada inserto.

Terminada estas etapas, os clones positivos foram sequenciados e analisados quanto à sua identidade com a sequência original, não sendo detectada nenhuma mutação.

### **3.1.2 Expressão e Purificação**

Após da confirmação da identidade dos clones positivos, MEG-5pETSUMO e MEG-8.2pETSUMO, estes foram transformados novamente por choque térmico, em células de *E.coli* cepa Rosetta, buscando a expressão das duas proteínas. Foi selecionada uma colônia isolada e inoculada em 100 ml de meio de cultura LB contendo 32 $\mu$ g/ml de clorofenicol e 50 $\mu$ g/ml de canamicina, em 37°C por 16 horas em agitação de 250rpm. O pré-inoculo foi transferido para um volume de 1L de meio de cultura TB líquido com os mesmos antibióticos citados a cima e incubado por 3 horas a 37°C em agitação de 250rpm. Ao atingir DO<sub>600</sub> 1,2, foi adicionado as células incubadas 0,8mM de IPTG, e

submetidas a temperatura de 20°C em 12 a 14 horas. Ao final da indução da expressão, as células foram centrifugada em 6.000rpm por 30 minutos e o pellet foi ressuspensão em 20ml de tampão 300mM de NaCl, 50mM de Tris, 5 % de glicerol e 6M de uréia. O produto da extração foi submetido a ultrassom 8 vezes (com intervalos de 30 em 30 segundos). Para a separação das duas frações, solúvel e insolúvel, as células visadas foram submetidas a centrifugação a 11000rpm por 30 minutos, a 4°C.

A fração solúvel foi submetida a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel, em que foram realizadas lavagens com diferentes concentração de Imidazol (5mM e 10mM em 50ml; 50mM, 100mM, 250mM e 300mM em 15ml de tampão). Os produtos proteicos foram analisados por meio do gel de poliacrilamida 15% e submetidos a uma dessalinização para a retirada do Imidazol e da uréia presente no tampão, por meio da coluna HiPrep™ 20/10 Dessalting da GE Healthcare.

Com o intuito de separar a proteína em questão da proteína em fusão e da cauda de hexa-histidina, foi realizada a clivagem utilizando 0,2mg/ml da enzima SUMO-protease. Em seguida, uma segunda etapa de purificação foi realizada no intuito de obter apenas a proteína desejada, após análise em gel de tricina 16%, verificamos que ainda existiam proteínas contaminantes, razão pela qual efetuamos a terceira etapa de purificação da proteína em coluna de exclusão molecular. Foram aplicados 1ml da proteína na coluna Superdex 75 (GL10/300, GE Healthcare) equilibrada com tampão 10mM de Fosfato de sódio e 50mM de NaCl, pH 7.4, acopladas ao equipamento *Äkta purifier*, e monitoradas em uma absorbância de 280 a 220nm. As frações de interesse foram coletadas e analisadas em gel de tricina 16%.

### 3.1.3 Caracterização Estrutural

Com a finalidade de alcançar uma espectrometria de massa para obter a total comprovação da expressão da proteína em questão, realizamos a tripsinização da proteína partindo de uma banda fragmentada, observada em gel de tricina 16%. Para realização deste experimento foi necessário a remoção do corante e do SDS adicionamos 400µl da solução 100mM de bicarbonato de amônio e 50% de acetonitrila (ACN), incubando por 15 minutos em temperatura ambiente, repetimos este processo por duas vezes.

Para desidratação dos fragmento de gel foi adicionado 200µl de 100% ACN incubando por 5 minutos em temperatura ambiente, repetindo por duas vezes o processo. Descartamos o sobrenadante e as amostras desidratadas foram submetidas à evaporação para completa remoção da ACN. Em seguida, o gel foi reidratado adicionando 30µl da solução contendo 50mM de bicarbonato de amônio com de 100ng de tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade* - Promega) e incubando-as em gelo por 30 minutos. Passado o tempo de incubação, adicionamos 35µl de bicarbonato de amônio 50mM e novamente a digestão foi incubada, mas agora a 37°C por 16 horas.

Para dar continuidade é necessário a interrupção da digestão, esta é feita pela adição de 10µl de ácido fórmico 5% e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, centrifugamos por 30 segundos a 16000g, e coletamos o sobrenadante contendo os peptídeo e acrescentamos 12µl de 50% ACN e 5% ácido fórmico seguida de nova centrifugação para máxima remoção de peptídeos. Transferimos o sobrenadante para outro microtubo e o centrifugamos por 10 minutos a 16000g. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro microtubo.

A análise das amostras foi realizada no laboratório de Biofísica “Sergio Mascarenhas” da Universidade de São Paulo, São Carlos, sob a supervisão Dr. Edson Crusca Junior, no espectrômetro de massas micrOTOF QII (Bruker) e a identificação dos peptídeos realizadas no programa MASCOT.

Para um alto grau de pureza e a remoção de contaminantes, todos os materiais utilizados na preparação da tripsinização foram previamente tratados com metanol.

Em análise da estrutura secundária utilizamos Dicroísmo Circular (CD) convencional no espectropolarímetro Jasco modelo J – 815 CD Spectrometer (Tóquio, Japão) conectado ao sistema de controle de temperatura (Peltier). Em todos os tipos de análises a proteína encontrava-se á uma concentração de 0,13mg/ml e os espectros foram coletados na faixa de 190 a 280nm em triplicata.

A primeira análise realizada, a proteína estava em tampão 10mM de Fosfato e 50mM de NaCl em pH 7,5 a 25°C. Para o ensaio de variação de temperatura esta se encontrava em mesmas condições. A temperatura variou de 10 em 10°C partindo de 10°C a 80°C, com intervalos de 5 minutos em cada temperatura.

Para os diferentes pHs utilizamos os tampões citados na tabela 2, variando o pH 2 a 12 aumentando de 2 em 2. A proteína MEG-5 em tampão fosfato de sódio 10 mM e 50 mM de NaCl foi submetida a presença de três tipos de micelas sódio dodecil sulfato (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio CTAB e N-hexadecil-N, N-dimetil-3-amônio-1-propanossulfonato (HPS), em proporção molar de proteína / detergentes de 1:50, e dois tipo de solventes orgânicos metanol 50% e acetonitrila (ACN) 50%. Nestes três tipos análises foram realizadas em temperatura de 25°C.

**Tabela 2-** Tampões para análise de CD variando o pH.

<b>Concentração</b>	<b>Tampão</b>	<b>pH</b>
<b>10Mm</b>	Acido fosfato de sódio	2
<b>10mM</b>	Acetato de sódio	4
<b>10mM</b>	Fosfato de sódio	6, 7 e 8
<b>10mM</b>	Borato de sódio	9 e 10

Fonte: Elaborada pela autora.

O máximo de fluorescência intrínseca do triptofano foi medido em um espectrofluorímetro, modelo ISS – K2 (ISS, IL, USA). A concentração da MEG-5 era 0,13mg/ml em tampão 10mM de Fosfato e 50mM de NaCl em pH 7,5 a 25°C. A emissão foi monitorada no intervalo de 310nm a 450nm, sendo excitadas em 295nm.

### **3.2 Duplo Híbrido**

O ensaio de duplo híbrido permite o estudo de interações proteína-proteína baseado no princípio de que fatores de transcrição são em geral formados por dois domínios. Um domínio é responsável pelo reconhecimento da sequência de DNA e ligação ao mesmo (BD) e o outro é o domínio de ativação (AD), o qual é reconhecido pela maquinaria de transcrição e ativa a expressão do gene por ele regulado. Em muitos fatores de transcrição esses dois domínios podem ser separados e continuam funcionais desde que eles estejam fisicamente próximos sem, contudo estarem covalentemente ligados (VAN CRIEKINGE; BEYAERT, 1999).

Para realização do ensaio, desenhamos um *primer* partindo da sequência codificadora da MEG-5 (Smp\_152580) com sitio de restrição *EcoRI* e *Sall* (tabela 3). Escolhemos o vetor pBTM116 que possui o domínio de ligação do DNA Lex-A de *E. coli*, o qual é reconhecido pelo domínio de ativação GAL4 de levedura, além de possuir um marcador nutricional utilizado em leveduras com genótipo Trp-. A cepa de

levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para o ensaio foi a L40 (*trp1*-901, *his3\_200*, *leu2*-3, *ade2* *LYS2*:(*lexAop*) 4-*HIS3* *URA3*:(*lexAop*) 8-*lac*, por possuir *trp1*, *leu2*, e *ade2* como marcadores genéticos, além de uma cópia cromossomal dos genes *HIS3* e *LacZ*, cuja atividade é controlada pelo promotor *LexA*.

O vetor pBTM116 foi construído no laboratório do Dr. Nilson Zanchin (LNLS), e sua marca de seleção em bactéria foi modificada para resistência a canamicina.

**Tabela 3** - Sequência de nucleotídeos (*primers*) desenhados para a amplificação dos genes por PCR para o ensaio de duplo híbrido.

<b>Proteína e vetor</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>
	<i>EcoRI</i> -	<i>Sall</i> -
<b>MEG-5 pBTM116</b>	<b>GAATTC</b> AGTGGAAGACAACCAAAGTTTGTAAACG	<b>GTCGAC</b> TCATGGTAACCCCAATGATTG

Fonte: Elaborada pela autora.

Na amplificação por PCR com volume final 50µl foi utilizado 5µl de tampão High Fidelity (Fermentas)10x contendo MgCl<sub>2</sub>, 1µl dNTP a 10mM, 1µl de MEG-5 forward *EcoRI*, 1µl de MEG-5 reverse *Sall*, 1µl de cDNA de *S. mansoni* (aproximadamente 1µg), 0,5µl Taq polimerase High Fidelity (Fermentas) e 40µl de água milliQ. A reação, a mesma foi levada para o termociclador (Veriti 96 well, Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 3 minutos a 94°C, seguidos de 18 ciclos (30 segundos a 94°C, 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C) e por fim, 10 minutos a 72°C.

O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com o kit WizardPCR *Clean-up* (Promega). Os fragmentos de MEG-5 (220pb) foram ligados ao vetor de propagação pGEM-T easy (Promega) com peso molecular 3018pb e transformados por choque térmico em bactérias competentes DH5α

(*E. coli*). Realizou-se uma realizada a extração do DNA plasmidial e a clivagem por enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall*, no intuito de analisar o inserto, além da realização de um sequenciamento para verificar possíveis mutações.

