UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Laís de Lourdes de Lima Bálico

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 03/11/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

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

BÁLICO, LAÍS DE LOURDES DE LIMA.

Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2014. 143 p.: Il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura.

1. *Aspergillus fumigatus*.
2. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo.
3. Mitocôndria.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laís de Lourdes de Lima Bállico

Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Laís de Lourdes de Lima Bállico

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Dedicatória

Dedico esta dissertação à minha irmã, Hysadora, sem você esse sonho nunca teria se tornado realidade. É por você que sempre continuarei! Para sempre nossa estrelinha, saudades e amor eternos!

Agradeço ao apoio incondicional da minha mãe, Teresa, minha irmã, Betina e do meu avô, José Matias que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Ao Ademar, por estar presente em momentos importantes.

Ao meu noivo, Eduardo, agradeço pelo amor, dedicação, companheirismo e pelo incentivo de sempre. Nosso amor é um dos pilares que me sustenta.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Sérgio Akira Uyemura, meus agradecimentos pela paciência, dedicação, confiança, ensinamentos e exemplo de comprometimento com a pesquisa, educação e respeito ao próximo.

À Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Leopoldino, pela ajuda nos experimentos, discussões pertinentes e disponibilidade em diversos momentos.

À Prof^a. Dr^a. Yara Maria Lucisano Valim e à Ana Elisa C. S. Azzolin pela prontidão e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini pela colaboração neste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Nonato e seus pós-graduandos pela atenção e colaboração.

À Prof^a. Dr^a. Taisa Magnani Dinamarco pelas discussões pertinentes.

Ao Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga e à Dr^a. Gabriela Braga, pelas discussões pertinentes e apoio em algumas técnicas.

Às Ms. Fernanda Gomes Cardoso, Dr^a. Renata Vilela e Ms. Silveli Suzuki pela amizade, prontidão e pelo comprometimento com a execução deste trabalho. Obrigado pelos diversos momentos de ensinamento e descontração.

Aos Ms. Émerson S. Santos, Dr. Lucas O. Sousa e João J. Franco pela amizade sincera, discussões, paciência e bons momentos.

Às amigas Karina S. Padovani, Dr^a. Lays M. Sobral e Renata Goto pela amizade sincera, por todos os momentos de aprendizado científico e descontração. Sem o apoio de vocês a realização deste trabalho seria uma tarefa mais árdua.

Aos demais amigos do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP: Dr. Hamilton Gimenes, Alinne Costa, Dr^a. Cristiana Bernadelli, Camila Matsumoto, Maryna Tannous, Antônio Zanardo pela convivência harmoniosa e pelas diversas discussões.

Às Dr^a. Valéria Tudella e Amanda Ouchida pela disponibilidade e pelas discussões que ajudaram durante a execução deste trabalho.

A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela atenção e comprometimento com o ensino.

Ao Henrique Theodoro, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela atenção e dedicação que sempre demonstrou.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia e amigos pós-graduandos de outros programas pela amizade e por todos os momentos de discussão científica e de descontração.

Ao Laboratório de Química de Proteínas do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela realização da técnica de espectrometria de massas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte técnico e financeiro.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

Sumário

SUMÁRIO

Resumo	<i>i</i>
Abstract	<i>ii</i>
Resumen	<i>iii</i>
Lista de figuras	<i>iv</i>
Lista de tabelas	<i>v</i>
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	<i>vi</i>
1. Introdução	1
1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	3
1.2. Características macro e microscópicas.....	3
1.3. Patogênese.....	4
1.4. Função mitocondrial	7
1.5. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo	11
2. Objetivo	15
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Planejamento.....	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Microrganismos.....	18
3.1.1. <i>A. fumigatus</i>	18
3.1.2. Bactérias.....	18
3.1.3. Leveduras	18

3.2.	Extração de DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	19
3.3.	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>).....	20
3.4.	Reação em cadeia da polimerase <i>overlapping</i> (PCR- <i>overlapping</i>)	21
3.5.	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	22
3.6.	Eletroforese em gel de agarose	23
3.7.	Inserção do fragmento obtido em vetor de clonagem	23
3.8.	Preparo de células de <i>E. coli</i> competentes.....	24
3.9.	Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes..	24
3.10.	PCR de colônia	25
3.11.	Inserção do fragmento obtido em vetor de expressão	25
3.12.	Sequenciamento dos clones positivos selecionados.	26
3.13.	Indução em pequena escala do transportador mitocondrial de nicotinamida adeninina dinucleotídeo(Ndt1)em <i>E. coli</i>	27
3.14.	Expressão de Ndt1 em <i>E. coli</i>	28
3.15.	Purificação da proteína Ndt1 dos corpos de inclusão	28
3.16.	SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida	

- dodecil sulfato de sódio)	30
3.17. Coloração por prata	30
3.18. <i>Western Blotting</i>	31
3.19. Espectrometria de massas	32
3.20. Determinação da concentração de proteína (método de BCA)	33
3.21. Animais e obtenção do soro imune	34
3.22. Imunodifusão radial dupla	34
3.23. Purificação do soro imune para obtenção de imunoglobulinas G (IgG).....	35
3.24. Clonagem em vetor pYES2	36
3.25. Inserção do fragmento em vetor de clonagem.....	37
3.26. Inserção do fragmento em vetor de expressão para eucarioto.....	38
3.27. Sequenciamento dos clones positivos selecionados	39
3.28. Preparo de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes e transformação	39
3.29. Extração de DNA genômico dos clones selecionados.....	40
3.30. Indução da expressão de Ndt1 recombinante em <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	41
3.31. Avaliação da taxa de crescimento das cepas de <i>S.</i>	

<i>cerevisiae</i>	41
3.32. Produção de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> e isolamento de mitocôndrias	42
3.33. Determinação do potencial de membrana mitocondrial	43
3.34 Determinação do transporte de NAD ⁺	44
3.35. Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em esferoplastos de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	45
3.36. Determinação de proteínas carboniladas	46
3.37. Análise estatística.....	47
3.38. Microscopia confocal	47
4. Resultados	49
4.1. Sequenciamento do gene <i>ndt1</i> de <i>A. fumigatus</i>	50
4.2. Extração e isolamento do DNA genômico de <i>A.</i> <i>fumigatus</i>	52
4.3. Padronização da temperatura de anelamento dos <i>primers</i>	53
4.4. PCR- <i>overlapping</i>	54
4.5. Indução em pequena escala de Ndt1 em <i>E. coli</i>	60
4.6. Purificação da proteína recombinante Ndt1 dos corpos de inclusão	63

4.7.	Produção e purificação do anticorpo anti-Ndt1.....	66
4.8.	Clonagem em vetor pYES2	68
4.9.	Extração do DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i> e PCR..	73
4.10.	Indução da expressão da proteína recombinante Ndt1 e avaliação da taxa de crescimento das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	75
4.11.	Determinação do potencial de membrana mitocondrial	78
4.12.	Determinação do transporte de NAD ⁺	80
4.13.	Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	81
4.14.	Determinação de proteínas carboniladas	82
4.15.	Microscopia confocal	84
5.	Discussão	89
5.1.	Expressão heteróloga da proteína recombinante Ndt1 em <i>E. coli</i>	90
5.2.	Expressão heteróloga da proteína recombinante Ndt1 em <i>S. cerevisiae</i>	95
5.3.	Caracterização bioquímica da proteína recombinante Ndt1	97

6. Conclusão	105
7. Referências Bibliográficas.....	107
8. Apêndices	125
8.1. Meios de cultivo.....	126
8.1.1. YG.....	126
8.1.2. LB (Lúria Bertani).....	126
8.1.3. SOC.....	126
8.1.4. TB.....	127
8.1.5. YPD	127
8.1.6. SC	128
8.2. Soluções, tampões e reagentes.....	128
8.2.1. Tampão salina fosfato (PBS).....	128
8.2.2. Tampão de extração de DNA de <i>A. fumigatus</i>	129
8.2.3. Tampão de extração de DNA de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	129
8.2.4. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE).....	129
8.2.5. Tampão de amostra para DNA.....	129
8.2.6. Tampão de Lise.....	130
8.2.7. Tampão de Ressuspensão	130
8.2.8. Tampão de Lavagem.....	130
8.2.9. Tampão de Desnaturação	131
8.2.10. Tampão D (para diálise).....	131

8.2.11	Tampão de amostra para SDS-PAGE	131
8.2.12.	SDS-PAGE.....	132
8.2.13.	Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3....	132
8.2.14.	Solução de <i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	132
8.2.15.	Solução 1 (coloração por prata).....	133
8.2.16.	Solução 2 (coloração por prata).....	133
8.2.17.	Solução 3 (coloração por prata).....	133
8.2.18.	Solução 4 (coloração por prata).....	133
8.2.19.	Solução 5 (coloração por prata).....	133
8.2.20.	Tampão de transferência	133
8.2.21.	TBS-T.....	134
8.2.22.	Solução descorante	134
8.2.23.	Solução fixadora (para espectrometria de massas).....	134
8.2.24.	Solução de lavagem (para espectrometria de massas)	134
8.2.25.	Tampão Tris-EDTA (TE)	134
8.2.26.	Tampão TE/LiAc	134
8.2.27.	Tampão TE/LiAc/PEG 3350 40%	135
8.2.28.	Tampão de pré-incubação para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	135

8.2.29.	Tampão de digestão para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	135
8.2.30.	Tampão de lise para esferoplastos de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	136
8.2.31.	Tampão de ressuspensão para mitocôndrias de <i>S. cerevisiae</i>	136
8.2.32.	Tampão de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> .	136
8.2.33.	Meio de reação para determinação do potencial de membrana e transporte de NAD ⁺	137
8.2.34.	Tampão de lise para extração de proteínas de <i>S. cerevisiae</i>	137
8.3.	Espectros de fluorescência	138
9.	Anexos	140
9.1.	Mapas de Vetores	141
9.2.	Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais .	143

Resumo

BÁLICO, L.L.L. **Caracterização molecular e bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeos de *Aspergillus fumigatus*.** 2014. 143 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico e tornou-se um dos principais agente patogênico oportunista em pacientes imunossuprimidos. Estudos prévios em nosso laboratório foi demonstrado que em mitocôndrias de *P. brasiliensis* e de *A. fumigatus*, o NAD⁺ era capaz de induzir a formação de potencial de membrana mitocondrial, o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de NAD⁺/NADH, conforme havia sido descrito em *S. cerevisiae*. Através de ferramentas de bioinformática, foi identificado no *Aspergillus Gene Database*, uma sequência com 32% de identidade com o gene *ndt1p* de *S. cerevisiae*. A sequência de cDNA, contendo 1.194 pb foi obtida usando *PCR-Overlapping* e clonada em vetor pGEM®-T Easy. Em seguida, a sequência foi subclonada em vetor de expressão pET28-a(+) e expressa em *E. coli* BL21(DE3). A proteína recombinante foi purificada a partir dos corpos de inclusão e sua identidade confirmada por espectrometria de massas e por *Western Blotting* usando anticorpo anti-His-tag. A proteína recombinante foi utilizada para produção de anticorpo policlonal anti-Ndt1 em coelho. Para expressão em levedura, o cDNA do gene *ndt1* de *A. fumigatus* foi subclonado em vetor pYES2 e as leveduras *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ foram transformadas. Foi realizada a curva de crescimento e indução da expressão da proteína recombinante Ndt1, a presença da proteína foi detectada utilizando anticorpo policlonal anti-Ndt1 após 16 horas de expressão. Nesse período foi verificado que as leveduras estavam em fase de crescimento exponencial. A cepa duplo mutante apresenta uma taxa de crescimento menor quando comparada com a cepa expressando a proteína recombinante quando crescidas em meio fermentável. As mitocôndrias isoladas de ambas as cepas foram submetidas à medida do potencial de membrana onde apresentavam acoplamento entre a oxidação de substratos e a fosforilação oxidativa. Além disso, ficou evidenciado que na cepa expressando a proteína recombinante, NAD⁺ induziu a formação de um potencial de membrana maior que na cepa controle. O transporte de NAD⁺ foi realizado e demonstrou que a cepa expressando a proteína Ndt1 tinha um aumento na fluorescência de NADH, mostrando que NAD⁺ foi capaz de entrar na matriz mitocondrial e posteriormente ser reduzido a NADH por enzimas da matriz mitocondrial. A determinação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada utilizando as sondas fluorescentes CM-H₂DCFDA e *MitoSox Red* em esferoplastos da levedura *S. cerevisiae*. Ambos experimentos não houve diferença significativa entre a cepa expressando a proteína Ndt1 e a cepa controle. As proteínas carboniladas foram determinadas utilizando anticorpo anti-DNP, após a reação com dinitrofenilhidrazona e não há diferença significativa entre as cepas. Finalmente, para confirmação da localização celular da proteína Ndt1, os esferoplastos de *S. cerevisiae* foram submetidos à microscopia confocal, onde ficou evidenciado a co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias na cepa de *S. cerevisiae* transformada com a construção *pYES/ndt1*, o mesmo perfil não foi observado na cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$.

Palavras-chaves: *Aspergillus fumigatus*; transportador de nicotinamida adenina dinucleotídeo; mitocôndria; *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

BÁLICO, L.L.L. **Molecular and biochemical characterization of a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide carrier of *Aspergillus fumigatus***. 2014. 143 f. Thesis (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The *A. fumigatus* is a saprophytic fungus and is a major opportunistic pathogen in immunosuppressed patients. Previous studies in our lab has showed that mitochondrias of the *P. brasiliensis* and *A. fumigatus*, NAD^+ is able to induce the formation of mitochondrial membrane potential, which could be dissipated by FCCP, suggesting the presence of a NAD^+/NADH carrier as described in *S. cerevisiae*. Using bioinformatics tools, it was identified in *Aspergillus* Gene database a sequence containing 32% of identity with the gene *ndt1p* of *S. cerevisiae*. A fragment of cDNA was obtained from the *ndt1p* mRNA sequence, containing 1194 bp by using PCR-overlapping and cloned in *pGEM[®]-T Easy* vector. Then, the sequence was subcloned in pET28-a(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein was purified from inclusion bodies and the identity confirmed by mass spectrometry and by Western Blotting using anti-His-tag antibody. The recombinant protein was used to produce polyclonal antibody anti-Ndt1 in rabbit. For expression in yeast, the *ndt1* cDNA of *A. fumigatus* was subcloned into pYES2 vector and the yeast *S. cerevisiae* $\Delta\text{ndt1}\Delta\text{ndt2}$ were transformed. Growth curve and induction of the recombinant protein expression Ndt1 was performed and the protein was detected using a polyclonal anti-Ndt1 antibody after 16 hours of expression. During this period it was found that the yeast were in exponential growth phase. The double mutant strain shows a slower growth rate compared to the strain expressing the recombinant protein growth rate when grown in fermentable medium. The isolated mitochondria from both strains were subjected to measurement of the membrane potential which showed coupling between substrate oxidation and oxidative phosphorylation. Furthermore, these measurements evidenced that the strain expressing the recombinant protein NAD^+ induced the formation of a membrane potential larger than the control strain. The transport NAD^+ was evaluated and showed that the strain expressing the protein Ndt1 has an increase in NADH fluorescence, indicating that NAD^+ was able to enter into the mitochondrial matrix and then reduced to NADH by enzymes from the matrix. The determination of the production of reactive oxygen species was performed using the fluorescent probe CM- H_2DCFDA and *MitoSox Red* in spheroplasts of the yeast *S. cerevisiae*. Both experiments showed no significant difference between the strain expressing Ndt1 protein and strain control. The carbonylated proteins levels were checked using anti-DNP, after the reaction with dinitrophenylhydrazine and there is no significant difference between the strains. Finally, to confirm the cellular localization of the protein Ndt1, spheroplasts of *S. cerevisiae* were subjected to confocal microscopy, which evidenced the co-location of Ndt1 protein with mitochondria in *S. cerevisiae* strain transformed with the construction *pYES/ndt1*. This same profile was not observed in strain $\Delta\text{ndt1}\Delta\text{ndt2}$.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*; nicotinamide adenine dinucleotide carrier; mitochondria; *Saccharomyces cerevisiae*.