Na subclonagem, os clones positivos foram clivados novamente e purificados pelo kit Wizard PCR Clean-up, quantificados e inseridos nos vetores de expressão pBTM116. Os plasmídeos recombinantes, novamente, foram transformados em células competentes DH5 $\alpha$  (*E. coli*) e posteriormente o DNA plasmidial foi extraído e clivado com as enzimas de restrição. Outro sequenciamento realizado para verificar se a isca encontra-se na mesma fase de leitura do domínio de ligação ao DNA.

Para a transformação do inserto na levedura, isolamos uma colônia da levedura de *S. cerevisiae* cepa L40 inoculada em 50mL de meio YPD (10g/L de extrato de levedura, 20g/L de peptona e 20g/L de glicerol) por um período 24 horas, sob 30°C, em agitação a 200 rpm, até que atinja a fase estacionária (DO 600nm  $\geq$  1,5). Em cada transformação foram separados 1mL do inoculo e centrifugadas a temperatura ambiente por 3 minutos a 500rpm. Em seguida, as células foram ressuspensas em 200 $\mu$ L de tampão de transformação (PEG 3350 50%, 2M de acetato de lítio, TE 10X, 1M de DTT) e adicionados 5 $\mu$ l (10mg/ml) de DNA de esperma de salmão desnaturado e 1 $\mu$ g (ou q.s.p.  $\geq$  200ng) do DNA de interesse, estas foram incubada em banho-maria a 45°C, por 40 minutos. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 3000rpm, em temperatura ambiente e 100 $\mu$ L do sobrenadante foi descartado e o restante, ressuspensas. Estas células foram plaqueadas em 50 mL meio seletivo SD-W sólido e novamente incubada na estufa a 28-30°C por 3 a 4 dias, até que as colônias atinjam coloração perolada.

Neste processo, torna-se necessário a realização de teste de autoativação do sistema ou teste  $\beta$ -Galactosidase, para verificar se houve expressão dos genes repórteres. As colônias de leveduras transformadas crescidas na etapa anterior foram repicadas em triplicata em 20ml meio SD-W sólido (tabela 4) a 30°C, por aproximadamente 3 dias. Posteriormente, uma das placas foi selecionada e realizamos a transferência das colônias para o papel de filtro. Este foi emergido por 5 minutos em nitrogênio líquido para lise das células. Em sequência, inseridos a face contendo as células sobre outro papel de filtro imerso em 5mL de tampão Z (16,1g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5,5g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,75g/L de KCl e 0,246g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,0) 13,5 $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol e 83,5 $\mu\text{L}$  de X-gal 20mg/mL, em uma placa de petri, incubado a 37 °C até o surgimento de colônias azuis (aproximadamente 1 hora). Para o controle positivo foi utilizado a proteína SEPT4 (já sabido que esta em sua conformação completa, auto-ativa o sistema), cedida pela Dra. Joci Neuby do laboratório de Biofísica “Sergio Mascarenhas” da Universidade de São Paulo, São Carlos. Como controle negativo foi utilizado o plasmídeo pBTM116 vazio.

Com o objetivo de selecionar os transformantes que independem de histidina no meio para sobreviver realizamos o teste do 3-AT (3-amino1,2,4-triazol). Fizemos um gradiente de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50mM de 3-AT e em cada placa contendo 20mL de SD-WH (tabela 4), incubamos por 7 dias a 30°C. A melhor amostra precisa crescer em menor concentração de 3-AT e ter diâmetro de até 1mm. Em nosso teste determinamos que não era necessário nenhuma concentração de 3-AT.

Selecionamos uma colônia e a repicamos em meio SD-WH (tabela 4). Posteriormente, escolhemos colônias pré-transformadas MEG5-pBTM116 e inoculamos em 150ml de meio SD-W, incubando a 30°C, 250rpm por aproximadamente 24 horas,

até atingir a  $DO_{600nm} \geq 1,5$ . Atingida a DO, as células foram centrifugadas a 3500rpm por 5 minutos a 21°C. Todo o pellet foi ressuspenso e transferido para 1000ml de meio YPD e incubado no shaker a 30°C, 150rpm, por aproximadamente 2 horas, até atingir as DO  $DO_{600nm} \geq 0,4$  a 0,6. O produto deste foi centrifugado por 10 minutos, 3000rpm a 10°C e ressuspenso em 400ml de TE1X, realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições. O pellet desta vez foi ressuspenso em 8ml de TE/LiAc 1X e retiramos duas alíquotas para os controles.

Adicionamos 20mg de DNA de esperma de salmão desnaturado à suspensão celular e 100ml de DNA de esperma de salmão em cada uma das alíquotas reservadas, também acrescentamos 300µg de DNA da biblioteca de cDNA de leucócitos Humano (Clontech) e 60ml de PEG/LiAc. Nos controles, negativo: adicionou 10µL de água, positivo: 200ng de DNA do plasmídeo pGAD424 e 600µL de PEG/LiAc em cada. Incubamos a 30°C, 150rpm por 30 minutos.

Submetemos as células a choque térmico a 42°C por 15 minutos, agitando de 5 em 5 minutos, e em gelo por 3 minutos. Coletamos as células por centrifugação a 3000rpm, 21°C por 5 minutos e ressuspendemos em 10mL de TE1X. Fizemos suspensões celulares com titulações de 1:10, 1:100 e 1:1000 nas placas de petri contendo SD-WL (tabela 3). Os controles foram plaqueados em meio SD-WLH (tabela 4). As placa foram incubadas a 30°C por 6 dias, e monitoradas diariamente, quando atingiam 2mm foram marcadas.

As colônias marcadas foram contadas e selecionadas as maiores, estas foram repicadas em duplicata em meio SD-WL (tabela 4) e em triplicata no meio SD-WLH (tabela 4). Estas ficaram crescendo em estufa a 30°C por 7 dias. Após o crescimento das

células, refizemos o teste de  $\beta$ -galactosidase para verificar da expressão do gene lacZ e eliminar os falsos positivos.

As colônias positivas foram inoculadas em meio SD-L (tabela 4) para seleção do plasmídeo recombinante pACT2 e incubadas a 30 °C, 200rpm por 20 horas. A coleta celular ocorreu por centrifugação a 16000 g por 1 minuto e ressuspensa em 60 $\mu$ L de 50mM de Tris, pH 8,0 e em seguida, adicionou 20 $\mu$ L de liticase a 5mg/mL, em que foi submetida a agitação vigorosa e incubação em banho-maria a 37 °C por uma hora, com leve agitação a cada 10 minutos.

Após a incubação acrescentou 20 $\mu$ L de SDS 20% e sujeitamos a 10 ciclos com 20 segundos em nitrogênio líquido e 20 segundos em banho-maria a 42°C. Após o ciclo foram adicionados 100 $\mu$ L de água milli-Q e 200 $\mu$ L de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v/v) e submetidos a centrifugação por 1 minuto a 16000 g. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo contendo 10 $\mu$ L de 8 M LiCl e 300 $\mu$ L de etanol absoluto gelado, seguido por incubação a -20 °C por 20 minutos. A precipitação do DNA sucedeu a centrifugação a 16000g por 10 minutos e a ressuspensão em 30 $\mu$ L de água milli-Q.

O DNA extraído da levedura, cerca de 15 $\mu$ L, foi transformando em células de bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$ . A transformação foi realizada por choque térmico, 20 minutos em gelo, 3 minutos em banho maria a 42°C e 5 minutos no gelo, adicionou 200 $\mu$ l de meio LB, incubando por 1 hora, 200rpm a 37°C. Por fim, plaqueamos em meio LB sólido contendo 50 $\mu$ g/mL de ampicilina e incubamos na estufa por 16 horas a 37°C.

Para extração do DNA plamidial na bactéria, realizamos um pré-inóculo com 5ml de meio LB e 50 $\mu$ g/mL de ampicilina, deixamos crescer no Shaker por 16 horas,

200rpm e 37°C. Coletamos as células por centrifugação a 16000g por 1 minuto e ressuspendemos em 300µL de solução I (50mM de glicose, 25mM de Tris-HCl, 10mM de EDTA, pH 8,0) por agitação vigorosa. Adicionou-se a ressuspensão 300µL de solução II (0,2mM de NaOH, 1% de SDS) e incubou por 5 minutos a temperatura ambiente, em seguida, acrescentou 300 µL de solução III (60mL de acetato de potássio 5M, 11,5mL de ácido acético glacial, 28,5mL de água) e centrifuga por 10 minutos em rotação de 16000g. Feito o procedimento, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com 0,7 volume de isopropanol e incubado por 10 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi precipitado por centrifugação 16000g por 10 minutos, e a retirada do excesso sal, adicionando 500µl de etanol 70% e centrifugando novamente a 16000g por 10 minutos. O DNA foi ressuspenso em 50µL de água.

Os resultantes da extração foram sequenciados em sequenciador automático *Genetic Analyzer Applied Biosystems Hitch* no laboratório de Biofísica “Sérgio Mascarenhas” da Universidade de São Paulo em São Carlos, sob a supervisão da Ms. Andressa Alves Pinto.

Analizamos as sequências resultantes do sequenciamento buscando similaridade com outras sequências depositadas no banco de dados Genebank, para isto, utilizamos o programa BLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), com a finalidade de deduzir a função da proteína codificada pela sequência. Para estas análises retiramos a sequência do vetor 3'-GTCGAC-5' e observamos e selecionamos apenas os clone que se mantiveram no quadro de leitura +1 (FRAME +1).

Realizamos um teste em levedura com estes possíveis candidatos a interação com a MEG-5. Cotransformamos estes candidatos com a MEG-5pBTM116 na L40, seguindo o protocolo de transformação em pequena escala descrito anteriormente, estes

foram plaqueados em meio SD-WLH, no intuito de avaliar a ativação de *HIS3*. Novamente este foi submetido ao teste de  $\beta$ -galactosidase para confirmação da expressão do gene lacZ.