Resumen

BÁLICO, L.L.L. **Caracterización molecular y bioquímica de un portador mitocondrial nicotinamida adenina dinucleotido del *Aspergillus fumigatus*.** 2014. 143 f. Tesis (MS). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

El *A. fumigatus* es un hongo saprofita y se convirtió en un importante patógeno oportunista en pacientes inmunodeprimidos. Estudios previos en nuestro laboratorio se observó que las mitocondrias de *P. brasiliensis* y *A. fumigatus*, NAD^+ induce la formación de potencial de membrana mitocondrial, lo que podría ser disipada por FCCP, lo que sugiere la presencia de un portador de NAD^+/NADH como había sido descrito en *S. cerevisiae*. Con el uso de herramientas bioinformáticas, se identificó en *Aspergillus Gene Database* una secuencia con 32% de identidad con el gen *ndt1p* de *S. cerevisiae*. Una secuencia de cDNA que contiene 1194 pb se obtuvo mediante el uso de PCR-overlapping y se clonó en el vector pGEM®-T Easy. Entonces, la secuencia se subclonó en el vector pET28-a(+) expresión y se expresó en *E. coli* BL21 (DE3). La proteína recombinante se purificó a partir de cuerpos de inclusión y la identidad confirmada por espectrometría de masas y por Western Blotting utilizando el anticuerpo anti-His-tag. La proteína recombinante se utilizó para producir anticuerpos policlonales anti-Ndt1 en conejo. Para la expresión en levadura, el cDNA de *ndt1* del *A. fumigatus* se subclonó en vector pYES2 y se transformaron la levadura *S. cerevisiae* $\Delta\text{ndt1}\Delta\text{ndt2}$. Se realizó la curva de crecimiento y la inducción de la expresión de la proteína recombinante Ndt1, la proteína se detectó utilizando un anticuerpo policlonal anti-Ndt1 después de 16 horas de expresión. Durante este período se encontró que las levaduras estaban en fase de crecimiento exponencial. La tasa de crecimiento se realizó en medio de fermentación, y la cepa doble mutante mostro una tasa de crecimiento más lento en comparación con la cepa que expresa la proteína recombinante. La mitocondria aislada de ambas cepas se sometieron a la medición del potencial de membrana que mostró el acoplamiento entre la oxidación del sustrato y la fosforilación oxidativa, además, pone de manifiesto que la cepa que expresa la proteína recombinante NAD^+ indujo la formación de un potencial de membrana mayor que la cepa de control. El NAD^+ se realizó el transporte y mostró que la cepa que expresa la proteína Ndt1 tenía un aumento en la fluorescencia de NADH, lo que indica que NAD^+ era capaz de entrar en la matriz mitocondrial y luego ser reducido a NADH por enzimas de la matriz. La determinación de la producción de especies reactivas del oxígeno se realizó utilizando la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA y MitoSOX Red en esferoplastos de la levadura *S. cerevisiae* en ambos experimentos ninguna diferencia significativa entre la cepa que expresa la proteína Ndt1 y el control de la tensión. Las proteínas carboniladas se determinaron utilizando anti-DNP, después de la reacción con dinitrofenilhidrazona y no hay diferencia significativa entre las cepas. Finalmente, para confirmar la localización celular de la proteína Ndt1, esferoplastos de *S. cerevisiae* se sometieron a microscopía confocal, que evidenció la co-localización de la proteína Ndt1 con mitocondrias en la cepa de *S. cerevisiae* transformada con la construcción *pYES/Ndt1*, el mismo perfil no se observó en la cepa $\Delta\text{ndt1}\Delta\text{ndt2}$.

Palabras clave: *Aspergillus fumigatus*; portador nicotinamida adenina dinucleotido; mitocôndrias; *Saccharomyces cerevisiae*.

Lísta de figuras

Lista de Figuras

Fig. 1:	Cadeia de transporte de elétrons clássica e alternativa	8
Fig. 2:	Esquema da PCR- <i>overlapping</i>	21
Fig. 3:	Alinhamento das sequências de DNA genômico, do RNAm do gene de <i>A. fumigatus</i> depositados e o cDNA sequenciado.....	50
Fig. 4:	DNA genômico de <i>A. fumigatus</i>	52
Fig. 5:	Produtos de PCR obtidos com a amplificação do gene <i>ndt1</i>	53
Fig. 6:	Produtos de PCR obtidos com a amplificação do gene <i>ndt1</i> previamente clonado	54
Fig. 7:	Produtos de PCR obtidos com a amplificação de cada fragmento do gene <i>ndt1</i>	55
Fig. 8:	Produtos da reação de PCR- <i>overlapping</i> do gene <i>ndt1</i>	56
Fig. 9:	Produtos de PCR de colônia com a construção pGEM/ <i>ndt1</i>	57
Fig. 10:	Produtos da digestão com <i>BamHI</i> e <i>NotI</i>	58
Fig. 11:	Produto da PCR de colônia com a construção pET28/ <i>ndt1</i>	59
Fig. 12:	Digestão dos clones 3, 9 e 15, respectivamente.	60
Fig. 13:	Expressão em pequena escala da proteína recombinante Ndt1.	61
Fig. 14:	Teste de solubilidade da proteína recombinante Ndt1, com as temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C...	62

Fig. 15:	Purificação da proteína recombinante Ndt1 dos corpos de inclusão	63
Fig. 16:	Proteína recombinante Ndt1 purificada	64
Fig. 17:	<i>Western Blotting</i> da proteína recombinante Ndt1 purificada	65
Fig. 18:	Imunodifusão utilizando anticorpo diluído e antígeno não diluído	66
Fig. 19:	Imunodifusão utilizando anticorpo não diluído e antígeno diluído	67
Fig. 20:	Gráfico com as frações cromatográficas eluídas da coluna cromatográfica	67
Fig. 21:	<i>Western Blotting</i> utilizando anticorpo anti-Ndt1 purificado na diluição 1:20000	68
Fig. 22:	Produto de PCR com os <i>primers</i> para o vetor pYES2.....	69
Fig. 23:	Produto da PCR de colônia da construção pGEM/ndt1 para pYES2	70
Fig. 24-A:	Produtos da digestão do DNA plasmidial com <i>BamHI</i> e <i>NotI</i>	71
Fig. 24-B:	Vetor pYES2 digerido com <i>BamHI</i> e <i>NotI</i>	71
Fig. 25:	Produtos da PCR de colônia da construção pYES2/ndt1	72
Fig. 26:	Produtos da digestão com <i>BamHI</i> e <i>NotI</i>	73
Fig. 27:	Produtos de PCR obtidos com amplificação do gene <i>ndt1</i> utilizando DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	74

Fig. 28:	Curva de crescimento das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	75
Fig. 29:	<i>Western Blotting</i> das mitocôndrias isoladas das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	76
Fig. 30:	Fotografia da cultura das cepas <i>S. cerevisiae</i> $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e pYES/ <i>ndt1</i>	77
Fig. 31:	Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em mitocôndrias isoladas das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	79
Fig. 32:	Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em mitocôndrias isoladas das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	79
Fig. 33:	Determinação do transporte de NAD^+ em mitocôndrias isoladas das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	80
Fig. 34:	Determinação da produção de EROs em esferoplastos de diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i>	81
Fig. 35:	Determinação da produção de EROs em esferoplastos de diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> , utilizando a sonda fluorescente <i>MitoSOX Red</i>	82
Fig. 36:	<i>Western Blotting</i> das proteínas carboniladas das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	83
Fig. 37:	Gel réplica do <i>Western Blotting</i> das proteínas carboniladas das cepas de <i>S. cerevisiae</i>	84

Fig. 38:	Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta ndt1\Delta ndt2$	85
Fig. 39:	Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de <i>S. cerevisiae</i> $\Delta ndt1\Delta ndt2$. Sobreposição das marcações	86
Fig. 40:	Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de <i>S. cerevisiae</i> <i>pYES/ndt1</i>	87
Fig. 41:	Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de <i>S. cerevisiae</i> <i>pYES/ndt1</i> . Sobreposição das marcações	88
Fig. 42:	Espectro de fluorescência do meio de reação utilizado para determinação do transporte de NAD^+	138
Fig. 43:	Espectro de fluorescência da solução de NAD^+ ...	139
Fig. 44:	Mapa do vetor pGEM®-T Easy (<i>Promega</i>)	141
Fig. 45:	Mapa do vetor pET-28a(+)	141
Fig. 46:	Mapa do vetor pYES2	142

Lísta de tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1:	Sequência de <i>primers</i>	20
Tabela 2:	<i>Primers</i> para clonagem no vetor pYES2.....	37

Lísta de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

ADP	Adenosina 5'-difosfato
AOX	Oxidase Alternativa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BHAM	Ácido benzohidroxâmico
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CM-H₂DCFDA	(5,6)-clorometil-2,7-diacetato diclorodihidrofluoresceína
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FADH₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FCCP	Carbonil cianeto <i>p</i> -trifluorometoxifenilhidrazona
IPTG	Isopropil-β-D-galactosídeo
H⁺	Próton

HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil] etanosulfônico
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
LB	Luria Bertani
LiAc	Acetato de lítio
mA	Miliampere
mRNA	RNA mensageiro
mV	Milivolts
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NaMN	Ácido nicotínico mononucleotídeo
p/v	Relação peso por volume
PBS	Tampão salina fosfato
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico
SC-URA⁻	Meio de cultura Sc sem uracila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SHAM	Ácido salicil hidroxâmico

TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	“Terrific Broth”
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
TCEP	Tris-(2-carboxietil)fosfina
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UCP	Proteína desacopladora
URF	Unidade relativa de fluorescência
v/v	Relação volume por volume
®	Marca registrada
TM	“Trademark”

1 - Introdução

Nas últimas décadas devido ao avanço das terapias imunossupressoras, as infecções oportunistas por microrganismos aumentaram o risco de vida em pacientes. Os principais patógenos fúngicos humanos são as espécies de *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (KWON-CHUNG & SUGUI, 2013; HOMEI & WORBOYS, 2013; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

Os fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são ubíquos e saprofíticos, esse gênero compreende 250 espécies, sendo que aproximadamente 20 delas podem ser patógenos de humanos. Os fungos desse gênero possuem um papel significativo na reciclagem de carbono e nitrogênio. Esse gênero tem sido utilizado na indústria alimentícia e de produtos farmacêuticos. Entretanto, nos últimos anos passou a ter grande impacto na saúde pública devido às infecções oportunistas (DAGENAIS & KELLER, 2009).

No gênero *Aspergillus* as principais espécies oportunistas são: *Aspergillus fumigatus*; *A. flavus*; *A. nidulans* e *A. terreus*. No entanto, o maior causador de doenças em humanos é o *A. fumigatus*, responsável por 90% dos casos, tornando-o assim um dos principais patógenos oportunistas atuais (CAMARGO & HUSAIN, 2014). Aspergilose é o termo geral que designa uma doença que pode ser causada por agentes etiológicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*.

A primeira descrição de aspergilose em humanos foi realizada em 1842. Porém apenas em 1953 houve a primeira descrição de aspergilose invasiva como doença oportunista, a partir dessa data os números de casos aumentaram consideravelmente em países desenvolvidos (DENNING, 1998).

1.1. *Aspergillus fumigatus*

O *A. fumigatus* pode ser encontrado em todas as regiões do mundo e acredita-se que o seu nicho ecológico natural seja o solo, onde o fungo sobrevive e cresce em vegetais em decomposição. Portanto, áreas rurais representam a maior fonte deste microrganismo (DENNING, 1998; BRAKHAGE & LANGFELDER, 2002).

Devido ao seu ciclo biológico simples, essa espécie possui uma alta capacidade de esporulação, 1-100 conídios/m³. Dessa forma, diariamente milhares de conídios são inalados, sendo esta a principal forma de infecção dessa espécie. Porém, a sua capacidade de causar doença em pacientes imunocompetentes é comprometida pela capacidade do sistema imunológico inato em reconhecer e realizar o *clearance* nos pulmões (LATGÉ, 1999; KWON-CHUNG & SUGUI, 2013).

Com a elucidação da sequência genômica deste fungo por Nierman e colaboradores (2005) muitos mecanismos envolvidos com a patogenicidade e com a resistência do hospedeiro a este fungo estão sendo entendidos e poderão ser utilizados para melhorias no diagnóstico e tratamento das doenças (STEINBACH, 2013).

1.2. Características macro e microscópicas

As colônias do *A. fumigatus* se desenvolvem rapidamente em ágar glicose-peptona a 37°C. Nestas condições, as colônias possuem coloração verde-acinzentada, geralmente são granulares e formam abundantes conídios.

A micromorfologia desta espécie apresenta hifas hialinas, multinucleadas, septadas com paredes paralelas, as quais se estendem por suas extremidades. As

novas ramificações ficam em suas extremidades sub-apicais, onde em conjunto com a massa de crescimento formam os micélios.

As cabeças conidiais apresentam ao microscópio óptico, aspecto de vesículas em forma de frasco, com uma série de fiálides uniseriadas, recobrando dois terços superiores de sua superfície. Os conídios, de coloração verde, possuem 2,5–3 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas. Os conídios são produzidos a partir de uma estrutura diferenciada, denominada conidióforos. As hifas vegetativas iniciam-se a partir de um conídio, o qual foi produto da reprodução assexuada (DENNING, 1998; SULLIVAN; MORAN & COLEMAN, 2005).

A reprodução assexuada dos ascomicetos inicia-se quando um esporo contendo núcleo único germina formando a hifa multinucleada, o crescimento desta origina o conidióforo. No interior do conidióforo os núcleos se dividem através de mitose, permitindo a produção de conídios assexuados e haplóides. Esses conídios são liberados no meio ambiente por disrupção, podendo crescer e tornar-se micélios haplóides, continuando o ciclo (BENNETT & KLICH, 1992; YU, 2010).

O *A. fumigatus* é uma espécie termo-resistente e pode crescer em temperaturas superiores a 55°C, sendo esta uma característica que torna mais fácil a sua diferenciação das outras espécies (HAINES, 1995; DENNING, 1998).

1.3. Patogênese

Para que o fungo tenha sucesso na infecção do hospedeiro é necessário que o fungo seja agressivo no momento em que o sistema imunológico esteja debilitado (LATGÉ & CALDERONE, 2002). A virulência dessa espécie é multifatorial, uma vez que o fungo precisa crescer e se adaptar a condições de estresse impostas

pelo hospedeiro. Atualmente, entende-se que a patogênese das doenças causadas por fungos é determinada por interações entre hospedeiro, fungo e ambiente, existindo também fatores genéticos envolvidos nessas interações (CHAUDHARY & MARR, 2011).

O principal grupo de risco para infecções causadas por *A. fumigatus* são pacientes imunocomprometidos/imunossuprimidos, entre eles destacam-se: pacientes em tratamento com terapias imunossupressoras, quimioterápicos, e com corticoesteróides; pacientes com AIDS; pacientes transplantados e com doença granulomatosa crônica e outras síndromes que afetam o sistema imunológico. No Brasil e em outros países em desenvolvimento, as doenças causadas por fungos ainda são negligenciadas e acredita-se que por isso o número real de casos relatados ainda seja subestimado (CHAKRABARTI *et al.*, 2011; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

Existem diversas formas clínicas para a infecção causada por *Aspergillus*, todas relacionadas com o trato respiratório, uma vez que a inalação de conídios é a principal forma de infecção por *A. fumigatus*. Entretanto, outros locais de infecção como pele, peritônio, ossos e olhos, dentre outros, têm sido descritos em pacientes saudáveis e imunocomprometidos (PITT, 1994; DENNING, 1998).

No trato respiratório de pacientes imunocompetentes após a inalação dos conídios ou antígenos de *Aspergillus* spp. O sistema imunológico inato atua realizando a fagocitose destes, não permitindo a colonização pelo micélio. Em pacientes com resposta imunológica ausente/deficiente os conídios conseguem sobreviver, crescer e colonizar o trato respiratório. Nesses casos podem ocorrer as formas mais graves de infecção como a aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva que envolve o crescimento e colonização pelo

micélio (BODEY & VARTIVARIAN, 1989; DENNING, 1998; HOHL & FELDMESSER, 2007; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

Nas formas mais graves, após a inalação dos conídios, a aspergilose provoca lesões granulomatosas nos pulmões ou nos brônquios, que podem se disseminar do tecido pulmonar para os vasos sanguíneos que irrigam estes órgãos, afetando o encéfalo, trato gastrointestinal e os rins, sendo a forma disseminada geralmente aguda e fatal (ABAD *et al.*, 2010; CHAKRABARTI *et al.*, 2011; CAMARGO & HUSAIN, 2014).