Foi feito também um ensaio quantitativo para analisar a força da interação em gradientes de 1, 2, 3 e 5mM de 3-AT para diluições seriadas das colônias de L40 em 1:10, 1: 100, 1:1000. Foram incubados a 30°C por 3 dias.

**Tabela 4-** Meios de cultura seletivos para leveduras, utilizados no ensaio de duplo híbrido.

Reagentes	Meios Seletivos (1 litro)				
	SD-L	SD-W	SD-WL	SD-WH	SD-WLH
<b>Difco Yeast Nitrogen Base (YNB)</b>	6,7g	6,7g	6,7g	6,7g	6,7g
<b>Glicose</b>	20g	20g	20g	20g	20g
<b>Adenina(A)</b>	0,02g	0,02g	0,02g	0,02g	0,02g
<b>Histidina (H)</b>	0,02g	0,02g	0,02g		
<b>Leucina (L)</b>	x	0,1g	x	0,1g	x
<b>Triptofano (w)</b>	0,02g	x	x	x	x

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.3 Síntese do Peptídeo MEG-12

O peptídeo MEG-12 foi sintetizado no laboratório de Biofísica “Sergio Mascarenhas” da Universidade de São Paulo, São Carlos, pelo Dr. Edson Crusca Junior.

#### 3.3.1 Ensaio Hemolítico

Coletamos 3ml sangue humano em um frasco contendo 10ml de PBS 1X, pH 7,4. Em seguida, promovemos 3 lavagens com uma a solução de PBS 1X, pH 7,4, descartando o sobrenadante. Ao final das lavagens, fizemos uma suspensão eritrócitos 1 % em PBS.

No ensaio com a MEG-5, a proteína encontrava-se em uma solução contendo 1% de eritrócito em tampão PBS 1X, pH 7,4 e em uma concentração de 50 $\mu$ M em um volume final de 100 $\mu$ l. Realizamos uma diluição seriada de 100 $\mu$ M a 0,8 $\mu$ M em triplicata, e incubamos por 60 minutos na estufa a 37°C. Utilizamos dois controles, o positivo continha apenas o tampão PBS 1X, pH 7,4 e no positivo, 10% de Triton X-100.

Já no ensaio com a MEG-12, esta encontrava-se com uma concentração inicial de 60 $\mu$ M em na solução com 1% de eritrócito em tampão PBS 1X, pH 7,4 e 3% de DMSO, volume final de 100 $\mu$ l. Foi realizada a diluição seriada de 60 $\mu$ M a 7,5 $\mu$ M, incubada por 90 minutos na estufa a 37°C. Também realizamos um ensaio mantendo a concentração em 30 $\mu$ M e variamos o tempo em 5, 15, 60 e 90 minutos, todos incubados á 37°C na estufa. Também foi utilizado os dois controle citados a cima, mas neste foi adicionados 3% de DMSO.

Após a incubação, em ambos os ensaios, centrifugamos os tubos a 3000 g em 3 minutos, coletamos o sobrenadante e o aplicamos em uma microplaca de 96 poços, onde o grau de hemólise foi avaliado espectrofotometricamente pela leitura da absorbância em 405nm na leitora de microplacas (Stat Fax Awareness Technologyinc).

A porcentagem de hemólise foi calculada descontando o valor do controle negativo de todas as amostras, pois considerou-se que este controle fosse zero e o controle positivo 100%, então a equação ficou da seguinte maneira:

$$\frac{(\text{Amostra} - \text{Controle negativo}) \times 100}{\text{Controle positivo} - \text{Controle negativo}} = \%$$

$$\text{Controle positivo} - \text{Controle negativo}$$

### 3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realizar a microscopia, primeiramente realizamos o protocolo do teste hemolítico. Realizamos de duas formas: o volume lisado centrifugado 5 minutos a 1000g e sem centrifugar, e as estas soluções adicionamos 1ml de PBS 1X, pH 7,4 contendo 2,5% de glutaraldeído específico para microscopia eletrônica (Sigma Aldrich, estoque em 50% em H<sub>2</sub>O) e incubamos por 90 minutos a 4°C, esta é a etapa de fixação dos eritrócitos.

Após a fixação as amostras foram centrifugadas e ressuspensas gentilmente em 1ml de PBS 1X, pH 7,4 e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, este processo de lavagem foi repetido por mais 2 vezes.

A desidratação foi realizada em série alcoólica de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 e 100% de concentração de etanol e entre cada etapa incubamos a amostra por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugamos 1000g por 5 minutos.

Para a secagem das amostras todo o sobrenadante foi retirado e adicionamos a esta amostra 100µl de HMDS (Hexamethyldisilazane 99,9% da Sigma Aldrich) . Desta solução, aplicamos 3µl em uma lâminula 17mm (Microscope Cover Glass 22x 22mm) e a recobrimos com uma película fina de ouro, para a visualização em microscópio eletrônico de varredura.

As imagens e o recobrimento de ouro foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Tecnologia de Materiais Híbridos (CTMH) da Universidade de São Paulo, São Carlos, pelo técnico Wagner Correr, no microscópio eletrônico de varredura *Inspect F-50* (FEI, Nederland).

# **Resultados e Discussão**

---

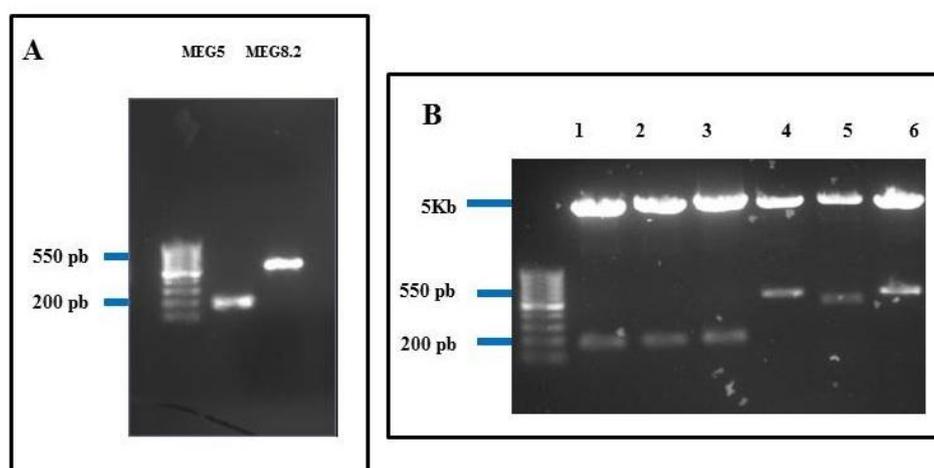
## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Expressão Heteróloga

#### 4.1.1 Amplificação, Clonagem e Subclonagem

Obtivemos com sucesso na amplificação do fragmento de cDNA, utilizando *primers* específicos para cada gene. A eletroforese em gel de agarose permitiu a detecção de bandas apresentando o tamanho previsto (MEG-5: 220pb e MEG-8.2: 550pb) e quantidades suficientes para a etapa de clonagem (figura 4A). Após clonagem em vetor de expressão foi possível obter clones contendo o inserto de tamanho apropriado (figura 4B), que foram utilizados para a realização da expressão heteróloga das proteínas.

**Figura 4-** Eletroforese em gel de agarose 0.8%. **A-** Amplificação por PCR dos genes MEG-5, MEG-8.2. **B-** Análise de restrição dos plasmídeos MEG-5pETSUMO- (coluna 1, 2 e 3) e MEG-8.2pETSUMO (coluna 4,5 e 6). As setas em azul indicam as bandas específicas dos genes e o tamanho esperado.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.2 Expressão e Purificação da Proteína MEG-5

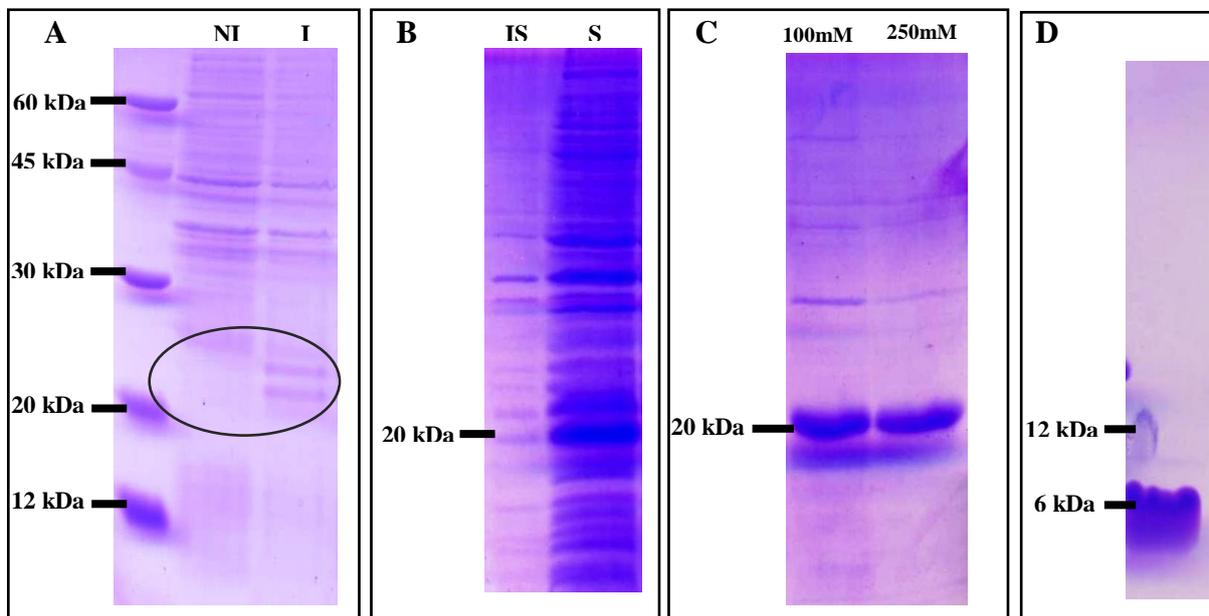
Finalizada a etapa de clonagem, realizamos testes de expressão das proteínas MEG-5 e MEG-8.2 em sistema heterólogo buscando a otimização das condições de

expressão. Foram realizadas diversas tentativas de expressão utilizando diferentes meios de cultura, temperatura e concentrações de IPTG. Foi verificado que a melhor condição para expressão da proteína MEG-5 foi quando a indução foi realizada em meio de cultura TB líquido, contendo 0,8mM de IPTG, e em uma temperatura de 20°C durante 12 a 14 horas. Por meio da análise através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% dos produtos protéicos existentes no lisado da célula, foi possível constatar a presença de uma banda com peso molecular próximo aquele esperado para a proteína MEG-5 que não estava presente no lisado de células controle (figura 5A). Devido a isso é possível concluir que foi possível induzir a expressão da proteína MEG-5 em sistema heterólogo. Para proteína MEG-8.2, não observamos diferença no perfil protéico de lisados proveniente de bactérias não induzidas e induzidas, concluindo que não houve expressão da proteína heteróloga (figura 6). Mesmo após varias tentativas de expressão da proteína MEG-8.2, utilizando diferentes condições, não foi possível padronizar uma condição na qual obtínhamos a proteína em quantidades detectáveis. Devido a isso, decidimos priorizar o estudo da proteína MEG-5.

Verificou-se que a proteína MEG-5 apresentava baixa estabilidade em solução, desaparecendo durante o processo de purificação. Por este fato, se optou por realizar a purificação em coluna de níquel sob condições desnaturantes com a presença de 6M de uréia para evitar ação de possíveis proteases presentes no lisado bacteriano e estabilizar a proteína em solução. Com isso foi possível purificar a proteína MEG-5 em coluna de níquel (figura 5A, B e C - MEG-5 em fusão com a SUMO, peso molecular ~20kDa). Um passo seguinte utilizando uma coluna de dessalinização permitiu a retirada do Imidazol e da uréia presente no tampão. A clivagem da proteína de fusão foi realizada utilizando a proteína SUMO-protease, de modo que a MEG-5 fosse separada da proteína SUMO e da cauda de hexa-histidina. Uma segunda etapa de purificação foi realizada em coluna de níquel de

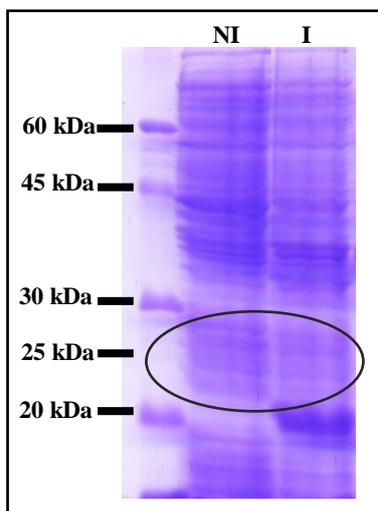
modo a reter a SUMO-protease que possuía uma cauda de hexa-histidina, permitindo assim a obtenção da proteína MEG-5. Verificamos que ainda existiam proteínas contaminantes, razão pela qual efetuamos a terceira etapa de purificação da proteína em coluna de exclusão molecular, onde obtivemos a proteína com um alto grau de pureza (figura 5D).

**Figura 5-** Análise da purificação da proteína MEG-5 em gel SDS-PAGE. **A-** Teste de expressão: NI-fração não induzido I- fração induzido com 0,8mM de IPTG, o círculo indica a diferença entre as frações. **B-** Análise de solubilidade: IS- fração insolúvel e S-fração solúvel. **C-** Frações resultantes da cromatografia por afinidade em coluna de níquel da proteína MEG-5, eluato contendo 250mM de Imidazol. **D** - Análise em gel de tricina da fração purificada da proteína MEG-5 após clivagem pela SUMO-protease e cromatografia de exclusão molecular.



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 6-** Análise da indução da proteína MEG-8.2 em gel de poliacrilamida 15%. -Fração não induzido (NI) e fração induzido com 0,8mM de IPTG (I) o círculo indica que não houve a diferença entre as frações.



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da banda observada na figura 2D foi recortada do gel e foi realizada uma tripsinização seguida da análise dos peptídeos resultantes por espectrometria de massa. Análise dos espectros de fragmentação utilizando o programa MASCOT permitiu a identificação de 32% da cobertura da sequência da proteína MEG-5.

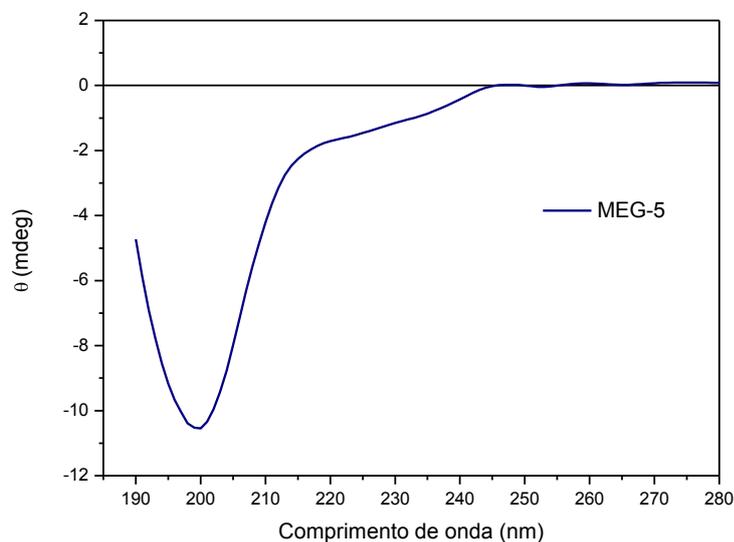
#### **4.1.3 Caracterização Estrutural da Proteína MEG-5**

Após estabelecermos as condições de expressão da MEG-5, executamos ensaios de Dicroísmo Circular (CD) com a proteína purificada, para o estudo da estrutura secundária da proteína. A análise do espectro obtido (figura 7) indica a predominância de uma estrutura desordenada, devido à presença de um pico negativo nos intervalos de 180-200nm. No entanto, a presença de picos de menor intensidade na faixa entre 220-240nm indicam que parte da proteína pode apresentar estruturação. Predições de estrutura secundária utilizando com os programas SOPMA (GEOURJON; DELEAGE,

1995 )e Jpred (COLE et al., 2008 ) previram com alto grau de confiança a presença de uma alfa-hélice na região C-terminal (figura 8), que poderia ser responsável pela estruturação parcial detectada na proteína.

Proteínas intrinsecamente desestruturadas podem assumir diferentes conformações e isso permite com que estas muitas vezes interajam com diferentes parceiros protéicos (DAS; MUKHOPADHYAY, 2011). Neste contexto, tornou-se mais promissora a realização dos experimentos de duplo híbrido para verificar a possível interação com proteínas de bibliotecas de leucócitos humanos. A proteína MEG-14 já foi descrita como uma proteína intrinsecamente desestruturada pelo nosso grupo (LOPES et al., 2013) e aparentemente a presença de regiões desestruturadas em algumas das MEGs pode ser importante para sua função.

**Figura 7** - Espectro de dicroísmo circular da proteína MEG-5 após purificação em coluna de exclusão molecular (AKTA).



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 8-** Resumo do resultado da predição de estrutura secundária da proteína MEG-5 (sequência sinal excluída) utilizando o programa Jpred3. **H**- região com estrutura de alfa-helice. **E**- região com estrutura de folha beta. Os números abaixo indicam o grau de confiança da predição em cada região.

```

OrigSeq      : 1-----11-----21-----31-----41-----51---- :
OrigSeq      : SGRQPKFYVVDTDGNLRSGGSSDISDMFGQNKTLGTAFKTLHNLWDLKQSLGLP : OrigSeq

Jnet         : -----EEE-----H-HH-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH----- : Jnet
Jnet Rel     : 999884464367777777777640122367468999999999999998538999 : Jnet Rel
  
```

Fonte: COLE et al., 2008.

A análise das propriedades físico-químicas desta possível alfa-hélice permite notar um caráter anfipático com a presença de uma face polar e outra apolar (figura 9). Peptídeos formados por hélices anfipáticas são bastante descritos na literatura, sendo que muitos deles estão envolvidos na lise de células procariotas ou eucariotas, em interação com bicamadas lipídicas (SEGREST et al., 1992) e na imuno modulação em células humanas (WANG et al., 2012). Deste modo, a presença de tal estrutura pode fornecer indícios a respeito da função desta proteína.

**Figura 9-** Análise da polaridade da alfa-hélice predita para a proteína MEG-5 utilizando o programa HeliQuest. Regiões em amarelo representam resíduos hidrofóbicos.

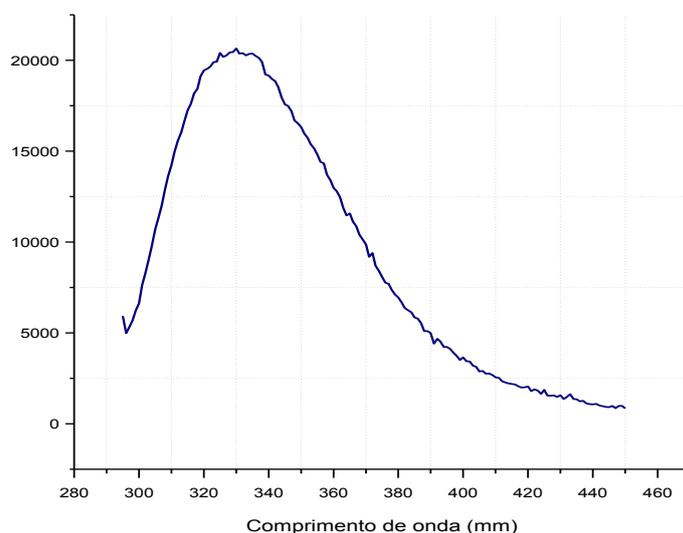
1LGTAFKTLHNLWDLKQ18			Click to enlarge
Physico-chemical properties	Polar residues + GLY	Nonpolar residues	
Hydrophobicity <H>	Polar residues + GLY (n / %)	Nonpolar residues (n / %)	
0.646	9 / 50.00	9 / 50.00	
Hydrophobic moment <μH>	Uncharged residues + GLY	Aromatic residues	
0.591	GLN 1, HIS 1, THR 2, ASN 1, GLY 1	TRP 1, PHE 1,	
Net charge z	Charged residues	Special residues	
1	LYS 2, ASP 1,	CYS 0, PRO 0	
Hydrophobic face : A L L L L F L L			

Fonte: GAUTIER et al. 2008.