A evolução da doença em pacientes acometidos é muito rápida, pode-se visualizar a presença de infiltrados inflamatórios de 8 a 24 horas após a infecção de coelhos com conídios, entre 8 a 16 horas as hifas começam a surgir e a partir de 24 horas há o aumento das hifas e inflamação (HOPE *et al.*, 2010).

O tratamento dessas infecções é restrito a um limitado número de drogas, sendo dois grupos mais utilizados os azóis e a anfoterecina B (LATGÉ & CALDERONE, 2002). O agente de primeira linha para o tratamento é o voriconazol, sendo sua eficácia maior que a da anfoterecina B, no início do tratamento e apresenta também uma menor incidência de efeitos adversos. Drogas como caspofungina e micafungina, estão na classe das equinocandinas, sendo consideradas terapias de recuperação, suas utilizações no tratamento primário das infecções ainda é pouco esclarecido. Atualmente, as terapias disponíveis causam inúmeras reações adversas para o paciente, entre elas a nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade (HERBRECHT *et al.*, 2002; WALSH *et al.*, 2008; DENNING, 2003; DENNING & HOPE, 2010; KARTSONIS; NIELSEN & DOUGLAS, 2003; NAGASAKI *et al.*, 2009).

A evolução da infecção pelo *A. fumigatus* para aspergilose invasiva necessita de processos de germinação dos conídios, o qual é essencial para o ciclo celular e crucial para o estabelecimento da infecção. A germinação dos conídios está diretamente relacionada com a atividade mitocondrial, a qual se encontra ativa desde os estágios iniciais deste processo para a produção de energia em forma de ATP (TAUBITZ *et al.*, 2007).

1.4. Função mitocondrial

Mitocôndrias são organelas celulares localizadas no citoplasma das células de eucariotos, envolvidas em diversos processos celulares como: vias de sinalização, metabolismo, interação com outras organelas celulares, e principalmente são responsáveis pela síntese de ATP, energia química responsável pela manutenção estrutural e funcional das células (HATEFI, 1985; RUNKEL; BAUMEISTER & SCHULZE, 2014).

A fosforilação oxidativa acoplada ao transporte de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, juntamente com o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna produz energia, na forma de ATP. A fosforilação oxidativa é um sistema formado por quatro supercomplexos proteicos: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase ligada ao FAD), complexo III (ubiquinona citocromo c oxidorreductase), complexo IV (citocromo oxidase) mais a FoF1-ATP sintase (complexo V), distribuídos ao longo da membrana fimitocondrial interna (figura 1) (NELSON & COX, 2005).

Os elétrons provenientes dos substratos oxidáveis, NADH e succinato (FADH₂) entram na cadeia respiratória pela ação de desidrogenases específicas,

complexo I ou complexo II. Esses elétrons são em seguida sequencialmente transferidos para: ubiquinona, complexo III, citocromo c, complexo IV e por fim para oxigênio com formação de água. A passagem de elétrons pela cadeia respiratória é dirigido por um potencial redox. Através do fluxo de elétrons pelos complexos I, III e IV há o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas gerando um gradiente eletroquímico de H^+ , conhecido como força próton motora, que é formada pelo gradiente elétrico (potencial de membrana) e pelo gradiente químico (ΔpH).

Conforme a hipótese quimiosmótica de Mitchell associada com a do acoplamento conformacional de Boyer, o retorno de H^+ para a matriz mitocondrial induz alteração conformacional do componente F1 da FoF1-ATP sintase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i) (MITCHELL, 1961; BOYER *et al.*, 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER *et al.*, 1993; NELSON & COX, 2005).

Figura 1: Cadeia de transporte de elétrons clássica e alternativa. Os retângulos vermelhos indicam os componentes alternativos. Adaptado de Rasmusson & Müller, 2006.

A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, demonstrando a presença de complexos I-V, e sugerindo a presença de uma NADH-

desidrogenase alternativa interna e outra externa, de uma proteína desacopladora e de uma oxidase alternativa mitocondrial (TUDELLA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2011), formando a via alternativa da cadeia de transporte de elétrons (figura 1). A via alternativa está presente em fungos, leveduras, protozoários e plantas, porém ausente em células de mamíferos, com exceção da proteína desacopladora que pode estar presente na maioria desses organismos.

As NADH desidrogenases alternativas estão descritas em mitocôndrias de plantas e fungos, catalisando a mesma reação redox do complexo I da via clássica. Essas enzimas transferem o elétron do NADH presente na matriz mitocondrial diretamente para a ubiquinona, porém sem o bombeamento de prótons. Além da presença da NADH desidrogenase voltada para a face interna da membrana mitocondrial interna, fungos e plantas podem apresentar uma NADH desidrogenase alternativa voltada para a face externa da membrana mitocondrial. Essa enzima por sua vez, catalisa a transferência de elétrons do NAD(P)H presente no espaço intermembranas para a ubiquinona, contornando novamente o complexo I. Essas enzimas são insensíveis a rotenona, inibidor clássico do complexo I, mas sensíveis à flavona (MARTINS *et al.*, 2011).

A presença de uma oxidase alternativa (AOX, ubiquinol oxidase resistente ao cianeto) faz com que essa enzima atue como aceptora final de elétrons. A AOX recebe os elétrons provenientes da ubiquinona e os transfere diretamente para o oxigênio, contornando assim dois passos, nos quais ocorrem bombeamento de prótons (complexo III e IV), consequentemente há formação de água. Oxidases alternativas são inibidas por ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e ácido benzilhidroxâmico (BHAM), porém, são resistentes ao cianeto, inibidor clássico do complexo IV (MARTINS *et al.*, 2011).

As proteínas desacopladoras (UCPs) são uma classe de proteínas transportadoras de ânions, localizam-se na membrana mitocondrial interna. Essas proteínas estão presentes em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de alguns tecidos não-termogênicos em mamíferos, plantas, fungos e protozoários. Sendo uma proteína transportadora de ânions, as UCPs dissipam o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons, sem que ocorra a passagem pelo complexo V, produzindo calor ao invés de ATP. Essas proteínas são ativadas por ácidos graxos e sensíveis a nucleotídeos de purina (JARMUSZKIEWICZ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2011).

As mitocôndrias além de possuírem papel central no metabolismo energético, são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o metabolismo celular normal, através do escape de elétrons do complexo I e III, principalmente. As EROs possuem um papel importante em mecanismos fisiológicos de morte celular. Dessa forma, alterações na função mitocondrial têm sido associada a diversas patologias, como: Alzheimer, Parkinson, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, além de atuar também na obesidade e envelhecimento (FINKEL & HOLBROOK, 2000; NELSON & COX, 2005; WALLACE, 2005).

Nos últimos anos cada vez mais estudos tem salientado para a importância das mitocôndrias na resistência a antifúngicos e também na patogênese de fungos em humanos, uma vez que os conhecimentos dessas organelas em fungos patogênicos ainda é limitado (SHINGU-VAZQUEZ & TRAVEN, 2011).

1.5. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) são importantes co-fatores para inúmeros processos celulares, principalmente aqueles envolvidos no metabolismo energético, biossíntese redutora e antioxidação. Esses co-fatores tem sido estudados extensivamente desde de 1930 (HERRERO-YRAOLA *et al.*, 2001; ONYANGO *et al.*, 2002; DU *et al.*, 2003; YING, 2008).

O NAD^+ e seus derivados apresentam um papel central como modulador do metabolismo energético celular. Uma vez que a mitocôndria possui em sua matriz, as coenzimas NADH e NADPH , a qual transferem o hidrogênio para a cadeia respiratória. Nos últimos anos, estudos tem demonstrado a importância da atividade biológica de NAD^+ e suas isoformas em outras atividades celulares como a morte celular, a homeostase de cálcio, a expressão gênica, o envelhecimento, a carcinogênese e ainda funções imunológicas. Esses co-fatores atuam ainda em inúmeros processos biológicos e patológicos envolvidos com a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dessa forma, a manutenção das concentrações de NAD^+ e de suas isoformas é importante para a manutenção do metabolismo energético e das funções celulares (YING, 2008; Di STEFANO & CONFORTI, 2013).

Acredita-se que as enzimas envolvidas na biossíntese de NAD^+ estão localizadas fora da mitocôndria (ANDERSON *et al.*, 2002; HUH *et al.*, 2003). A biossíntese de NAD^+ possui um papel fundamental no metabolismo das demais isoformas: NADH , NADP^+ e NADPH (YING, 2008).

A via de biossíntese de NAD^+ foi caracterizada em procariotos (PENFOUND & FOSTER, 1996) e em leveduras (LIN & GUARANTE, 2003; DENU, 2003). Em

procariotos e eucariotos inferiores, o NAD^+ é sintetizado pela via *de novo* do ácido quinolinico e pela via do ácido nicotínico, denominada via *salvage* (PENFOUND & FOSTER, 1996). A via *de novo* inicia-se a partir do triptofano, o qual é convertido a ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN) através de seis reações enzimáticas e uma não enzimática. O NaMN converge para a via *salvage* e sofre ação de duas nicotinamidase formando NAD^+ . Uma vez sintetizado no citosol, o NAD^+ deve ser importado para o interior da mitocôndria (YING, 2008; VERDIN, 2014).

Em mamíferos, o NADH é capaz de atravessar a membrana mitocondrial externa (LEE *et al.*, 1998). Entretanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a entrada de NAD^+ e NADH produzidos no citossol (TZAGOLOFF, 1982). A entrada de moléculas hidrofílicas pela membrana interna é catalisada por uma família de proteínas codificadas no núcleo chamadas de transportadores mitocondriais, as moléculas transportadas por essa família de proteínas são muito variadas em tamanho e estrutura (PALMIERI *et al.*, 2011).

O transportador de malato-aspartato seria o principal responsável pelas alterações na relação NAD^+/NADH . Esse transportador é encontrado principalmente em mitocôndrias de fígado e rim. Desta forma, os equivalentes redutores do NADH são transferidos para o oxalacetato citosólico produzindo malato, catalisado pela enzima malato desidrogenase citosólica. O malato formado passa através da membrana interna através do transportador malato/ α -cetoglutarato. Na matriz os equivalentes redutores são passados para NAD^+ pela ação da malato desidrogenase, formando oxalacetato e NADH, o qual pode transferir os elétrons para a cadeia respiratória. O oxalacetato formado não pode voltar diretamente para o citosol, desta forma sofre ação da aspartato aminotransferase formando aspartato.

O aspartato por sua vez, pode ser levado para o citosol através do transportador glutamato/aspartato. No citosol o oxalacetato é regenerado (BAKKER *et al.*, 2001).

Em leveduras, além do transportador de malato-aspartato, o NADH pode sofrer oxidação pelas NADH desidrogenases alternativas externas (MARTINS *et al.*, 2011). Além disso, estudos identificaram e caracterizaram duas isoformas de proteína transportadora mitocondrial de NAD⁺ (Ndt1p e Ndt2p) em *Sacharomyces cerevisiae* (TODISCO *et al.*, 2006) e em *Arabidopsis thaliana* (PALMIERI *et al.*, 2009) capazes de transportar estas coenzimas. Estas proteínas possuem massa molecular com aproximadamente 42 e 37,5 kDa para Ndt1p e Ndt2p, respectivamente.

Em estudos prévios no nosso laboratório havíamos observado que em mitocôndrias de *Paracoccidioides brasiliensis*, o NAD⁺ foi capaz de induzir a formação de potencial de membrana mitocondrial (MARTINS *et al.*, 2008), o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de nicotinamida adenina dinucleotídeo, conforme havia sido descrito em *S. cerevisiae*. Estes mesmos experimentos foram realizados com mitocôndrias de *A. fumigatus* e também sugeriu a presença desse transportador nesse microrganismo. Através de ferramentas de bioinformática, encontramos uma sequência no genoma de *A. fumigatus*, que possui 32% de identidade com o gene do transportador de dinucleotídeos de nicotinamida (*ndt1*) de *S. cerevisiae* e com 29% de identidade com o gene *ndt1* de *A. thaliana*. A entrada de NAD⁺/NADH do citosol para a mitocôndria por diferentes mecanismos tem sido atribuído como uma forma de resistência de microrganismos em condições hostis. Desta forma, seria interessante entender o papel desse transportador em *A. fumigatus* e seu potencial quimioterapêutico, uma

vez que o desenvolvimento de novas terapias e vacinas para microrganismos oportunistas que possuam um menor efeito adverso ao paciente é necessário.

2 - Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Clonagem, sequenciamento, expressão em sistemas heterólogos (*E. coli* e *S. cerevisiae*) e caracterização bioquímica de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *Aspergillus fumigatus*.

2.2. Planejamento

- Clonar e sequenciar o gene *ndt1* de *A. fumigatus*;
- Expressar em bactérias *E. coli* BL21(DE3) a proteína Ndt1 recombinante;
- Purificar a proteína Ndt1 recombinante, produzir e purificar anticorpo policlonal anti-Ndt1;
- Expressar em leveduras *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ a proteína Ndt1 recombinante;
- Realizar estudos bioenergéticos através da medida do potencial de membrana e transporte de NAD^+ em mitocôndrias isoladas de *S. cerevisiae*;
- Determinar a geração de espécies reativas de oxigênio utilizando as sondas CM-H₂DCFDA (*Molecular Probes*) e MitoSOX Red (*Molecular Probes*);
- Determinação de proteínas carboniladas;
- Microscopia confocal para confirmar a co-localização da proteína Ndt1 em mitocôndrias.

3 - Material e Métodos

3.1. Microrganismos

3.1.1. *Aspergillus fumigatus*

O isolado clínico de *A. fumigatus* foi gentilmente cedido pela Prof^a. Dr^a. Cláudia O. Rodrigues da University of Miami, Flórida EUA.

A cepa foi cultivada em meio sólido YG e após 4 dias de crescimento à 30°C foi realizada a recuperação dos conídios em PBS estéril pH 7,4 e filtração em lã de vidro. Os conídios em suspensão foram utilizados em experimentos ou armazenados a 4°C.

3.1.2. Bactérias

As bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH10 β , genótipo: *F- mcra* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ -*rpsI nupG*, foram utilizadas como receptoras para a transformação, clonagem e propagação de plasmídeos.*

As bactérias *Escherichia coli* das linhagens BL21 (DE3), genótipo: *F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm* (DE3), foram utilizadas para a expressão heteróloga do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1).

3.1.3. Leveduras

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem Δ *ndt1* (*single* mutante), genótipo: Δ NDT1:*his3* Δ 1*leu2* Δ 0*met15* Δ 0*ura3* Δ 0*ndt1::KanMX4(G418r)* e *S. cerevisiae*

da linhagem $\Delta ndt2$ (*single* mutante), genótipo: $\Delta NDT2:his3\Delta 1leu2\Delta 0met15\Delta 0ura3\Delta 0ndt::KanMX4(G418r)$ foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus Araraquara.

As cepas *single* mutantes foram utilizadas para obtenção da linhagem $\Delta ndt1\Delta ndt2$, genótipo: $\Delta NDT1:his3\Delta 1leu2\Delta 0met15\Delta 0ura3\Delta 0ndt1::KanMX4(G418r)/\Delta NDT2:his3\Delta 1leu2\Delta 0met15\Delta 0ura3\Delta 0ndt::KanMX4(G418r)$, a qual foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Mário Henrique de Barros do Departamento de Microbiologia do ICB, Universidade de São Paulo, São Paulo. A cepa duplo mutante foi utilizada para expressão do gene *ndt1* de *A. fumigatus*.

As leveduras *S. cerevisiae* da linhagem INVSc, genótipo: $MATahis3\Delta 1leu2trp1-289ura3-52/MATahis3\Delta 1leu2trp1-289ura3-52$; foram utilizadas como cepa controle.