Para a verificação da existência de uma hélice na região C-terminal, foi realizada uma análise do máximo de emissão de fluorescência no triptofano pela técnica de fluorescência intrínseca. O único triptofano presente nesta proteína esta na região da

provável alfa-hélice e, portanto, o mesmo serve como uma sonda para observar uma possível estruturação nesta região. Observando a figura 10, verificamos que o máximo de emissão de fluorescência está em 330nm, portanto deslocado da emissão esperada para o triptofano livre em solução que é aproximadamente 350nm. Isto indica que este se encontra em ambiente mais hidrofóbico, menos exposto ao solvente (VOLOTOVSKII; KONEV, 1967) e fornece indícios da existência da alfa-hélice predita.

**Figura 10** – Espectro de emissão de fluorescência intrínseca da proteína MEG-5.



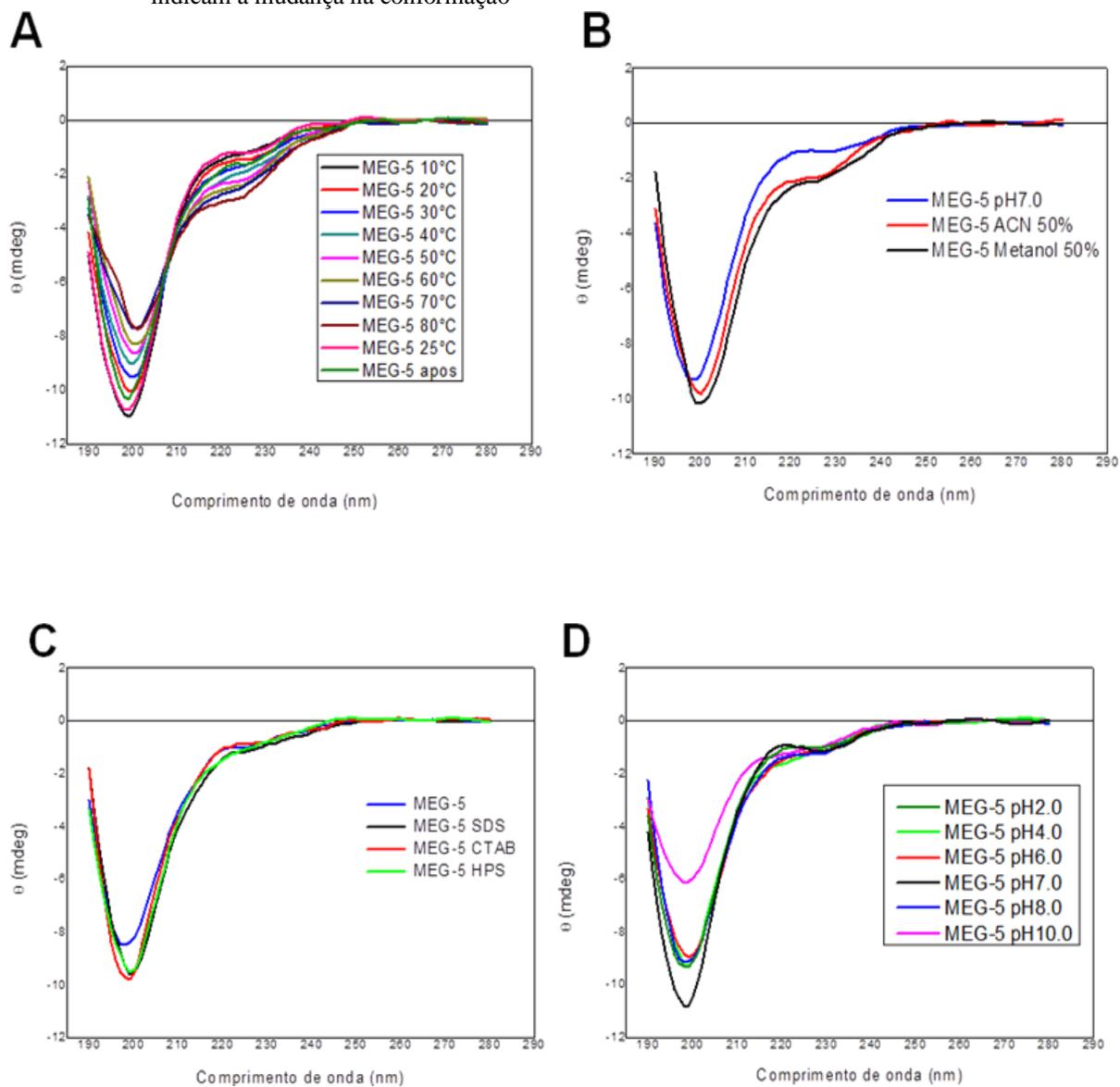
Fonte: Elaborada pela autora.

Foram realizados outros experimentos utilizando medidas de dicroísmo circular, com o intuito de avaliar mudanças estruturais conformacionais da MEG-5 em diferentes temperaturas, pHs, solventes e micelas. Nas diferentes temperaturas, de 10°C a 80°C (medidas feitas com incrementos de 10°C), observou-se um pequeno aumento do pico na região de 220-240nm (figura 11A), o que é sugestivo de um maior ordenamento da proteína com o aumento da temperatura. O mesmo foi observado quando a MEG-5 encontrava-se em soluções contendo solventes orgânicos, tais como 50% metanol ou

50% acetonitrila (ACN) (figura 11B). Já na presença de micelas e diferentes pHs (2 a 10), não observou-se nenhuma mudança detectável no conteúdo de estruturas secundárias, conforme observado nas figuras 11C e D. Apesar de visualmente haver diferença no espectro de pH10, foi verificado que nestes experimentos havia uma concentração menor de proteína em relação aos outros, e ao fazer uma normalização percebemos que estes são idênticos aos outros espectros.

Devido à ação hemolítica já descrita para alguns peptídeos contendo hélices anfipáticas, decidimos testar se MEG-5 apresentava este tipo de ação. Hemácias foram incubadas com diferentes concentrações da proteína (100 $\mu$ M a 0,8 $\mu$ M) e inspecionadas visualmente para verificação de extravasamento de hemoglobina. Todos os ensaios mostraram-se negativos.

**Figura 11-** Análise da conformação estrutural por dicroísmo circular da proteína MEG-5. **A-** Variação da temperatura, 10°C a 80°C e avaliação da estrutura pós o ensaio térmico (MEG-5 25°C- antes da variação e MEG-5 após- após a variação); **B-** MEG-5 em diferentes solventes orgânicos, metanol e ACN; **C-** MEG-5 na presença de micelas (SDS, CTAB e HPS); **D-** Variação do pH, 2 a 10. As setas em preto indicam a mudança na conformação



Fonte: Elaborada pela autora.

## 4.2 Duplo Híbrido

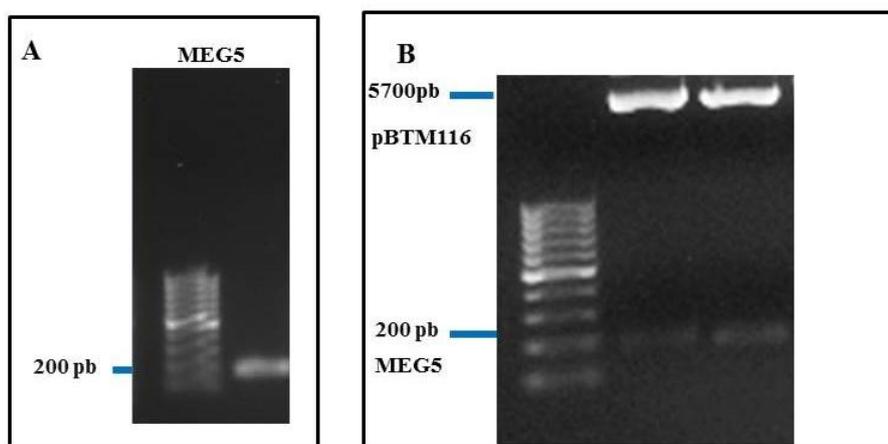
O ensaio de duplo híbrido foi escolhido como o primeiro passo para investigação da existência de interação de proteínas do hospedeiro com proteínas da família de

MEGs de *S. mansoni*, buscando em um futuro próximo, o entendimento melhor da interação parasita/hospedeiro no processo de escape do sistema imune.

Optamos realizar o ensaio com a proteína MEG-5, devido ao fato de já possuímos a mesma produzida em sistema recombinante, facilitando experimentos futuros de validação do ensaio. Utilizamos a proteína MEG-5 como isca, ligada ao domínio de ligação ao DNA LexA e uma biblioteca de cDNA de leucócitos humanos fusionada ao domínio de ligação como presa.

O ensaio iniciou-se com a amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos específicos da MEG-5, desenhados de forma que a sequência pudesse ser inserida no plasmídeo pBTM116. O produto da amplificação foi primeiramente inserido no vetor de propagação pGEM. Após confirmação da identidade dos insertos no sequenciador automático, realizamos uma digestão com endonucleases (*EcoRI* e *SalI*) para retirada da sequência de MEG-5 e posterior clonagem no vetor pBTM116. A figura 12B, demonstra a análise de restrição, em que obtivemos clones contendo uma banda de aproximadamente 220pb que corresponde ao amplicon da MEG-5.

**Figura 12-** Eletroforese em gel de agarose 0.8% para o ensaio de duplo híbrido. **A-** Amplificação por PCR do gene MEG5 **B-** Análise de restrição dos plasmídeos MEG5pBTM116. Os traços em azul indicam as bandas específicas dos genes e o tamanho esperado.

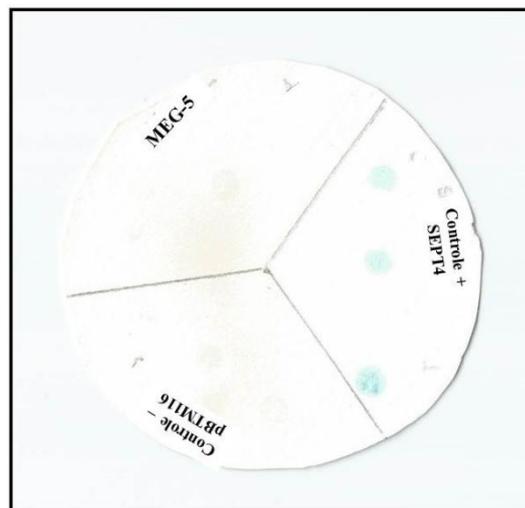


Fonte: Elaborada pela autora.

Verificado a clonagem de forma correta, a construção pBTM116MEG-5 foi transformada em levedura *S. cerevisiae* cepa L40 em meio seletivo ausente de triptofano, pois o pBMT116 é auxotrófico para este aminoácido.

Com o intuito de avaliar o potencial de falso-positivos, realizamos o teste de autoativação, por meio do ensaio de  $\beta$ -galactosidase, com o objetivo de verificar se a MEG-5pBTM116 (DBD) não atua isoladamente como um domínio de ligação e ativa a transcrição dos genes repórteres *LacZ*. Para isso foram selecionadas 3 colônias isoladas de L40 contendo a construção MEG-5pBTM116, SEPT4pBTM116 como controle positivo e pBTM116 vazio como controle negativo. Como observado na figura 13, a construção MEG-5pBTM116 não autoativa o sistema.

**Figura 13** - Ensaio da  $\beta$ -galactosidase - Teste de autoativação para a construção MEG-5pBTM116, confirmando que a construção não auto-ativa o sistema, realizado na levedura L40. O controle positivo (+) SEPT4pBTM116, colônias azuis; e o controle negativo (-) pBTM116.



Fonte: Elaborada pela autora.

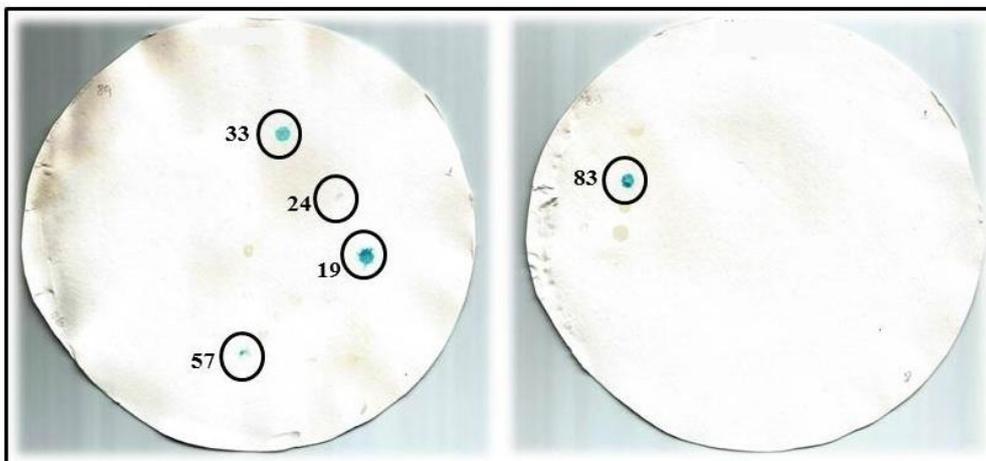
Com a finalidade de analisar e evitar escapes de expressão do gene repórter *HIS*, realizamos o teste do 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) que é um inibidor do produto do gene *HIS3*. O teste nos possibilita delimitar a quantidade mínima do competidor

necessária para inibir o crescimento de escapes, mas sem comprometer o crescimento das leveduras. No teste com a nossa construção de MEG-5pBTM116 não foi necessário adicionar o 3-AT ao meio de cultura.

Após a confirmação que nossa construção não autoativa o sistema que não há a necessidade de adicionar um competidor ao meio, podemos dar continuidade ao ensaio. O próximo passo foi o *screening* da biblioteca, para isso realizamos a transformação em larga escala na L40 contendo MEG-5pBTM116 e a biblioteca de cDNA de leucócito humano em meio de cultura sem histidina, leucina e tripofano (SD-WLH). O crescimento das colônias foram monitorados durante 7 dias , resultando em um total de 330 colônia que possuíam tamanhos aproximados de 2mm.

As colônias selecionadas foram repicadas no mesmo meio (SD-WLH) e monitoradas por 5 dias. Após este período, realizamos novamente o ensaio de  $\beta$ -galactosidase em papel filtro, para avaliação da expressão do gene reporter *LacZ*, que seria correlacionada a interação entre proteínas. Apresentaram-se positivas apenas 5 das 330 colônias (figura 14), estas foram transferidas para o meio SD-L com o propósito de extrair o DNA plasmidial da levedura. Neste processo o interesse é isolar apenas a presa, por tanto, promovemos a perda da isca MEG-5pBTM116 pela levedura inserindo ao meio de cultura o triptofano (SD-L). Este processo é possível, pois as leveduras são auxotróficas para este aminoácido sendo o gene de síntese para este aminoácido a marca de seleção deste plasmídeo.

**Figura 14** - Ensaio de  $\beta$ -galactosidase para as colônias transformadas com MEG-5pBMT116 e biblioteca de cDNA de leucócitos humanos na levedura L40. Os círculos e os números destacam as colônias positiva.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os DNAs extraídos da levedura foram transformados por choque térmico em células de bactéria *E.coli* cepa DH5 $\alpha$ . A transformação em bactéria é necessária devido ao fato de que a quantidade de DNA extraída da levedura é muito baixa, inviabilizando o sequenciamento. Foram escolhidos dois cones de cada colônia positiva, extraído o DNA e mandado para o sequenciamento automático.

Com a obtenção das sequência de cinco dos obtidos clones foi realizada o alinhamento com banco de dados de sequências do *GenBank* utilizando o programa BLASTn e a análise das sequências a fim de determinar se a mensagem encontrava-se no mesmo quadro de leitura LexA. Após esta análise foi determinado que apenas 2 clones codificavam proteínas que se encontravam dentro do mesmo quadro de leitura de LexA e portanto seriam possíveis candidatos a interação (tabela 5).

Para validação da interação destes 2 clones, realizamos a cotransformação destes clones em L40 com MEG-5pBTM116. Além disso, um segundo conjunto de experimentos no qual estes clones eram cotransformados com o plasmídeo pBTM116

vazio foi realizado, a fim de verificar se estes clones por si só não eram capazes de ativar a transcrição dos genes repórteres. As bactérias transformadas foram submetidas ao teste de 3-AT em meio sem histidina e foi possível verificar que as colônia contendo os plasmídeos de dois destes clones juntamente com o plasmídeo de MEG-5 cresceram em 7mM de 3-AT, demonstrando uma relativa força na interação. Também foi realizado o ensaio de  $\beta$ -galactosidase, e novamente estas colônias ficaram azuis. Para estes dois clones os experimentos controle demonstraram que individualmente eles não eram capazes de ativar o sistema, confirmando que o resultado obtido deve-se a interação dos mesmos com a proteína MEG-5.

Após a eliminação de falsos positivos deste ensaio, chegamos a dois possíveis parceiros, a Hexoquinase (D-hexose 6-phosphotransferase) e a CHMP1B (Charged Multivesicular Body protein 1b) demonstradas na tabela 5.

**Tabela 5** – Candidatas a possíveis parceiros protéicos da MEG-5.

Colônias positivas	Em fase	Proteína identificada	Número de identificação no NCBI
19	Sim	<i>D-hexose 6-phosphotransferase</i>	<u>GB AAC50422.1</u>
24	Não	-----	
33	Não	-----	
57	Não	-----	
83	Sim	<i>Charged Multivesicular Body protein 1b</i>	<u>NP_065145.2</u>

Fonte: Elaborada pela autora.

A proteína D- hexose 6-phosphotransferase são catalisadoras da primeira etapa no metabolismo da glicose, ou seja, auxiliam o transporte de glicose para dentro da célula, sendo expressas em baixos níveis em leucócitos (WYAATT et al., 2010).

A outra proteína que demonstrou possível interação a CHMP1B está fortemente relacionada a implicações da formação do corpo multivesicular (MVB) e no ciclo celular. As funções do MVB, são uma série de importantes processos biológicos, como receptor infraregulação (regulam a sinalização, diminuindo ou cessando a estimulação da resposta imune, para que ela atue de forma adequada), comunicação com o meio intracelular, o desenvolvimento celular e a no processo de apresentação de antígenos (MURK et al., 2002; KATZAMANN et al., 2012; GRUENBERG et al., 2004; GASSART et al., 2004). Por estes motivos, vemos a proteína CHMP1B como uma interessante candidata, pois uma possível interferência no sistema de apresentação de antígenos em células do sistema imune teria o potencial de auxiliar o processo de infecção.

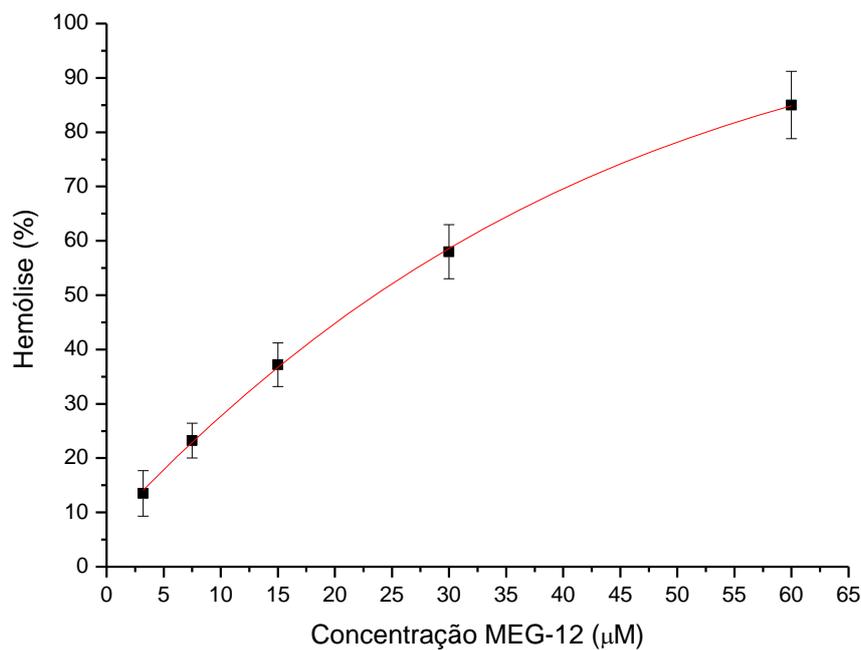
Devido a presença de uma hélice anfipática na região C-terminal de MEG-5 podemos especular que ela poderia estar ancorada na membrana da vesícula onde estaria ocorrendo esta interação CHMP1B. Em um duplo híbrido realizado pelo grupo de pesquisa, em que se buscava parceiros para a MEG-14 utilizando a mesma biblioteca de leucócitos humanos, verificou-se interação com a proteína CC2D1A, a qual recentemente foi comprovada pela técnica de SPR (*Surface Plasmon Resonance*). A CC2D1A é uma proteína envolvida em múltiplas funções como fator de regulação do ESCRT-III CHMP4B (MARTINELLI et al., 2012), família pela qual a CHMP1B faz parte. Portanto estas interações podem estar ocorrendo juntas e serem fundamentais na modulação da atuação destas proteínas ocasionando uma possível perda de função, para isto é necessário a realização de estudos mais detalhados.



romper e/ou permeabilizar membranas, podendo também solubilizar proteínas nela presente (LE MAIRE et al., 2000; HANCOCK; ROZEK, 2002). Partindo desta informação, realizamos experimentos para averiguar se o peptídeo tinha esta mesma ação.