3.2. Extração de DNA genômico de *A. fumigatus*

Os conídios de *A. fumigatus* foram inoculados em meio de cultura YG e incubados a 37°C por 16 horas, sob agitação de 200 rpm. O micélio foi coletado por filtração a vácuo, congelado imediatamente em nitrogênio líquido e triturado com gral e pistilo. Após a trituração foi adicionado 500 μ L do tampão de extração de DNA em cerca de 40 mg de micélio triturado. Foi adicionado na amostra um volume igual de fenol:clorofórmio (v/v) e foi homogeneizado por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.800 *g* por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa foi transferida e foi adicionado a ela o mesmo volume de fenol:clorofórmio (v/v) e

centrifugado novamente a 20.800 *g* por 5 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida, a ela foi adicionado isopropanol e centrifugado a 20.800 *g* por 10 minutos a 4°C.

Em seguida, o sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) e centrifugado a 20.800 *g* por 2 minutos a 4°C. Os tubos foram mantidos a temperatura ambiente para secagem e o sedimento foi ressuspenso em água deionizada.

Foi adicionado RNase A 0,1 mg/mL e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente.

3.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados a partir da sequência do gene que codifica o transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *A. fumigatus* (*ndt1*), a sequência esta depositada no GenBank sob número de acesso NC_007197-1. Os *primers* da tabela 1 foram utilizados na *PCR overlapping* e para as reações de amplificação e clonagem no vetor de expressão para organismo procarioto. Os *primers* foram desenhados com sítio de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Not*I.

Tabela 1: Sequência de *primers*.

<i>Primers</i>	
<i>Primer F Overlapping</i>	5'ATACTTCTACGAAACCACCGTGACTAATCCAATCTGGGTC3'
<i>Primer R Overlapping</i>	5'GACCCAGATTGGATTAGTCACGGTGGTTTCGTAGAAGTAT3'
<i>Primer ndt1 Foward</i>	5' <u>GGATCC</u> ATGTTTTCCGACGGTCA3'
<i>Primer ndt1 Reverse</i>	5' <u>GCGGCCG</u> CTTACTCATCCTGCT3'

Os sítios de restrição estão sublinhados.

3.4. Reação em Cadeia da Polimerase *Overlapping* (PCR-overlapping)

Para o desenvolvimento da técnica de PCR *overlapping* foi utilizado o protocolo descrito por Horton (1995), com modificações. A figura 2 esquematiza a PCR-overlapping.

Figura 2: Esquema da PCR-overlapping.

Primer 1: *Primer ndt1* Foward

Primer 2: *Primer R* Phusion

Primer 3: *Primer F* Phusion

Primer 4: *Primer ndt1* Reverse

Inicialmente foi realizada a amplificação de cada fragmento, onde para a amplificação do fragmento 1 (472 pb) foi utilizado 0,4 µmol/L dos *primers*: *Primer ndt1* Foward e *Primer R* Phusion; e para a amplificação do fragmento 2 (722 pb) foi utilizado 0,4 µmol/L dos *primers*: *Primer F* Phusion e *Primer ndt1* Reverse. Para ambas as reações foi utilizado uma mistura equimolar de dNTPs 0,2 mmol/L, tampão 5X Phusion® HF Buffer (contendo MgCl₂ 7,5 mmol/L, fornecido pelo fabricante) e 1 U

da enzima Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (*Finnzymes*), e água deionizada estéril para completar o volume de 50 µL.

O seguinte perfil termal foi utilizado: desnaturação inicial, 98°C por 30 segundos; 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, no final dos 30 ciclos foi realizado um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos, e as reações foram mantidas a 4°C.

3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas de acordo com Saiki e colaboradores, (1985) e Wendland, (2003), utilizando um Termociclador Eppendorf (*Mastercycler Gradient*). O DNA genômico e DNA obtido a partir da PCR *Overlapping* foram utilizados como molde. Para a reação de união e amplificação dos fragmentos foi utilizado uma concentração de 2:1 (fragmento 1:fragmento 2) adicionados a 0,4 µmol/L dos *primers*: *Primer ndt1* Forward e *Primer ndt1* Reverse, e foi utilizado uma mistura equimolar de dNTPs 0,2 mmol/L, sulfato de magnésio (MgSO₄) 1,5 mmol/L e 2 U da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (*Invitrogen*), tampão 10 X High Fidelity PCR Buffer (Tris-SO₄ 600 mmol/L (pH 8,9), sulfato de amônio 180 mmol/L), e água deionizada estéril para completar o volume de 50 µL.

Foi utilizado o seguinte perfil termal: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 2 minutos, 67°C por 1 minuto e 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos, foi realizado um ciclo de extensão final de 68°C por 30 minutos e as reações foram mantidas a 4°C.

3.6. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TAE. As amostras foram preparadas com tampão de amostra para DNA e GelRed™ (*Uniscience*).

As corridas eletroforéticas foram realizadas em uma cuba com tampão de corrida TAE, sob aplicação de corrente de 90 V e tempo variável (50 a 60 minutos). Os géis foram visualizados na presença de luz UV (comprimento de onda entre 304 – 312 nm).

3.7. Inserção do fragmento obtido em vetor de clonagem

Após as reações de amplificações, o fragmento foi extraído do gel de agarose e purificado utilizando o Kit QIAquick® Gel Extraction (*QIAGEN*), seguindo as instruções do fabricante. O produto foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Após a purificação, o fragmento de tamanho esperado (1.194 pb) foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (*Promega*), utilizando o tampão 2X Rapid Ligation Buffer [Tris-HCl 60 mmol/L (pH 7,8); MgCl₂ 20 mmol/L; DTT 20 mmol/L; ATP 2 mmol/L; polietileno glicol 10%] e enzima T4 DNA Ligase (*Promega*), seguindo as instruções do fabricante. Este vetor fornece um gene de resistência ao antibiótico ampicilina (50 µg/µL).

3.8. Preparo de células de *E. coli* competentes

As células de *E. coli* [DH10 β e BL21(DE3)] foram semeadas a partir do estoque do -80°C, em 10 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 12 horas sob agitação de 200 rpm.

Em seguida, esta subcultura foi diluída em 250 mL de meio SOB e incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade óptica entre 0,4 e 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Após esse período a cultura foi transferida para tubos de 50 mL estéril e incubadas em gelo por 10 minutos. Logo após, a cultura foi centrifugada a 2.500 *g* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspenso cuidadosamente em 20 mL de meio TB resfriado e incubado novamente em gelo por 10 minutos, e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 20 mL de meio TB e adicionado 1,5 mL de DMSO. As células foram incubadas em gelo por 10 minutos. As bactérias foram aliquotadas em microtubos e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.9. Transformação de células de *E. coli* competentes

As transformações das bactérias competentes foram realizadas por choque térmico de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Inicialmente, as células competentes foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em gelo, em seguida foi adicionado aproximadamente 10 ng de DNA plasmidial a 50 – 100 μ L de células competentes. Essa mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, em seguida foi

realizado um choque térmico a 42°C por 45 segundos e a suspensão foi incubada em gelo por 3 minutos e adicionado à cultura meio SOC.

Essa cultura foi incubada a 37°C por 1 hora, sob agitação de 200 rpm. Após este tempo, a cultura foi semeada em meio LB sólido com o antibiótico adequado e incubada a 37°C por 16 horas.

3.10. PCR de colônia

Para confirmação dos clones selecionados em placa foi realizada uma PCR de colônia para confirmação da presença do fragmento correspondente ao gene *ndt1*. As condições de reação foram às mesmas descritas no item 3.5. Como molde foi utilizado à própria colônia inoculada diretamente ao meio de reação.

3.11. Inserção do fragmento obtido em vetor de expressão

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit QIAprep® Spin Miniprep (*QIAGEN*) seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida, o DNA plasmidial e o plasmídeo de expressão [pET28-a(+)] foram digeridos com as enzimas *BamHI* (*Invitrogen*) e *NotI* (*Thermo Scientific*), seguindo as instruções do fabricante. A digestão foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose, e os fragmentos obtidos foram extraídos do gel e purificados utilizando o Kit QIAquick® Gel Extraction (*QIAGEN*), seguindo as instruções do fabricante.

Os fragmentos purificados foram utilizados para reação de ligação no vetor de expressão procarioto, na razão molar de 3:1 (inserto:vetor), utilizando a enzima

T4 DNA Ligase (*Fermentas*) e tampão 10X T4 DNA Ligase Buffer [Tris-HCl 400 mmol/L (pH 7,8), MgCl₂ 100 mmol/L, DTT 100 mmol/L, ATP 5 mmol/L], conforme instruções do fabricante.

A reação de ligação foi utilizada para transformar a bactéria *E. coli* DH10 β , para propagação, manutenção dos plasmídeos recombinantes e para análise da sequência do gene. Este vetor fornece um gene de resistência ao antibiótico kanamicina (50 μ g/ μ L).

3.12. Sequenciamento dos clones positivos selecionados

Os clones positivos foram selecionados, e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit QIAprep® Spin Miniprep (*QIAGEN*). Em seguida, preparados para o sequenciamento com o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (*Life Technologies*).

Cerca de 250-500 ng de DNA plasmidial foram utilizados para o sequenciamento e estes foram adicionados à 1 μ L do reagente Big Dye, onde continha os dideoxiribonucleotídeos marcados (ddATP, ddCTP, ddGTP, e ddTTP), 2 μ L de 5X Sequencing Buffer e 3,2 pmoles do *primer* apropriado e água deionizada para completar o volume de 10 μ L. O perfil termal utilizado foi 25 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

O produto amplificado foi precipitado pela adição de acetato de sódio 3 mol/L pH 5,2 e etanol absoluto, seguido de uma incubação no gelo por 20 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 20.400 g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado etanol 70% (v/v). A amostra foi seca e ressuspensa em tampão de carregamento fornecido pelo fabricante.

A reação de sequenciamento foi realizada segundo Sanger e colaboradores (1977) em um sequenciador automático ABI 3500XL (*Applied Biosystems*), na Fundação Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego.

3.13. Indução em pequena escala da expressão do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) em *E. coli*

Os clones positivos selecionados e sequenciados que continham a sequência codificante da proteína Ndt1, na fase de leitura correta e sem alteração de nucleotídeos foram utilizados para a transformação em *E. coli* BL21(DE3). Uma colônia transformada foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido acrescido de kanamicina 50 µg/µL e incubado a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. A partir desse inóculo foram realizadas três subculturas, contendo 1 mL da cultura anterior, diluída em 10 mL de meio TB juntamente com o antibiótico adequado, glicose 1% (p/v), esta suspensão foi incubada nas mesmas condições acima até atingir uma DO_{600nm} entre 0,4-0,6. Após atingir a DO, uma alíquota de 500 µL foi retirada das culturas (T₀) e utilizado como controle negativo da indução da expressão. Ao restante das culturas foi adicionado IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) 1 mmol/L para a indução da expressão da proteína recombinante, e em seguida a cultura foi incubada em diferentes temperaturas (25°C, 30°C e 37°C). Foram retiradas duas alíquotas a cada 2 horas (T₂ e T₄), estas foram centrifugadas a 20.800 g por 30 segundos e congeladas à -20°C.

As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE.

Para avaliação da solubilidade da proteína, os sedimentos foram ressuspensos em tampão de lise, lisado por sonicação, três vezes com pulsos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos no gelo entre cada pulso, com sonicador Fisher Scientific modelo 150E. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 20.800 *g* por 1 minuto a 4°C, sobrenadante e sedimento foram armazenados à -20°C.

3.14. Expressão de Ndt1 em *E. coli*

E. coli BL21(DE3) previamente transformada com a construção *ndt1*/pET28-a(+) foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo kanamicina 50 µg/µL e foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Em seguida, a cultura foi diluída em 150 mL de meio TB líquido contendo kanamicina 50 µg/µL e glicose 1% (p/v), a cultura foi incubada nas mesmas condições anteriores até atingir DO_{600nm} entre 0,4-0,6. A essa cultura foi adicionado IPTG 1 mmol/L e a cultura incubada a 37°C por 4 horas sob agitação de 200 rpm. Após este tempo, a cultura foi centrifugada a 10.000 *g* por 20 minutos a 4°C, o sedimento foi congelado à -20°C.

3.15. Purificação da proteína recombinante Ndt1 dos corpos de inclusão

A purificação da proteína recombinante Ndt1 foi realizada a partir dos corpos de inclusão conforme descrito por McGettrick e Worrall (2003). Para o preparo dos corpos de inclusão o sedimento foi ressuspensão em tampão de ressuspensão. Em seguida, foi adicionado lisozima 20 µg/µL e a mistura incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação. Após essa incubação foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases [PIC, 1 mL para 20 g de sedimento (v/p)] e a

suspensão celular foi sonicada, cinco vezes com pulsos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos no gelo entre cada pulso. Após a sonicação foi adicionado Triton-X 100 1% (v/v) e novamente incubado nas condições descritas acima. Em seguida, centrifugado a 8.000 g por 15 minutos a 10°C (todas as centrifugações deste protocolo foram realizadas nessas condições) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi lavado com tampão de lavagem e centrifugado, esse passo de lavagem foi repetido mais 4 vezes. Em seguida para remoção de resíduos de Triton-X 100, o sedimento foi ressuspensão novamente em tampão de ressuspensão e centrifugado (esse passo foi repetido 3 vezes).

A desnaturação dos corpos de inclusão foi realizada pela adição de tampão de desnaturação, PIC [1 mL para 20 g de sedimento (v/p)] e sonicado cinco vezes com pulsos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos no gelo entre cada pulso. Em seguida foi adicionado N-Laurosilsarcosina (SLS) 30% (v/v) e incubado a temperatura ambiente por 2 horas sob agitação. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 12.800 g por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante que continha a proteína desnaturada foi submetido à diálise para eliminação dos reagentes caotrópicos. A diálise foi realizada com membrana de diálise 13 kDa (*Fisher Scientific*), utilizando tampão D. O volume utilizado para a diálise foi dez vezes maior que o da proteína, com 2 trocas de tampão a cada 6 horas. A proteína recuperada após a diálise foi submetida à análise por SDS-PAGE e congelada à -20°C.

3.16. SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio)

As amostras proteicas foram preparadas com tampão de amostra e desnaturadas a 98°C por 5 minutos em aparelho Thermomixer Comfort (*Eppendorf*).

O gel de poliacrilamida-SDS foi preparado segundo Laemmli (1970). O gel de empilhamento foi de 5% preparado em tampão Tris-HCl 1mol/L pH 6,8 e o gel de separação foi de 15% preparado em tampão Tris-HCl 1,5 mol/L pH 8,8, os reagentes e quantidades necessárias estão descritos no anexo itens 8.2.12.

O tampão de corrida utilizado foi Tris-Glicina [Tris 25 mmol/L; Glicina 250 mmol/L, SDS 0,05% (p/v)] pH 8,3 e a corrida eletroforética foi processada com voltagem constante de 90 V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado com solução de *Coomassie® Brilliant blue R 250* 0,25% (p/v) (*Merck*) e descorado com lavagens em água destilada e aquecimento.

3.17. Coloração por prata

A coloração por nitrato de prata foi realizado conforme Sambrook *et al.* (1989). O gel de poliacrilamida foi incubado sob agitação na solução 1 por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, o gel foi incubado na solução 2, para sensibilização por 30 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida foram realizadas três lavagens com água destilada, após as quais, o gel foi incubado sob agitação na solução 3 por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, novamente foram realizadas três lavagens com água destilada.

Em seguida o gel foi incubado sob agitação na solução 4 por 2 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida utilizando a solução 5, e o gel foi lavado três vezes com água destilada.

Essa coloração possui uma sensibilidade de 100 a 1.000 vezes maior que a coloração por *Coomassie® Brilliant blue R 250*, além de ser capaz de detectar pequenas concentrações de polipeptídeos, de 0,1 a 1,0 ng.

3.18. Western Blotting

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE foi realizada a transferência das mesmas para uma membrana de nitrocelulose (TOWBIN; STAEHELIN & GORDON, 1979), através de um sistema de Mini Trans-Blot (*BioRad*). A transferência para a membrana ocorreu através da montagem do sistema “sanduíche” onde foi adicionado o gel e a membrana entre papéis de filtro e esponjas. O sistema foi colocado em uma cuba eletroforética contendo tampão de transferência e foi aplicada uma corrente de 350 mA por 90 minutos.