Primeiramente realizamos um ensaio hemolítico com diluição seriada partindo de 60 $\mu$ M a 3,7  $\mu$ M incubada a 37°C por 90 minutos. Constatamos que este peptídeo possui atividade hemolítica, pois quando realizamos a leitura do sobrenadante verificamos que com 60 $\mu$ M da MEG-12 havia lisado 72% dos eritrócitos. Observamos também, que quando diminuimos a concentração do peptídeo a porcentagem de lise diminuía, como representado na figura 16.

**Figura 16-** Gráfico representativo da diluição seriada do peptídeo MEG-12. Relação entre a porcentagem de eritrócito lisado e a concentração do peptídeo.

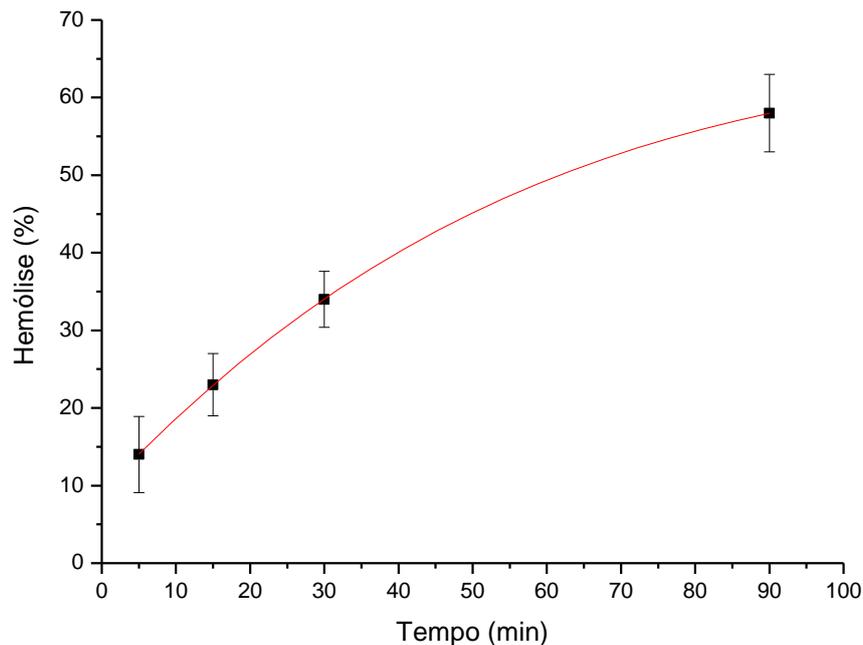


Fonte: Elaborada pela autora.

Foram realizados experimentos com incubações de 5, 15, 30 e 90 minutos mantendo a concentração a 30 $\mu$ M a 37°C, a fim de verificar se a lise observada era

dependente do tempo de incubação. Como podemos observar na figura 17, a porcentagem de eritrócitos rompidos é proporcional ao tempo de incubação, sugerindo um mecanismo gradual de lise.

**Figura 17** - Gráfico representativo da porcentagem de eritrócito lisado em relação ao tempo de incubação. A concentração foi fixada 30 $\mu$ M do peptídeo MEG-12.

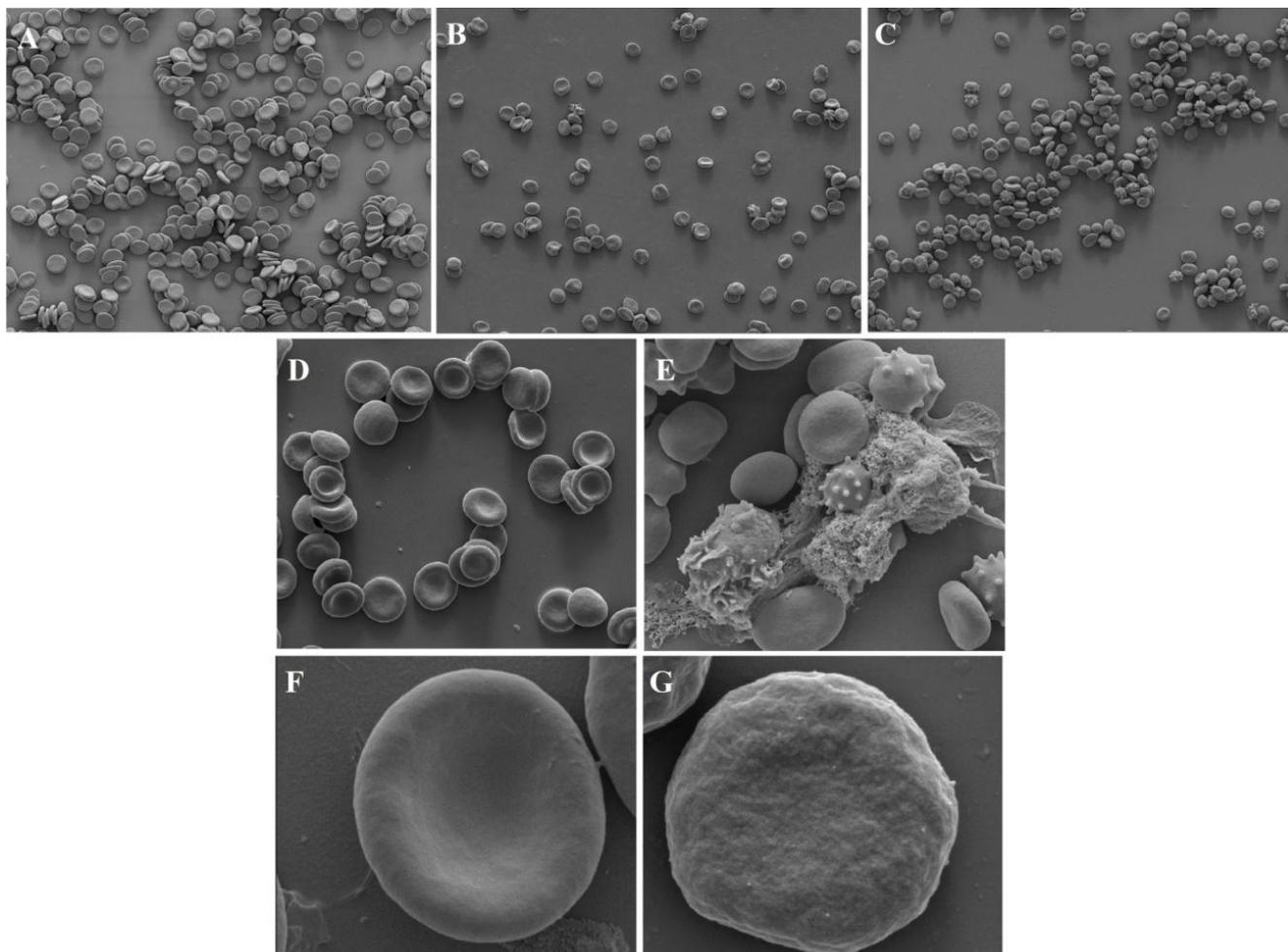


Fonte: Elaborada pela autora.

Foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura de amostras em 5, 30 e 90 minutos de incubação com a 60 $\mu$ M de MEG-12 e uma amostra controle sem adição do peptídeo. A figura 18A representa o controle negativo (ausência de MEG-12), em que os eritrócitos encontram-se com fisionomia e características dentro dos padrões, diferentemente quando observamos as figuras 18B e C, os eritrócitos mudam de conformação na presença de MEG-12, apresentando um formato espiculado, denominada na literatura como acantócitos ou equinócitos. O impressionante é que tal mudança é observada após 5 minutos de incubação com o peptídeo (figura 18B) e com

o passar do tempo aumenta o número de eritrócito com esta perturbação (figura 18C). Na figura 18G a perturbação fica nítida, com a mudança no aspecto da superfície da célula quando comparada com o controle negativo (figura 18F). Observa-se a presença de restos celulares em amostras não centrifugadas (figura 18E). Os acantócitos ou equinócitos são eritrócitos contraídos com múltiplas projeções espiculadas e decorrem de alterações na membrana celular dos mesmos, a ocorrência deste fenômeno pode ser identificado como uma característica de proteção do esqueleto de eritrócitos mantendo a estabilidade mecânica, visto que a membrana destes possui uma propriedade elástica, podendo ser reversível (BOSMAN; DE FRANCESCHI, 2008; SUWALSKY; AVELLO, 2014).

**Figura 18** –Microscopia eletrônica de varredura (MEV). **A-** Controle negativo. Eritrócitos sem a presença do peptídeo incubados por 90 minutos. **B-** Eritrócitos na presença de MEG-12 incubados por 5 minutos; **C-** Eritrócito na presença de MEG-12 incubados por 30 minutos. As três primeiras imagens são uma visão panorâmica. **D-** Controle negativo sem o processo de centrifugação; **E-** Eritrócito na presença de MEG-12 incubado por 90 minutos sem o processo de centrifugação; **F-** Controle negativo; **G-** Eritrócito na presença de MEG-12 incubados por 5 minutos.