Após a transferência as membranas com as proteínas foram incubadas em TBS-T com leite em pó desnatado Molico® (*Nestlé®*) 5% (p/v) e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada sob agitação por 16 horas a 4°C com anticorpo. Os anticorpos utilizados foram anti-(His)6-Tag (*Invitrogen*) na diluição 1:3.000, anticorpo policlonal anti-Ndt1 na diluição 1:20.000 ou 1:10.000 ou anticorpo anti-citocromo C de levedura na diluição 1:2.000. Após a incubação por 16 horas, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T por 5 minutos/cada. Em seguida, a membrana foi

incubada com anticorpo secundário marcado com peroxidase, na diluição 1:10.000 por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação.

Logo após esse período as membranas foram lavadas como descrito anteriormente e realizada a revelação utilizando o kit “Western Blotting detection reagents” (*GE Biosciences*), seguindo instruções do fabricante. A membrana foi incubada com essa solução por 60 segundos e o excesso foi retirado com papel absorvente. A marcação dos anticorpos primários foi visualizada em aparelho ChemiDoc™ MP System (*Bio-Rad*).

3.19. Espectrometria de massas

Para confirmação da identidade da proteína expressa em *E. coli* BL21(DE3), foi realizada a análise da sequência de aminoácidos por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF-MS), no Laboratório de Química de Proteínas (Hemocentro/FMRP).

Inicialmente, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e o gel foi incubado por 30 minutos com solução fixadora. Em seguida lavado com solução descorante 5 vezes de 3 minutos e corado com *Coomassie® Brilliant blue R 250* por 16 horas. Logo após a incubação foram realizadas três lavagens com solução descorante por 15 minutos, 45 minutos e 120 minutos.

As bandas resultantes foram cortadas do gel para digestão com solução de tripsina, lavadas com solução de lavagem e incubadas a temperatura ambiente durante 6 horas. No fim desse período, foi trocada a solução de lavagem e incubado a temperatura ambiente por 16 horas, para a remoção do SDS e do corante *Coomassie® Brilliant blue R 250*. Após esse período, as bandas foram lavadas com

acetonitrila 100% e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e secas em centrífuga a vácuo (*Eppendorf*). As bandas foram rehidratadas com uma solução de tripsina 0,025 µg/µL. Após o entumescimento do gel, foi adicionado solução de bicarbonato de amônio 0,1 mol/L e incubado a 37°C por 24 horas (protegido da luz). A reação foi interrompida pela adição de ácido fórmico puro e mantida a temperatura ambiente para extração dos peptídeos.

Em seguida, as amostras tratadas com tripsina foram encaminhadas ao Laboratório de Química de Proteínas (Hemocentro/FMRP) para análise. Os espectros de massa de MS1 e MS/MS foram analisados no banco de dados MASCOT Peptide Mass Fingerprint.

3.20. Determinação da concentração de proteína (método BCA)

Para determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado o kit BCATM Protein Assay (*Thermo Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA).

Esse kit realiza detecção da coloração roxa formada devido à quelação de duas moléculas de BCA com um íon cuproso. A estrutura macromolecular da proteína, o número de pontes peptídicas e a presença principalmente de quatro aminoácidos (cisteína, cistina, triptofano e tirosina) são os responsáveis pela formação da cor com BCA. A determinação é realizada pela leitura da absorvância em 562 nm.

3.21. Animais e obtenção do soro imune

Foram utilizados coelhos adultos jovens, fêmeas, com peso de aproximadamente 3 kg para obtenção do soro imune e purificação de anticorpos. Os experimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (14.1.296.53.3) (Anexo 9.2.).

Os animais foram imunizados com solução de antígeno (proteína Ndt1 purificada) 5,0 mg/mL em PBS pH 7,4 emulsionada (v/v) com adjuvante completo de Freund no volume final de 2 mL. Em cada animal foram aplicadas quatro injeções subcutâneas de 0,5 mL da suspensão no dorso do animal. Foram realizadas três imunizações em cada animal, sendo que no final dos 60 dias os animais foram anestesiados com Ketamina (35 mg/Kg) e Xilazina (5 mg/Kg), administração intramuscular e o sangue foi coletado por punção cardíaca.

O sangue foi mantido a temperatura ambiente até a formação do coágulo. Em seguida foi incubado por 1 hora a 37°C para retração e desprendimento do coágulo e foi centrifugado a 3.000 g por 10 minutos para obtenção do soro. O soro foi incubado por 30 minutos a 56°C para inativação das proteínas do sistema complemento.

3.22. Imunodifusão radial dupla

A determinação relativa de IgG anti-Ndt1 na preparação de IgG total, e a especificidade da reação, foi analisada por imunodifusão radial dupla seguindo o

método descrito por Ouchterlony (1958), para determinação do provável ponto de equivalência de antígeno-anticorpo.

A imunodifusão radial dupla foi realizada em lâminas de vidro como suporte, onde foi adicionado uma solução de agarose de 1,3% (p/v) em PBS, pH 7,4. As amostras provenientes do soro foram diluídas serialmente (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) e foram analisadas contra uma solução do antígeno (Ndt1) 1 mg/mL. A solução do antígeno também foi diluída serialmente e analisada contra o soro. A lâmina de imunodifusão foi incubada em câmara úmida por 12 horas a temperatura ambiente para formação das linhas de precipitação do antígeno-anticorpo. Em seguida, a lâmina foi lavada com solução de NaCl 0,15 mol/L e logo após, com água deionizada. A lâmina foi coberta com papel filtro e incubada por 24 horas a 37°C. Após esse período a lâmina foi corada com *Coomassie® Brilliant blue R 250* e descorada com solução descorante.

3.23. Purificação do soro imune para obtenção de imunoglobulinas G (IgG)

A purificação de IgG foi realizada conforme descrito por Fahey e colaboradores (1964), seguindo as modificações realizadas por Lucisano e Mantovani (1984).

Inicialmente, a fração proteica onde continha IgG foi precipitada, adicionando uma solução saturada de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 40% (p/v) ao soro imune total. Esta suspensão foi deixada em repouso a 4°C por 12 horas. Em seguida foi centrifugada a 1.800 g por 5 minutos a 4°C. O precipitado resultante foi lavado com solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% (p/v) e centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. A solubilização da fração precipitada foi realizada em PBS pH

7,4. Em seguida, a fração solubilizada foi dialisada com PBS pH 7,4, por 24 horas a 4°C, sendo realizada três trocas de tampão. Logo após essa fração foi novamente dialisada com tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,4 por 16 horas a 4°C, este tampão foi o mesmo utilizado para equilibrar a coluna de cromatografia.

A fração de anti-soro contendo o anticorpo anti-Ndt1 foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de dietilaminoetil (DEAE) celulose. A fase estacionária foi equilibrada com o tampão de diálise, foi utilizado fluxo de 1 mL/minuto. Foi realizado o monitoramento das frações eluídas pela leitura da absorvância a 280 nm (espectrofotômetro DU-70, *Beckman*). Após ocorrer a eluição do pico 1 onde continha IgG total, a fase móvel foi substituída por solução tampão de fosfato suplementada com cloreto de sódio (NaCl) 1 mol/L para que ocorresse a eluição das demais proteínas do soro (pico 2).

As proteínas obtidas no primeiro grupo (pico 1) foram reunidas e concentradas por filtração através de membranas de celulose, e em seguida a amostra concentrada foi dialisada com PBS pH 7,4 por 16 horas a 4°C e armazenadas à -20°C.

3.24 . Clonagem em vetor pYES2

Para a expressão da proteína recombinante em leveduras, foi utilizado o vetor pYES2 (*Invitrogen*). Os *primers* utilizados para clonagem neste vetor estão descritos na Tabela 2, os quais foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI e *Not*I.

Além disso, para uma expressão eficiente neste vetor é necessário que um dos *primers* contenha uma sequência consenso. Em eucariotos, a sequência

consenso KOZAK modula a tradução do RNAm, podendo aumentar a eficiência da expressão da proteína em leveduras (Kozak, 1986).

Tabela 2: *Primers* para clonagem no vetor pYES2.

<i>Primers</i>	
<i>Primer ndt1/pYES2 Foward</i>	5' <u>GGATCCAACACA</u> ATGTCTTCCGACGGTCA3'
<i>Primer ndt1/pYES2 Reverse</i>	5' <u>GCGGCCGCTT</u> ACTCATCCTGCT3'

Os sítios de restrição estão sublinhados e a sequência Kozak está em negrito.

A sequência do gene *ndt1* anteriormente clonada foi utilizada como molde para a reação de amplificação com os *primers* específicos para o vetor pYES2. O DNA plasmidial foi incubado em uma mistura contendo 0,4 µmol/L de *primer*: *Primer ndt1/pYES2 Foward* e *Primer ndt1/pYES2 Reverse*, e uma mistura equimolar de dNTPs 0,2 mmol/L, MgSO₄ 1,5 mmol/L e 2 U da enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (*Invitrogen*), tampão 10 X High Fidelity PCR Buffer [Tris-SO₄ 600 mmol/L (pH 8,9), sulfato de amônio 180 mmol/L], e água deionizada estéril para completar o volume de 50 µL.

Foi utilizado o seguinte perfil termal: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 2 minutos, 58°C por 1 minuto e 30 segundos e 68°C por 1 minuto e 30 segundos, foi realizado um ciclo de extensão final de 68°C por 30 minutos e as reações foram mantidas a 4°C.

3.25. Inserção do fragmento obtido em vetor de clonagem

Logo após a reação de amplificação, o material obtido foi extraído do gel de agarose e purificado utilizando o Kit QIAquick® Gel Extraction (*QIAGEN*), seguindo

as instruções do fabricante. Após a purificação o produto foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Após a purificação o fragmento de tamanho esperado (≈ 1.200 pb) foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (*Promega*), conforme descrito no item 3.7.

Essa reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH10 β , conforme descrito no item 3.9 e para confirmação dos clones selecionados foi realizado uma reação de PCR de colônia conforme descrito no item 3.10.

3.26. Inserção do fragmento obtido em vetor de expressão para eucarioto

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit QIAprep® Spin Miniprep (*QIAGEN*) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, o DNA plasmidial e o plasmídeo de expressão (pYES2), foram digeridos com as enzimas *Bam*HI (*Invitrogen*) e *Not*I (*Thermo Scientific*), seguindo as instruções do fabricante. A digestão foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose, e os fragmentos obtidos foram extraídos do gel e purificados utilizando o Kit QIAquick® Gel Extraction (*QIAGEN*), seguindo as instruções do fabricante.

Os fragmentos purificados foram utilizados para reação de ligação no vetor de expressão eucarioto, na razão molar de 3:1 (inserto:vetor), utilizando a enzima T4 DNA Ligase (*Fermentas*) e tampão 10X T4 DNA Ligase Buffer [Tris-HCl 400 mmol/L (pH 7.8); MgCl₂ 100 mmol/L; DTT 100 mmol/L; ATP 5 mmol/L], conforme instruções do fabricante.

A reação de ligação foi transformada em *E. coli* DH10 β , para propagação, manutenção dos plasmídeos recombinantes e para análise da sequência do gene.

3.27. Sequenciamento dos clones positivos selecionados

Os clones positivos selecionados, após a extração do DNA plasmidial com o Kit QIAprep® Spin Miniprep (*QIAGEN*) foram preparados para o sequenciamento com o Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (*Applied Biosystems*), conforme descrito no item 3.12.

3.28. Preparo de células de *S. cerevisiae* competentes e transformação

Uma colônia isolada de *S. cerevisiae* cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ foi inoculada em 10 mL de meio YPD e incubada a 30°C por 16 horas, sob agitação de 200 rpm.

Após esse período foi realizada uma diluição da cultura primária de 1:100 em meio YPD e a mesma foi incubada a 30°C, sob agitação de 200 rpm até atingir uma DO_{600nm} entre 0,4-0,6. Em seguida, as células foram centrifugadas a 800 *g* por 5 minutos. As células foram lavadas com tampão TE estéril e novamente centrifugadas como descrito anteriormente. O sedimento foi ressuspensão em solução de TE/LiAc e incubada a 30°C por 1 hora e 30 minutos, sob agitação de 200 rpm.

Para cada reação de transformação foi utilizado 200 μ L das leveduras competentes, 200 μ g de DNA de esperma de salmão (*Life Technologies*) e de 1-5 μ g de DNA plasmidial. Esta mistura foi incubada a 30°C por 30 minutos, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, foi adicionado uma solução contendo TE/LiAc/PEG 3350 40% (p/v) e incubada a 42°C por 30 minutos. A solução foi centrifugada a 1.000 *g* por 5 minutos, o sedimento foi lavado com tampão TE e centrifugado novamente como descrito anteriormente. O sedimento foi ressuspensão em 100 μ L de TE e

semeado em placas contendo meio semi-sólido SC-URA⁻ contendo rafinose 2% (p/v) e as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

3.29. Extração de DNA genômico dos clones selecionados

Os clones positivos selecionados foram inoculados em 5 mL de meio líquido SC-URA⁻ e incubados a 30°C por 18 horas, sob agitação de 200 rpm.

As culturas foram centrifugadas a 1.200 *g* por 5 minutos, os sedimentos foram ressuspensos em tampão de extração de DNA e adicionado pérolas de vidro de 425-600 μ m de diâmetro tratadas com ácido. As suspensões foram homogeneizadas mecanicamente por 10 minutos. As pérolas de vidro foram removidas, e a mistura foi transferida para novos tubos e adicionado o mesmo volume de fenol:clorofórmio (v/v) e novamente foram homogeneizados mecanicamente por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 4.000 *g* por 15 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado clorofórmio (v/v), homogeneizado e centrifugado novamente a 4.000 *g* por 5 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi coletado e adicionado 0,6 volumes de isopropanol (v/v). A suspensão foi centrifugada a 4.000 *g* por 1 minuto a 4°C, o sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado e centrifugado novamente como descrito acima. O sobrenadante foi removido e o sedimento incubado a temperatura ambiente para secagem. Após a secagem o sedimento foi ressuspenso em água deionizada estéril.

O DNA genômico foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*).

3.30. Indução da expressão de Ndt1 recombinante em *S. cerevisiae*

Uma colônia contendo o plasmídeo com o gene *ndt1* foi retirada da placa com meio semi-sólido SC-URA⁻ contendo rafinose 2% (p/v) e inoculada em meio líquido SC-URA⁻ contendo rafinose 2% (p/v) e incubada a 30°C por 18 horas, sob agitação de 200 rpm.

Para indução da expressão da proteína Ndt1 recombinante, a cultura primária foi diluída para uma DO_{600nm} de 0,4 em meio líquido SC-URA⁻ contendo galactose 2% (p/v). O vetor pYES2 está sob controle do promotor GAL1, dessa forma galactose foi adicionada ao meio de cultura para consequente expressão do gene *ndt1*.

Essa cultura foi incubada a 30°C por 54 horas, sob agitação de 200 rpm. Foram retiradas alíquotas do tempo 0, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 50 e 54 horas. Para o isolamento das mitocôndrias e determinação da curva de crescimento das leveduras, através da determinação da DO_{600nm}.

3.31. Avaliação da taxa de crescimento das cepas de *S. cerevisiae*

Para determinar a tolerância das cepas de *S. cerevisiae ndt1/pyes2* e *Δndt1Δndt2* aos desafios de crescimento em meio fermentativo com inibidores da proteína Ndt1 (batofenantrolina/piridoxal 5'-fosfato) e flavona, os experimentos foram realizados de acordo com Demase e colaboradores (2001) com modificações.

As células foram cultivadas em meio líquido SC-URA⁻ contendo galactose 2% (p/v) a 30°C por 16 horas, sob agitação de 200 rpm. Após este período a DO_{600nm} foi determinada e então diluídas para uma DO_{600nm} = 0,1. Em seguida,

quatro diluições seriadas de 1:10 foram realizadas e cada diluição semeada em meio de cultura fermentável semi-sólido SC-URA⁻ contendo galactose 2% (p/v); meio de cultura fermentável semi-sólido SC-URA⁻ contendo galactose 2% (p/v) acrescido de inibidores da proteína Ndt1 250 µmol/L ou flavona 250 µmol/L. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas.

3.32. Produção de esferoplastos de *S. cerevisiae* e isolamento de mitocôndrias

A produção dos esferoplastos e o isolamento de mitocôndrias foi realizado de acordo com GLAB *et al.* (1990), com algumas modificações. Inicialmente, as células de *S. cerevisiae* foram coletadas do meio de cultura por centrifugação a 3.000 *g* por 5 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com água deionizada e centrifugado nas mesmas condições descritas acima. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão de pré-incubação na proporção de 1 g de células úmidas para 4 mL de tampão e incubadas a 33°C por 30 minutos, sob agitação de 100 rpm.

Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas com água deionizada e tampão de digestão nas mesmas condições descritas acima. As células foram ressuspensas em tampão de digestão, na proporção de 1 g de células úmidas para 2 mL de tampão, e adicionado liticase 2 mg e DTT 2 mmol/L. A mistura foi incubada a 33°C por 45 minutos, sob agitação de 100 rpm. A digestão da parede celular foi acompanhada pela diminuição da densidade óptica a 600 nm que representa a lise celular em água. Os esferoplastos foram coletados por centrifugação a 9.000 *g* por 5 minutos a 4°C. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com tampão de digestão gelado e centrifugada nas mesmas condições descritas acima.

Para a lise celular, as células foram ressuspensas em tampão de lise gelado na proporção de 1,5 mL de tampão para cada 1 g de célula inicial, além disso, ao tampão foi acrescido de PMSF 2 mmol/L e PIC [1 mL para 20 g de sedimento (v/p)]. As células foram lisadas em um homogeneizador de tecido tipo *Dounce* com 10 movimentos de fricção. A mistura foi centrifugada a 2.000 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 18.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O sedimento, contendo as mitocôndrias foi ressuspenso em 1 mL de tampão de ressuspensão gelado para cada 1 g de célula inicial, a mistura foi então centrifugada a 2.000 *g* por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12.000 *g* por 20 minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi novamente ressuspenso em tampão de ressuspensão.

3.33. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi monitorado através das alterações da fluorescência da safranina O (concentração final de 5 $\mu\text{mol/L}$), em um espectrofluorímetro Hitachi F-7000 usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 495 nm e 586 nm, respectivamente, de acordo com Petrusa e colaboradores (1992), com algumas modificações.

As mitocôndrias foram incubadas com o meio de reação composto por: sacarose 125 mmol/L, cloreto de potássio (KCl) 65 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), BSA livre de ácidos graxos 0,1% (p/v), fosfato de potássio (KH_2PO_4) 1 mmol/L, cloreto de magnésio (MgCl_2) 1 mmol/L, EGTA 500 $\mu\text{mol/L}$ e ciclosporina A 0,4 $\mu\text{mol/L}$, em um volume final de 1,5 mL a 30°C.

O potencial de membrana foi induzido pela adição de NADH 1 mmol/L ou NAD^+ 5 mmol/L, o estado 3 mitocondrial foi determinado pela adição de ADP 400 nmoles e a inibição do translocador de ADP/ATP ocorreu pela adição de carboxiatractilosídeo 1 mmol/L. A adição de FCCP 20 $\mu\text{mol/L}$, colapsou completamente o potencial de membrana.

3.34. Determinação do transporte de NAD^+

O transporte de NAD^+ foi monitorado pela fluorescência de NADH de acordo com Mayevsky e Barbiro-Michaely (2009), em um espectrofluorímetro Hitachi F-7000 usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 366 nm e 450 nm, respectivamente, com algumas modificações.

As mitocôndrias foram incubadas com o meio de reação contendo sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES 10 mmol/L (pH 7,2), BSA livre de ácidos graxos 0,1% (p/v), KH_2PO_4 1 mmol/L, MgCl_2 1 mmol/L, EGTA 500 $\mu\text{mol/L}$ e ciclosporina A 0,4 $\mu\text{mol/L}$, em um volume final de 1,5 mL a 30°C.

O transporte foi iniciado pela adição de NAD^+ 5 mmol/L, e a inibição da cadeia respiratória pela adição antimicina A (AA) 2 $\mu\text{mol/L}$. A adição de FCCP 20 $\mu\text{mol/L}$, colapsou completamente o potencial de membrana. O tempo de cada reação utilizado foi 20 minutos a 30°C. Um experimento utilizando coquetel de substratos do complexo I (malato, α -cetoglutarato e piruvato) 5 mmol/L foi realizado como controle.

3.35. Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e superóxido mitocondrial em esferoplastos de *S. cerevisiae*

Para a determinação da formação de EROs nos esferoplastos de *S. cerevisiae* foi utilizada a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA (*Molecular Probes*) e para superóxido mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente *MitoSOX Red* (*Molecular Probes*).

As células, na concentração de 1×10^6 células/mL foram incubadas a 37°C por 30 minutos em tampão para esferoplastos na presença da sonda fluorescente CM-H₂DCFDA 5 µmol/L. A partir dessa incubação a sonda é hidrolisada por esterases da membrana plasmática adquirindo caráter polar e acumula-se no interior celular sofrendo oxidação na presença de espécies reativas de oxigênio. A molécula oxidada passa a emitir fluorescência nos comprimentos de onda de 492 nm de excitação e 517 nm de emissão. As leituras foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Hitachi F-7000 por 20 minutos a 30°C, sob agitação.

Para a determinação de superóxido mitocondrial, as células na concentração de 1×10^6 células/mL foram incubadas com a sonda *MitoSOX Red* 5 µmol/L por 10 minutos a 37°C. A sonda penetra nas células vivas, onde atingem seletivamente as mitocôndrias. Na presença de superóxido a sonda é oxidada, não reagindo com outras espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio, o produto oxidado é fluorescente, porque, liga-se a ácido nucleico. Como controle positivo da reação foi adicionado Antimicina A 5 µmol/L. As leituras foram realizada em citômetro de fluxo GUAVA EasyCyte (*Merck Millipore*) nos comprimentos de onda de 510 nm de excitação e 580 nm de emissão.

3.36. Determinação de proteínas carboniladas

A determinação das proteínas carboniladas foi realizado conforme descrito por Cunha, Demasi e Kowaltowski (2011). As proteínas carboniladas foram determinadas utilizando dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com os grupos carbonil formando dinitrofenilhidrazona (DNP).

As células para uma DO_{600nm} de 0,4 foram inoculadas em meio líquido SC-URA⁻ contendo galactose 2% (p/v) e cultivadas a 30°C por 16 horas, sob agitação de 200 rpm. Após esse período, as células de *S. cerevisiae* foram centrifugadas a 3.000 *g* por 5 minutos a 20°C. As células foram lavadas duas vezes com água deionizada e centrifugadas nas mesmas condições descritas acima e ressuspensas em tampão de lise [fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4), EDTA 1 mmol/L, glicerol 5% (v/v) e PMSF 1 mmol/L]. Em seguida, foram adicionadas pérolas de vidro de 425-600 μm de diâmetro, tratadas com ácido. Essa mistura foi agitada vigorosamente por 10 minutos, com ciclos de 30 segundos de agitação e 30 segundos no gelo. A suspensão foi centrifugada a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o extrato proteico total foi armazenado a - 20°C. A fração mitocondrial foi obtida conforme descrito no item 3.32.

A concentração de proteínas do extrato proteico total e da fração mitocondrial foram determinadas conforme descrito no item 3.20.

Em seguida, 150 μg do extrato proteico total e da fração mitocondrial foram incubadas com 1:1 volume de SDS 24% (p/v) e 1:1 volume de 2,4-dinitrofenilhidrazina, a solução foi agitada e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, a reação foi bloqueada com β -mercaptoetanol 25% (v/v). Cinco microgramas de proteínas foram utilizados para o

SDS-PAGE, conforme descrito no item 3.16. Logo após, foi realizada a imunodeteção por *Western Blotting* conforme descrito no item 3.18, utilizando anticorpo anti-DNP (*Sigma Aldrich*) na diluição 1:10.000.

3.37. Análise estatística

A análise estatística para comparação entre os valores de produção de EROs e superóxido mitocondrial em esferoplastos, bem como das proteínas carboniladas foi realizado através do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA. Análise foi realizada utilizando o teste de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas com $p < 0,05$.

3.38. Microscopia confocal

A microscopia confocal foi realizada conforme descrito por Atkin (1999), com algumas modificações.

Inicialmente os esferoplastos foram produzidos como descrito no item 3.32.. As lamínulas foram incubadas com poli-D lisina 0,1% (p/v) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com água deionizada.

Os esferoplastos em suspensão na concentração de 6×10^7 células/mL, foram incubados com *MitoTracker® Deep Red* (*Molecular Probes*) na concentração de 400 nmol/L a 37°C por 30 minutos, essa sonda fluorescente é dependente do potencial de membrana mitocondrial. Após esse período, as células foram lavadas

uma vez com tampão de esferoplastos e centrifugadas a 7.000 *g* por 5 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas nas lamínulas a temperatura ambiente por 1 hora, e logo após as células foram fixadas nas lamínulas com metanol -20°C por 6 minutos e com acetona -20°C por 30 segundo, as lamínulas foram lavadas com PBS/BSA 5% (p/v) e incubadas com anticorpo primário anti-Ndt1 na diluição 1:100 a 4°C por 48 horas em ambiente úmido.

Após esse período, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS/BSA 5% (p/v) e incubadas com anticorpo secundário anti-*rabbit* Alexa 488 (*Molecular Probes*) na concentração 1:1.000 a temperatura ambiente por 2 horas em ambiente úmido. As lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS/BSA 5% (p/v) e incubadas com DAPI 1 µg/mL a temperatura ambiente por 15 minutos.

Em seguida, às lâminas foi adicionada uma gota de meio de montagem (*Dako*) e as lamínulas foram colocadas em cima e vedadas com esmalte. Após a secagem foram observadas em microscópio confocal modelo TCS SP8 (*Leica Microsystems*).

4 - Resultados

4.1. Sequenciamento do gene *ndt1* de *A. fumigatus*

A partir de uma sequência de cDNA provável do gene do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (*ndt1*) de *A. fumigatus*, previamente clonada em vetor pTZ57R/T em nosso laboratório, foi realizado o sequenciamento através de *primer walking*. Após o sequenciamento completo do gene, foi realizado o alinhamento das sequências de DNA genômico, do cDNA do gene de *A. fumigatus* depositados no *GenBank* (NC_007197-1 e XM_747055-1, respectivamente) e do cDNA sequenciado do clone (Figura 3).

XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	ATGTTTTCCGACGGTCACGGCAATTCAGGAGCCACCAGCAGCTCTGAAGAGCAGCAGATA ATGTTTTCCGACGGTCACGGCAATTCAGGAGCCACCAGCAGCTCTGAAGAGCAGCAGATA ATGTTTTCCGACGGTCACGGCAATTCAGGAGCCACCAGCAGCTCTGAAGAGCAGCAGATA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	TCGCAGTCGAACAACCTTGCGTCATCCGACATTCAAGTTCACCTGAAGCTGCTTCCAGC TCGCAGTCGAACAACCTTGCGTCATCCGACATTCAAGTTCACCTGAAGCTGCTTCCAGC TCGCAGTCGAACAACCTTGCGTCATCCGACATTCAAGTTCACCTGAAGCTGCTTCCAGC *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	CCCAAGTTCGTCACAAACCTTGAGATATGGTCCACGAAGATACCGGATTACTACGTTGCT CCCAAGTTCGTCACAAACCTTGAGATATGGTCCACGAAGATACCGGATTACTACGTTGCT CCCAAGTTCGTCACAAACCTTGAGATATGGTCCACGAAGATACCGGATTACTACGTTGCT *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	CCATTCTGCGGCGCCAGTGCGGGTGTGGCCTCTGGGATTGTACATGCCCCCTTGATGTG CCATTCTGCGGCGCCAGTGCGGGTGTGGCCTCTGGGATTGTACATGCCCCCTTGATGTG CCATTCTGCGGCGCCAGTGCGGGTGTGGCCTCTGGGATTGTACATGCCCCCTTGATGTG *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	ATCAAGACGAAGCTGCAGGCACAAGGCGGATTTCTCCGACGAGGCGGCGGAGTCGTTGAG ATCAAGACGAAGCTGCAGGCACAAGGCGGATTTCTCCGACGAGGCGGCGGAGTCGTTGAG ATCAAGACGAAGCTGCAGGCACAAGGCGGATTTCTCCGACGAGGCGGCGGAGTCGTTGAG *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	GCGAAAACCCCTTTATCGTGGTATGCTAGGTACTGGGCGGATCATATGGCGGCAAGATGGA GCGAAAACCCCTTTATCGTGGTATGCTAGGTACTGGGCGGATCATATGGCGGCAAGATGGA GCGAAAACCCCTTTATCGTGGTATGCTAGGTACTGGGCGGATCATATGGCGGCAAGATGGA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	ATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTCTTGGGATATCTGCCTACGTGGGCC ATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTCTTGGGATATCTGCCTACGTGGGCC ATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTCTTGGGATATCTGCCTACGTGGGCC *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	GTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATACTTCTACGAAACCACCG----- GTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATACTTCTACGAAACCACCGGTAAGTAT GTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATACTTCTACGAAACCACCG----- *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	----- CTCTGTGTGTTCCGTTCCGGAGGTAGGATGTAAAGCCTAATAATTGCGCTCACGCCAACA -----
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	----- GATAGCTGGTGGCTTTCCAGAGGCTATGCGTCGATAACAGCCGGTGCTTGTCTACTATA GATAGCTGGTGGCTTTCCAGAGGCTATGCGTCGATAACAGCCGGTGCTTGTCTACTATA -----

XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	-TGACTAATCCAATCTGGGTCATTAAACGCGGCTTATGTCACAGAGCCTCAAGTCCAAC GTGACTAATCCAATCTGGGTCATTAAACGCGGCTTATGTCACAGAGCCTCAAGTCCAAC CTGACTAATCCAATCTGGGTCATTAAACGCGGCTTATGTCACAGAGCCTCAAGTCCAAC *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	AGTGAAGGCTACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGATGCAGCCCGCAAATG AGTGAAGGCTACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGATGCAGCCCGCAAATG AGTGAAGGCTACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGATGCAGCCCGCAAATG *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	TACAGGATCGAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCGCGTTACTCGGCTTA TACAGGATCGAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCGCGTTACTCGGCTTA TACAGGATCGAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCGCGTTACTCGGCTTA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	ACGCACGTCGCTATTCAATCCCCTATACGAATACTTGAAGATGGCCTTTACTGGGTAC ACGCACGTCGCTATTCAATCCCCTATACGAATACTTGAAGATGGCCTTTACTGGGTAC ACGCACGTCGCTATTCAATCCCCTATACGAATACTTGAAGATGGCCTTTACTGGGTAC *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	GGGATAGGGGAACATCCTGATAACGGTGGCTCTCACTGGATTGGCATATCCTGTGCGACA GGGATAGGGGAACATCCTGATAACGGTGGCTCTCACTGGATTGGCATATCCTGTGCGACA GGGATAGGGGAACATCCTGATAACGGTGGCTCTCACTGGATTGGCATATCCTGTGCGACA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	TTCTTAAGCAAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAAGTGCTACGGACAAGA TTCTTAAGCAAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAAGTGCTACGGACAAGA TTCTTAAGCAAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAAGTGCTACGGACAAGA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	CTTCAGACACAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGTATCTCATTTCTGTGA CTTCAGACACAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGTATCTCATTTCTGTGA CTTCAGACACAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGTATCTCATTTCTGTGA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	GGGCTAGATCACCCACAAGACCGCGGGCGGCTCCAGGAGCGGCTTCATCGGACGGCATG GGGCTAGATCACCCACAAGACCGCGGGCGGCTCCAGGAGCGGCTTCATCGGACGGCATG GGGCTAGATCACCCACAAGACCGCGGGCGGCTCCAGGAGCGGCTTCATCGGACGGCATG *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	CCCAACCGCCCTCGGTATACGGCGTGATCCGTACATGTCAGACCATCCTGAGGGAGGAA CCCAACCGCCCTCGGTATACGGCGTGATCCGTACATGTCAGACCATCCTGAGGGAGGAA CCCAACCGCCCTCGGTATACGGCGTGATCCGTACATGTCAGACCATCCTGAGGGAGGAA *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	GGCTGGCGCGCATTTCTACTCCGGCATCGGGGTGAATCTATTCCGGGCTGTGCCGGCTGCC GGCTGGCGCGCATTTCTACTCCGGCATCGGGGTGAATCTATTCCGGGCTGTGCCGGCTGCC GGCTGGCGCGCATTTCTACTCCGGCATCGGGGTGAATCTATTCCGGGCTGTGCCGGCTGCC *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	ATGACCACAATGCTTACATACGAGTATCTCCGTAAGCTGATCGGTCACTTGCAACATGAG ATGACCACAATGCTTACATACGAGTATCTCCGTAAGCTGATCGGTCACTTGCAACATGAG ATGACCACAATGCTTACATACGAGTATCTCCGTAAGCTGATCGGTCACTTGCAACATGAG *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	GGAGAGATGAAGCTGCGCATGGCAAATGATAGAGAAATAGCCTTGCTGCAGCAGGATGAG GGAGAGATGAAGCTGCGCATGGCAAATGATAGAGAAATAGCCTTGCTGCAGCAGGATGAG GGAGAGATGAAGCTGCGCATGGCAAATGATAGAGAAATAGCCTTGCTGCAGCAGGATGAG *****
XM_747055-1 NC_007197-1 Ndt1_sequenciado	TAA TAA TAA ***

Figura 3: Alinhamento das sequências de DNA genômico, do cDNA do gene de *A. fumigatus* depositados no *GenBank* (NC_007197-1 e XM_747055-1, respectivamente) e o cDNA sequenciado.