Fonte: Elaborada pela autora.

Por meio de uma localização por WISH do peptídeo MEG-12 realizada no Instituto Butantã, verificou que este é secretado no esôfago de *S. mansoni*. Estudo realizado por Li *et al.*, 2013, relata que a hemólise já ocorre no esôfago posterior e é um processo rápido, provocando o extravasamento da hemoglobina após 4 a 5 segundos. Portanto o local de produção do peptídeo MEG-12 é perfeitamente compatível com uma possível função relacionada à alimentação, mais especificamente na digestão dos

eritrócitos. O fato do MEG-12 ser secretado e a presunção que a digestão do *Schistosoma* é predominantemente extracelular (HALL et al., 2011) fortalecem nossa hipótese da função.

A degradação de proteínas do sangue do hospedeiro desencadeia a maturação do parasita para a forma adulta, o qual é um processo chave para o estabelecimento e manutenção da infecção, caracterizada pela produção de ovos e transmissão da doença. Machos adultos de *S. mansoni* ingerem dezenas de milhares de eritrócitos por hora, nas fêmeas, por necessitarem de nutrição adicional para a produção dos ovos, ingerem ainda mais, centenas de milhares por hora (LAWRENCE, 1973; DELCROIX et al., 2006). Portanto, proteínas da glândula de esôfago tornam-se atraentes candidatas vacinais por elas serem secretadas em espaço restrito e mediarem os principais aspectos do processo de alimentação (LI et al., 2013).

# Conclusões

---

## 5. Conclusões

Este trabalho apresentou contribuições para elucidação da função dos produtos protéicos derivados de genes de *micro-exon* de *S. mansoni*. Devido ao fato destas proteínas não possuírem similaridade com nenhuma outra proteína fora do gênero *Schistosoma*, a dedução de suas funções não é trivial.

A proteína MEG-5 apresentou resultados de duplo híbrido que sugerem sua interação com duas proteínas de leucócitos. A proteína CHMP1B foi a que mais nos chamou atenção, por fazer parte da formação do corpo vesicular, fato importante devido a MEG-5 possivelmente apresentar uma hélice anfipática na região C-terminal que pode estar ancorada nestas vesículas interagindo com esta proteína. Outro ponto importante é que a CHMP1B está relacionada aos processos de apresentação de antígenos. Tal interação se comprovada pode nos possibilitar o melhor entendimento da modulação do sistema imune.

O produto protéico da MEG-12 apresenta uma hélice anfipática com características semelhantes aquelas observadas em peptídeos antimicrobianos. Devido a isso se esperava que este peptídeo pudesse interagir com membranas celulares e possivelmente apresentar atividade lítica. Tal fato foi verificado inicialmente por ensaios hemolíticos, onde constatou-se sua ação hemolítica, e posteriormente pelas imagens MEV, demonstrando a perturbação na membrana até a lise total do eritrócito. Devido a produção de MEG-12 no esôfago do verme adulto de *S. mansoni*, espera-se que tal atividade possa estar relacionada a lise de eritrócitos no sistema digestivo do parasita. A descoberta desta possível função torna a MEG-12 um candidato atraente para criação de novas drogas ou vacinas, em que uma possível inibição desta provocaria ineficiência e prejuízos na nutrição do verme, podendo resultar na morte do parasita.

# Referências

---

## 6. Referências

Berriman M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**. v. 460, n.7253, p. 352-8, 2009.

Bogitsh B. J.; Carter O. S. *Schistosoma mansoni*: ultrastructural studies on the esophageal secretory granules. **J Parasitol**, v.63, p. 681–686, 1977.

Bosman G. J.; De Franceschi L. Neuroacanthocytosis-related changes in erythrocyte membrane organization and function. *Neuroacanthocytosis Syndromes II*. **Springer Verlag**, p. 133–42, 2008.

Chou P. Y.; Fasman G. D. Prediction of protein conformation. **Biochemistry**. v. 13, n.2, p. 222–245, 1974.

Cole C.; Barber J. D.; Barton G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Res**. v. 36, n.1, p. 197-201, 2008.

Das S.; Mukhopadhyay D. Intrinsically unstructured proteins and neurodegenerative diseases: conformational promiscuity at its best. **IUBMB Life**, v. 63 n. 7, p. 478-88, 2011.

DeMarco R. et al. Protein Variation In Blood-Dwelling Schistosome Worms Generated By Differential splicing of micro-exon gene transcripts. **Genome Res**. v.20, n.8, p. 1112-1121, 2010.

Delcroix M. et al. A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite. **J Biol Chem**, v.281, n.51, p. 39316-29, 2006.

El-Cheikh M. C.; Dutra H. S.; Minóprio P.; Borojevic R. Increase of B-lymphocyte number and activity during experimental murine schistosomiasis mansoni. **Braz J Med Biol Res.** v.27, n.7, p. 1605-1617, 1994.

Gassart A. et al. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? **Traffic**, v. 5, n. 11, p. 896–903, 2004.

Gasteiger E.; Hoogland C.; Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The Proteomics Protocols Handbook*. **Humana Press**, p. 571–607, 2005.

Gautier R. et al. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties. **Bioinformatics**, v. 15, n. 24(18), p.2101-2, 2008.

Geourjon, C.; Deléage, G. 1995. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. **Cabios**, v.11,n. 6, p. 681-684, 1995.

Gruenberg, J.; Stenmark, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 5, n.4, p. 317–323, 2004.

Hall J. SUMO Gene Fusion Technology - New Methods For Enhancing Protein Expression and Purification in Prokaryotes. **LifeSensors Inc.** 2004.

Hall S. L. et al. Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 179, n.1, p. 18–29, 2011.

Hancock R. E.; Rozek A. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. **FEMS Microbiol Lett**, v. 10; n.2, p. 143-149, 2002.

Koehler J. W. et al. Aspartic protease activities of schistosomes cleave mammalian hemoglobins in a host-specific manner. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p. 83-85, 2007.

Katzmann, D. J.; Odorizzi, G., Emr, S. D. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**, v. 3, n.12 , p. 893–905, 2002.

Lawrence, J. D. 1973. The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol** v.59, n. 1, p. 60-63 , 1973.

Lees, J. G.; Smith, B. R.; Wallace B. A. 2004. CDtool-anintegratedsoftware package for circular dichroismspectroscopic data processing,analysis, andarchiving. **Anal. Biochem.** v.332, n.2, p. 285-289 , 2004.

Le Maire M., Champeil P., Moller J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochim Biophys Acta Biomembr**, v.1508, n.1-2, p. 86-111, 2000.

Lopes J. L. et al. Folding Factors and Partners for the Intrinsically Disordered Protein Micro-Exon Gene 14 (MEG-14). **Biophysical Journal**. v.104, n.11, p. 2512-2520, 2013.

Li, X-H. et al. The Schistosome Oesophageal Gland: Initiator of Blood Processing. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 2337, 2013.

Lively C. M.; Dybdahl M.F. Parasite adaptation to locally common host genotypes. **Nature**, v.8, n.6787, p. 679-681, 2000.

Martinelli N. et al. CC2D1A Is a Regulator of ESCRT-III CHMP4B. **J. Mol. Biol**, v.419, n.1-2, p. 75-88, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Esquistossomose 2010**. Disponível em: [portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=35752](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=35752). Acesso em: 22 de maio de 2014.

Murk, J. L. et al. The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. **Semin. Cell Dev. Biol**, v.13, n.4, p. 303-311, 2002.

Neves D. P.; Melo A. L.; Vitor R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11<sup>o</sup> ed. São Paulo, p. 193-200, 2004.

Oliveira F. L. et al. Lack of Galectin-3 Disturbs Mesenteric Lymph Node Homeostasis and B Cell Niches in the Course of *Schistosoma mansoni* Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p.19216, 2011.

REY, L.. **Bases da parasitologia médica**. 2<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan p.153 -158, 2002.

Sambrook J.,; Fritish E. F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. 2<sup>o</sup> ed. New York, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1987.

Segrest J. P. et al. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. **J Lipid Res**, v.33, n.2 p. 141-166, 1992..

Sreerama N.; Woody R. W. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal. Biochem**, v.287, n.2, p. 252-260, 2000.

Suwalsky M.; Avello M. Antioxidant Capacity of *Ugni molinae* Fruit Extract on Human Erythrocytes: An In Vitro Study. **J Membrane Biol**, v. 247, n. 8, p. 703-12, 2014.

Van Crielinge W.; Beyaert R. 1999. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. **Biol Proced Online**. v.4, n.2, p. 1-38, 1999.

Van Stokkum, I. H. M.; Spoelder H. J. W.; Groen F. C. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. **Anal. Biochem**, v.191, n.1, p. 110-118, 1990.

Verojoski-Almeida S., DeMarco R. **Genoma contra a esquistossomose, criação de vacina para vencer a resistência a medicamentos**. 28° ed. Rio de Janeiro, Scientific American Brasil, 2004.

Volfovsky N.; Haas B. J.; Salzberg S. L. Computational discovery of internal *micro-exons*. **Genome Res**. v.13, n. 6A, p. 1216-1221, 2003.

Volotovskii I. D.; Konev S.V. Relation between the conformation and UV luminescence of proteins. **Biofizika**, v.12, n.2, p. 200-205, 1967.

Wallace, B. A. Protein characterization by synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. **Q. Rev. Biophys**, v.42, n. 4, p. 317-370, 2009.

Wang X. Y.; Ji C. G.; Zhang J. Z. Exploring the molecular mechanism of stabilization of the adhesion domains of human CD2 by N-glycosylation. **J Phys Chem B**. v.116, n.38, p. 11570-11577, 2012.

Wilson R. A.; Barnes P. E. 1974. The tegument of *Schistosoma mansoni*: observations on the formation, structure and composition of cytoplasmic inclusions in relation to tegument function. **Parasitology** v.68, n.2, p. 239-258, 1974.

WHO- World Health Organization. **Schistosomiasis**. disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. Acesso em: 24 de maio de 2014.

Wyatt E. et al. Regulation and Cytoprotective Role of Hexokinase III. **Rev. PLoS One**, v.5, n.11, p. e13823, 2010.