*Resíduos totalmente conservados;

- Região não consenso;

Em amarelo o íntron;

Em roxo os 61 nucleotídeos adicionais.

Foram sequenciados outros clones que continham a sequência de cDNA provável do gene *ndt1*. Os sequenciamentos mostraram que todos os clones possuíam os 61 nucleotídeos adicionais. Quando esta sequência foi clonada em pET28-a(+), houve a expressão de uma proteína truncada de aproximadamente 10 kDaltons (não apresentado).

Assim, para obtermos a sequência sem a presença desses nucleotídeos foi realizada a técnica de *PCR-overlapping*.

4.2. Extração e isolamento de DNA genômico de *A. fumigatus*

Inicialmente, o DNA genômico foi isolado do micélio de *A. fumigatus*, que após o tratamento com a RNase A foi submetido a eletroforese em gel de agarose. A eletroforese mostra que a extração apresentou-se com uma banda única, íntegra e sem arrastes (Figura 4) com aproximadamente 23 kb.

Figura 4: DNA genômico de *A. fumigatus*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. A seta indica a banda de DNA genômico.

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: DNA isolado de *A. fumigatus* (250 ng).

4.3. Padronização da temperatura de anelamento dos *primers*

Uma vez obtido o DNA íntegro e puro, o mesmo foi utilizado como molde para os experimentos de PCR. O DNA genômico foi utilizado para amplificação do gene *ndt1*, utilizando os *primers* obtidos a partir da sequência de cDNA depositado no *GenBank* (tabela 1).

A figura 5 apresenta os produtos amplificados, sendo observado que o melhor perfil termal e concentração de íons de magnésio foi de 67°C, 1,5 mmol/L de Mg^{2+} , respectivamente e na ausência de DMSO (figura 5, canaleta 4). Nesta condição houve uma maior amplificação e ausência de bandas inespecíficas, diferentemente das outras condições avaliadas onde ocorreu uma menor amplificação e presença de algumas bandas inespecíficas.

Figura 5: Produtos de PCR obtidos com a amplificação do gene *ndt1* com diferentes concentrações de Mg^{2+} , com e sem DMSO e temperatura de anelamento de 63°C e 67°C. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica os fragmentos amplificados com o tamanho esperado.

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: 63°C, 1,5 mmol/L de Mg^{2+} , com DMSO;

2: 63°C, 1,5 mmol/L de Mg^{2+} , sem DMSO;

3: 67°C, 1,5 mmol/L de Mg^{2+} , com DMSO;

4: 67°C, 1,5 mmol/L de Mg^{2+} , sem DMSO;

5: 63°C, 3 mmol/L de Mg^{2+} , com DMSO;

6: 63°C, 3 mmol/L de Mg^{2+} , sem DMSO;

7: 67°C, 3 mmol/L de Mg^{2+} , com DMSO;

8: 67°C, 3 mmol/L de Mg^{2+} , sem DMSO.

Em seguida, foi realizada a padronização para amplificação dos fragmentos da *PCR-overlapping* utilizando os *primers* descritos na tabela 1. A figura 6 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.

A melhor condição para amplificar os fragmentos de tamanho esperado, de 472 pb e 722 pb pela *PCR-overlapping* foi de 60°C, pois nas duas temperaturas utilizadas (figura 6) houve uma amplificação e ausência de bandas inespecíficas, porém optou-se pela menor temperatura para ficar mais distante da temperatura de extensão da Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (*Finnzymes*) e foi utilizada a concentração final de 1,5 mmol/L de Mg^{2+} .

Figura 6: Produtos de PCR obtidos com a amplificação do gene *ndt1* previamente clonado. Temperaturas de anelamento de 60°C e 65°C, com 1,5 mmol/L de Mg^{2+} . Eletroforese em gel de agarose 1,8% (p/v) em tampão TAE. A seta indica os fragmentos amplificados com o tamanho esperado (472 pb e 722 pb, respectivamente).

M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (*New England Biolabs*);

1: 60°C;

3: 60°C;

2: 65°C;

4: 65°C.

4.4. *PCR-overlapping*

A figura 7 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados pela técnica de *PCR-overlapping*, os fragmentos foram amplificados com

o tamanho esperado (472 pb e 722 pb) e a reação não apresentou nenhuma banda inespecífica e todo o *primer* adicionado ao meio de reação foi consumido.

Figura 7: Produtos de PCR obtidos com a amplificação de cada fragmento do gene *ndt1*. Eletroforese em gel de agarose 1,8% (p/v) em tampão TAE. A seta indica os fragmentos amplificados com o tamanho esperado (472 pb e 722 pb, respectivamente).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Éxon 1;

2: Éxon 2.

Uma vez obtido os fragmentos amplificados de 472 pb e 722 pb, os mesmos foram extraídos e purificados do gel de agarose. Para a reação de amplificação dos fragmentos foi utilizada a enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (*Invitrogen*) para que houvesse um menor risco de introduzir mutações. Essa reação foi realizada na proporção 2:1 (fragmento de 472 pb: fragmento de 722 pb). A figura 8 apresenta a reação de PCR-*overlapping*, mostrando que os produtos obtidos com a amplificação de cada fragmento ainda restaram com maior intensidade, e com menor intensidade a banda com tamanho esperado (1.194 pb).

Figura 8: Produtos da reação de *PCR-overlapping* do gene *ndt1*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A caixa vermelha indica o produto amplificado com o tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1 - 2: Amplificação do gene *ndt1*.

A banda do tamanho esperado (1.194 pb) foi extraída do gel de agarose e purificada, para subsequente reação de ligação com vetor de clonagem pGEM®-T Easy (*Promega*) utilizando a razão molar de 1:1 (inserto/vetor). Bactérias *E. coli* da linhagem DH10β foram transformadas com a reação de ligação e a seleção dos clones foi realizada na presença de ampicilina. A confirmação dos clones positivos foi realizada através de uma PCR de colônia. A figura 9 apresenta o gel de agarose dos produtos obtidos com a PCR de colônia e mostra que apenas o clone 2 foi positivo, apresentando uma amplificação do tamanho esperado (1.194 pb). Em seguida, o DNA plasmidial desse clone foi extraído para a confirmação da clonagem com enzimas de restrição e sequenciamento.

Figura 9: Produtos de PCR de colônia com a construção pGEM/*ndt1*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. Canaleta 2, marcado com a caixa vermelha indica o clone positivo com a amplificação do tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1-16: clones selecionados.

O DNA plasmidial da construção pGEM/*ndt1* foi submetido a uma reação de digestão, sendo incubado com as enzimas de restrição *Bam*HI (*Invitrogen*) e *Not*I (*Thermo Scientific*), essas enzimas digerem nas extremidades do sítio de clonagem. A figura 10 apresenta o produto da digestão do DNA plasmidial (canaleta 1) e também a digestão do vetor pET28-a(+) com as mesmas enzimas de restrição, *Bam*HI e *Not*I (canaleta 2). A digestão do DNA plasmidial mostra a presença de dois fragmentos de DNA, um de 3.000 pb, referente ao vetor pGEM®-T Easy e o outro de 1.194 pb, referente ao gene *ndt1*.

Figura 10: Produtos da digestão com *Bam*HI e *Not*I. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento liberado do vetor.

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Digestão da construção pGEM/*ndt1*;

2: Digestão do vetor pET-28a(+).

O fragmento e o vetor pET28-a(+), foram submetidos a uma reação de ligação na razão molar 3:1 (inserto/vetor). Logo após a reação de ligação as bactérias *E. coli* da linhagem DH10 β foram transformadas e a seleção dos clones em placa foi realizada na presença do antibiótico kanamicina. Os clones selecionados foram submetidos a uma reação de PCR de colônia para confirmação da amplificação do gene de interesse. A figura 11, apresenta a eletroforese em gel de agarose da PCR de colônia, sendo que apenas o clone 2 não apresentou amplificação.

Figura 11: Produto da PCR de colônia com a construção pET28/*ndt1*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento amplificado com o tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1, 3-16: Clones positivos selecionados;

2: Clone negativo.

Para a confirmação da construção pET28/*ndt1* os clones 3, 9 e 15 foram submetidos a extração do DNA plasmidial, e esse foi incubado com as enzimas de restrição *Bam*HI (*Invitrogen*) e *Not*I (*Thermo Scientific*). A figura 12 apresenta a reação de digestão submetida à eletroforese. Os três clones submetidos à reação de digestão apresentam duas bandas, a primeira referente ao vetor de 5.369 pb e a segunda do inserto de 1.194 pb, confirmando a construção.

Figura 12: Digestão dos clones 3, 9 e 15, respectivamente. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento liberado com o tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Digestão do clone 3 da construção pET/*ndt1*;

2: Digestão do clone 9 da construção pET/*ndt1*;

3: Digestão do clone 15 da construção pET/*ndt1*.

Em seguida, os clones obtidos das construções: clone 2 pGEM/*ndt1*, clone 3 pET/*ndt1* foram submetidos a reação de sequenciamento.

O resultado do sequenciamento dos dois clones positivos foi comparado com sequência depositada no GenBank. Ambos os clones apresentaram uma similaridade de 96 a 100% de identidade com a sequência depositada no GenBank, não houve formação de códon de parada e o códon iniciador estava correto (não apresentado).

4.5. Indução da expressão da proteína Ndt1 em *E. coli*

Após a confirmação através da digestão e sequenciamento da construção pET/*ndt1*, sem alteração de nucleotídeos que gerasse um códon de parada, o clone 3 pET/*ndt1* foi transformado em bactéria *E. coli* da linhagem BL21(DE3).

A indução da expressão da proteína recombinante Ndt1 foi realizada em três condições de temperatura: 25°C, 30°C e 37°C. Como indutor foi utilizado o IPTG na concentração de 1 mmol/L, sendo que o tempo após a indução foi de 4 horas de crescimento. Para cada condição de expressão foram retiradas três alíquotas: T0, sem adição de indutor; T2, 2 horas após a indução e T4, 4 horas após a indução. Essas alíquotas foram utilizadas para análise da expressão da proteína recombinante Ndt1. A figura 13 apresenta a eletroforese em gel de poliácridamida com as diferentes condições de expressão. A escolha da melhor condição de expressão da proteína recombinante foi realizada analisando a intensidade das bandas entre os tempos e as condições variadas. Assim, a melhor condição de expressão da proteína recombinante foi 4 horas de indução com IPTG 1 mmol/L a 37°C (canaleta 9).

Figura 13: Expressão em pequena escala da proteína recombinante Ndt1, com as temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C com a concentração final de 1 mmol/L de IPTG. Eletroforese em gel de poliácridamida 10%. Coloração com *Coomassie brilliant blue* 0,25% (p/v). A seta indica a proteína recombinante com o tamanho esperado (44 kDa).

M: Marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*);

1: Sem adição de indutor à 25°C;

2: 2 horas de indução à 25°C;

3: 4 horas de indução à 25°C;

4: Sem adição de indutor à 30°C;

5: 2 horas de indução à 30°C;

6: 4 horas de indução à 30°C;

7: Sem adição de indutor à 37°C;

8: 2 horas de indução à 37°C;

9: 4 horas de indução à 37°C.

Após a escolha da melhor condição de expressão, foi realizado um teste de solubilidade da proteína recombinante também utilizando todas as condições anteriormente avaliadas. O teste de solubilidade fornece duas frações, a fração solúvel, onde são encontradas proteínas que se solubilizaram e a fração insolúvel, que são agregados proteicos formando os corpos de inclusão. A figura 14 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida com o teste de solubilidade da proteína recombinante nas diferentes condições avaliadas. A condição que apresentou maior quantidade da proteína recombinante na fração insolúvel, após 4 horas de indução a 37°C (figura 14, canaleta 8). Esta condição foi escolhida para a expressão e purificação da proteína recombinante dos corpos de inclusão.

Figura 14: Teste de solubilidade da proteína recombinante Ndt1, com as temperaturas: 25°C, 30°C e 37°C. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Coloração com *Coomassie brilliant blue* 0,25% (p/v). A seta indica a proteína recombinante com o tamanho esperado (44 kDa).

M: Marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*);

- 1: Sem adição de indutor à 37°C;
- 2: 4 horas de indução à 37°C;
- 3: Fração solúvel 4 horas de indução à 25°C;
- 4: Fração solúvel 4 horas de indução à 30°C;
- 5: Fração solúvel 4 horas de indução à 37°C;
- 6: Fração insolúvel 4 horas de indução à 25°C;
- 7: Fração insolúvel 4 horas de indução à 30°C;
- 8: Fração insolúvel 4 horas de indução à 37°C.

4.6. Purificação da proteína recombinante Ndt1 dos corpos de inclusão

Os corpos de inclusão foram obtidos após as lavagens do sedimento e em seguida, os mesmos foram submetidos ao processo de desnaturação com detergentes para obtenção da proteína Ndt1 recombinante. A figura 15 apresenta a eletroforese em gel de poliacrilamida da purificação da proteína recombinante Ndt1 a partir dos corpos de inclusão, mostrando que após a remoção do detergente através da diálise, a proteína purificada apresentou duas bandas (canaleta 9), uma banda de 44 kDa e outra de aproximadamente 40 kDa.

Figura 15: Purificação da proteína recombinante Ndt1 dos corpos de inclusão. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Coloração com *Coomassie brilliant blue* 0,25% (p/v). A seta indica a proteína recombinante com o tamanho esperado (44 kDa).

M: Marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*);

1: Sem adição de indutor à 37°C;

2: 4 horas de indução à 37°C;

3: Corpos de inclusão em tampão de ressuspensão;

4: Corpos de inclusão após a primeira lavagem;

5: Corpos de inclusão após a quinta lavagem;

6: Corpos de inclusão após a primeira ressuspensão para remoção do detergente;

7: Corpos de inclusão após a terceira ressuspensão para remoção do detergente;

8: Corpos de inclusão desnaturado;

9: Corpos de inclusão desnaturado após a diálise.

Para confirmação da purificação, ainda foi realizado a eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração por prata (figura 16). Essa coloração mostrou a presença de duas bandas, uma do tamanho esperado e outra banda menor, não evidenciando nenhuma outra proteína proveniente da bactéria que pudesse ter permanecido após o processo de purificação.

Figura 16: Proteína recombinante Ndt1 purificada com duas concentrações diferentes: 2 µg e 1 µg. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Coloração por prata. A seta indica a proteína recombinante com o tamanho esperado (44 kDa).

M: Marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*);

1: Proteína purificada - 2 µg;

2: Proteína purificada - 1 µg.

A presença de mais de uma banda na eletroforese, poderia ser decorrente de um processo de degradação durante a purificação. Assim, para verificar se era a proteína recombinante Ndt1 degradada, foi realizado um *Western blotting*, utilizando anticorpo anti-(His)6-Tag, uma vez que o vetor utilizado promove a adição de uma cauda de histidina. A figura 17 apresenta a detecção por quimioluminescência do *Western blotting*, mostrando que as duas bandas foram marcadas pelo anticorpo e ainda há um arraste com a presença de uma terceira banda em torno de 25 kDa.

Figura 17: *Western Blotting* da proteína recombinante Ndt1 purificada com duas concentrações diferentes: 1 µg e 2 µg. Utilizando anticorpo anti-(His)6-Tag na diluição 1:3000. A seta indica a proteína recombinante com o tamanho esperado (44 kDa).

M: Marcador Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (BIO-RAD);

1: *Western Blotting* da proteína purificada Ndt1 - 1 µg;

2: *Western Blotting* da proteína purificada Ndt1 - 2µg.

Para confirmar a degradação durante o processo de purificação, as duas bandas foram purificadas do gel de poliacrilamida e enviadas ao Laboratório de Química de Proteínas (Hemocentro/FMRP) para determinação por espectrometria de massas. A sequência da proteína recombinante Ndt1 com tamanho de 44 kDa apresentou 100% de identidade com a sequência deduzida de aminoácidos depositado no GenBank (acesso XP_752148-1), confirmando assim, que a proteína recombinante expressa e purificada em nosso laboratório era o transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *A. fumigatus*.

A proteína com menor peso molecular também apresentou alta similaridade com a sequência depositada no GenBank. Essa proteína apresentando 90% de similaridade, confirmando que era a proteína recombinante que foi degradada durante o processo de purificação.

4.7 - Produção e purificação do anticorpo anti-Ndt1

Após as imunizações, o soro obtido dos animais foi reunido e foi realizada a técnica de imunodifusão radial dupla.

As figura 18 e 19 apresentam as fotos das placas de imunodifusão. As linhas coradas indicam a formação do complexo antígeno-anticorpo insolúvel, resultado da reação entre Ndt1 e IgG anti-Ndt1. Este resultado confirma a presença do anticorpo específico, e que a provável proporção de antígeno-anticorpo do ponto de equivalência é: anticorpo diluído e antígeno não diluído 1:8 (figura 18) e anticorpo não diluído e antígeno diluído 1:4 (figura 19).

Figura 18: Imunodifusão utilizando anticorpo diluído e antígeno não diluído. Placa corada com *Coomassie Brilliant Blue "G"*. A seta vermelha indica a formação do complexo antígeno-anticorpo.

Figura 19: Imunodifusão utilizando anticorpo não diluído e antígeno diluído. Placa corada com *Coomassie Brilliant Blue "G"*. A seta vermelha indica a formação do complexo antígeno-anticorpo.

Após essas titulações, o sangue dos animais foi coletado e submetido à purificação de IgG anti-Ndt1. A figura 20 apresenta, as frações cromatográficas obtidas com a purificação do anticorpo. O pico 1 representa a fração de IgG que são as primeiras proteínas a serem eluídas da coluna de cromatografia, o pico 2 representa as demais imunoglobulinas que são eluídas após a adição de NaCl 1 M no tampão fosfato.

Figura 20: Gráfico com as frações cromatográficas eluídas da coluna cromatográfica.

Para confirmação da capacidade de reconhecimento do anticorpo anti-Ndt1 purificado foi realizado um *Western Blotting*. A figura 21 apresenta a detecção por quimioluminescência do *Western Blotting*, mostrando que houve marcação específica para a proteína recombinante Ndt1 purificada (canaleta 1), bem como as bandas da degradação também foram marcadas mostrando um arraste. No tempo T4 houve marcação da proteína recombinante expressa em *E. coli* BL21(DE3) (canaleta 2), porém não houve nenhuma marcação no T0, antes da indução da expressão com IPTG (canaleta 3).

Figura 21: *Western Blotting* utilizando anticorpo anti-Ndt1 purificado na diluição 1:20000. A seta indica a proteína recombinante com o tamanho esperado (44 kDa).

- 1: Proteína purificada Ndt1;
- 2: 4 horas de indução à 37°C;
- 3: Sem adição do indutor.

4.8. Clonagem em vetor pYES2

A sequência do gene *ndt1* anteriormente clonada foi utilizada como molde para a amplificação com os *primers* específicos, contendo a sequência Kozak para o vetor pYES2. A figura 22 apresenta a eletroforese em gel de agarose da reação de

PCR. O produto da amplificação apresenta o tamanho esperado de aproximadamente 1.200 pb e não houve presença de bandas inespecíficas. A banda do tamanho esperado (1.194 pb) foi extraída do gel de agarose, purificada e ligada em vetor de clonagem pGEM®-T Easy (*Promega*), utilizando a razão molar de 3:1 (inserto/vetor).

Figura 22: Produto de PCR com os *primers* para o vetor pYES2. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento com o tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Produto de PCR.

As bactérias *E. coli* da linhagem DH10 β foram transformadas com a reação de ligação e a seleção dos clones foi realizada na presença de ampicilina. A confirmação dos clones positivos foi realizada através de uma PCR de colônia. A figura 23 mostra que apenas os clones 1 e 6 foram positivos com uma amplificação do tamanho esperado ($\approx$ 1.200 pb).

Figura 23: Produto da PCR de colônia da construção pGEM/ndt1 para pYES2. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento amplificado dos clones positivos com o tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1 e 6: Clones positivos selecionados;

2 - 5: Clones negativos.

O DNA plasmidial dos clones positivos foram extraídos para confirmação da construção pGEM/ndt1. O DNA plasmidial foi restringido com as enzimas *BamHI* (*Invitrogen*) e *NotI* (*Thermo Scientific*). A figura 24-A apresenta a restrição do DNA plasmidial, onde mostra a presença de dois fragmentos de DNA, um de 3.000 pb, referente ao vetor pGEM®-T Easy e o outro de 1.000 pb, referente ao gene *ndt1*. A figura 24-B apresenta a digestão do vetor pYES2 com as mesmas enzimas de restrição.

Figura 24-A: Produtos da digestão do DNA plasmidial com *Bam*HI e *Not*I. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento liberado do vetor com tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Digestão da construção pGEM/*ndt1* para pYES2 – clone 1;

2: Digestão da construção pGEM/*ndt1* para pYES2 – clone 6.

Figura 24-B: Vetor pYES2 digerido com *Bam*HI e *Not*I. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o vetor digerido com tamanho esperado (5.900 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Digestão do vetor pYES2.

O fragmento de ≈ 1.200 e o vetor pYES2 digeridos foram extraídos do gel de agarose, purificados e ligados, na razão molar 3:1 (inserto/vetor). As bactérias transformadas com a reação de ligação foram selecionadas utilizando antibiótico ampicilina. Os clones foram submetidos a uma reação de PCR. A figura 25 apresenta a eletroforese em gel de agarose da PCR de colônia, mostrando que os clones 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 e 15 apresentaram uma amplificação com o tamanho esperado (≈ 1.200 pb). Destes clones positivos, os clones 1, 2 e 9 foram

selecionados para a extração do DNA plasmidial e consequente digestão e sequenciamento para confirmação da clonagem.

Figura 25: Produtos da PCR de colônia da construção *pYES2/ndt1*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento amplificado dos clones positivos com o tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1; 2; 5; 6; 7; 8; 9 e 10: Clones positivos;

3; 4 e 11: Clones negativos;

12; 13; 14 e 15: Clones positivos.

A figura 26 apresenta a eletroforese em gel de agarose das restrições dos clones 1, 2 e 9 da construção *pYES2/ndt1* com as enzimas *BamHI* (*Invitrogen*) e *NotI* (*Thermo Scientific*), onde mostra a presença de duas bandas, uma de 5.900 pb, referente ao vetor e outra de ≈ 1.200 pb, referente ao fragmento do gene *ndt1*.

Figura 26: Produtos da digestão com *Bam*HI e *Not*I. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o fragmento liberado do vetor com tamanho esperado (1.194 pb).

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1: Digestão da construção *pYES2/ndt1* – clone 1;

2: Digestão da construção *pYES2/ndt1* – clone 2;

3: Digestão da construção *pYES2/ndt1* – clone 9.

Em seguida, os clones obtidos na clonagem utilizando o vetor pGEM®-T Easy e o vetor pYES2 foram submetidos a reação de sequenciamento. O resultado do sequenciamento dos clones positivos foi comparado com a sequência depositada no *GenBank*. Os clones apresentaram uma similaridade de 96 a 100% com a sequência depositada no *GenBank*, não houve formação de códon de parada e o códon iniciador estava correto, assim como a fase de leitura.

4.9. Extração do DNA genômico de *S. cerevisiae* e PCR

Foram selecionados 18 clones positivos contendo a construção *pYES/ndt1* e 2 clones contendo o vetor pYES2 vazio, e os mesmos foram crescidos em meio líquido SC-URA⁻ contendo rafinose 2% (p/v). Os DNAs genômicos foram extraídos e submetidos a PCR para confirmação da presença do gene *ndt1*.

A figura 27 apresenta os produtos amplificados de ≈ 1.200 pb, tamanho correspondente ao gene *ndt1*. As canaletas 1 e 2 apresentam o produto de PCR utilizando como molde o DNA genômico de *S. cerevisiae* cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$, transformado com o vetor pYES2 vazio. Nessas canaletas, foi observado que não houve consumo dos *primers* adicionados na reação. As canaletas seguintes (3-19) apresentam o produto de PCR com a presença da amplificação do fragmento correspondente ao gene *ndt1*. Nessas canaletas foi observado que houve o consumo dos *primers* adicionados na reação e não ocorreu presença de banda inespecífica. Os clones 2 e 12 foram selecionados para os ensaios posteriores de expressão da proteína Ndt1 recombinante.

Figura 27: Produtos de PCR obtidos com amplificação do gene *ndt1* utilizando DNA genômico de *S. cerevisiae*. Eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), em tampão TAE. A seta indica o fragmento amplificado com o tamanho esperado.

M: Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (*Invitrogen*);

1-19: Produtos de PCR.

4.10. Indução da expressão da proteína recombinante Ndt1 e avaliação da taxa de crescimento das cepas de *S. cerevisiae*

A figura 28 apresenta a curva de crescimento das leveduras crescidas em meio líquido SC-URA⁻ com galactose 2% (p/v). A partir de 8 horas a cepa expressando a proteína Ndt1 apresenta um crescimento ligeiramente maior que a cepa controle e a partir de 16 horas o crescimento é mais evidente.

Figura 28: Curva de crescimento das cepas de *S. cerevisiae*. A cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ é representada pela linha tracejada (- - -); a cepa *pYES/ndt1* é representada pela linha preta (—). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Em mitocôndrias isoladas a partir das amostras colhidas em 4, 8 e 16 horas, foi possível detectar a presença de uma banda correspondente a 44 kDa, apenas no tempo de 16 horas (figura 29, canaleta 5). Como proteína constitutiva foi utilizado citocromo C, pois está é uma proteína presente em todas as mitocôndrias e um dos poucos anticorpos comerciais com reação cruzada para proteína mitocondrial de levedura.

Figura 29: Western Blotting das mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e *pYES/ndt1* em diferentes tempos de crescimento, utilizando anticorpo anti-Ndt1 na diluição 1:10.000 e anti-citocromo C 1:2.000.

- 1: Mitocôndria isolada da cepa *pYES/ndt1* com 4 horas de expressão;
- 2: Mitocôndria isolada da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ com 4 horas de expressão;
- 3: Mitocôndria isolada da cepa *pYES/ndt1* com 8 horas de expressão;
- 4: Mitocôndria isolada da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ com 8 horas de expressão;
- 5: Mitocôndria isolada da cepa *pYES/ndt1* com 16 horas de expressão;
- 6: Mitocôndria isolada da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ com 16 horas de expressão.

Posteriormente a determinação da expressão da proteína Ndt1 recombinante, foram realizados ensaios para avaliação da taxa de crescimento das cepas de *S. cerevisiae* e consequente avaliação do papel da proteína no crescimento das cepas em meio fermentável e na presença de inibidores da proteína Ndt1 e flavona, inibidor das NADH desidrogenases alternativas.

As cepas foram semeadas em diferentes diluições e após 48 horas a 30°C foi avaliada a taxa de crescimento. Em meio fermentável sem inibidores houve uma diminuição na taxa de crescimento na cepa que não expressa o transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (figura 30-A).

Em meio de cultura fermentável acrescido com inibidores da proteína Ndt1, batofenantrolina/piridoxal 5'-fosfato, houve uma discreta diminuição na taxa de crescimento quando comparado com a cultura em meio sem inibidores (figura 30-B). No entanto, na presença de flavona, inibidor das NADH desidrogenases alternativas, houve diminuição na taxa de crescimento em ambas as cepas, figura 30-C. A

densitometria foi realizada (dados não apresentados) e também não demonstrou diferença entre o crescimento das cepas na presença de flavona.

Figura 30: Fotografia da cultura das cepas *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e *pYES/ndt1* em meio de cultura fermentável semi-sólido SC-URA⁻ com galactose 2% (p/v), após 48 horas. **A:** sem inibidores; **B:** acrescido inibidores Ndt1 250 μmol/L; **C:** acrescido com flavona 250 μmol/L. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.11. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

Confirmada a expressão da proteína recombinante Ndt1, foram realizados os experimentos de determinação do potencial de membrana mitocondrial.

A figura 31 ilustra os resultados de potencial de membrana mitocondrial das cepas de *S. cerevisiae* *pYES/ndt1* (traço a) e $\Delta ndt1\Delta ndt2$ (traço b). Em ambos, com a adição de NADH ocorreu uma grande diminuição da fluorescência. A adição de ADP provocou um pequeno aumento da fluorescência, compatível com a utilização do potencial eletroquímico para dirigir a fosforilação do ADP pela ATP-sintase. A diminuição do potencial de membrana foi revertido pela adição de carboxiatractilosídeo, um inibidor do translocador de ADP/ATP. A adição de FCCP promoveu um rápido aumento do traçado, compatível com a dissipação do potencial eletroquímico e retorno da safranina O à fase aquosa.

A figura 32 apresenta o potencial de membrana mitocondrial das cepas de *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e *pYES/ndt1*, utilizando como substrato NAD^+ . A adição de NAD^+ promoveu a formação do potencial de membrana da cepa *S. cerevisiae* *pYES/ndt1*. A adição de ADP mostrou que o potencial de membrana era capaz de fosforilar ADP e a adição de FCCP foi capaz de dissipar o potencial de membrana. Por outro lado, a adição de NAD^+ na cepa duplo mutante, a mitocôndria não foi capaz de gerar potencial de membrana.

Figura 31: Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae*. A cepa *pYES/ndt1* é representada pelo traço **a**; a cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ é representada pelo traço **b**. As setas indicam a adição de: NADH 1 mmol/L, ADP 400 nmoles, carboxiatractilósídeo (CA) 1mmol/L e FCCP 20 μ mol/L. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 32: Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae*. A cepa *pYES/ndt1* é representada pelo traço **a**; a cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ é representada pelo traço **b**. As setas indicam a adição de: NAD^+ 5 mmol/L, ADP 400 nmoles, CA 1 mmol/L e FCCP 20 μ mol/L. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.12. Determinação do transporte de NAD^+

A figura 33 apresenta o transporte de NAD^+ nas mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae*. Na cepa *S. cerevisiae* expressando a proteína Ndt1 (figura 33, traço a). A adição de NAD^+ promoveu um rápido aumento da fluorescência de NADH, atingindo um estado estacionário em 6 minutos. A adição de antimicina A promoveu apenas um ligeiro aumento do acúmulo de NADH. A adição de FCCP mostrou uma rápida diminuição da fluorescência, compatível com a dissipação do potencial de membrana mitocondrial. Na cepa duplo mutante (figura 33, traço b), a adição de NAD^+ promoveu um lento aumento da fluorescência, que aumenta rapidamente após a adição de antimicina A. A adição de FCCP também promoveu uma rápida diminuição da fluorescência.

Figura 33: Determinação do transporte de NAD^+ em mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae*. A cepa *pYES/ndt1* é representada por **a**; a cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$ é representada por **b**. As setas indicam a adição de: NAD^+ 5 mmol/L, Antimicina A (AA) 2 $\mu\text{mol/L}$ e FCCP 20 $\mu\text{mol/L}$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.13. Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e superóxido mitocondrial em esferoplastos de *S. cerevisiae*

A figura 34 mostra a produção de EROs em função do tempo. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as cepas avaliadas. Durante os 20 minutos ocorreu um aumento na produção de EROs, porém também não houve diferença significativa entre a cepa expressando a proteína Ndt1 e a cepa selvagem.

Figura 34: Determinação da produção de EROs em esferoplastos de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, utilizando a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA. $p>0,05$. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Além da produção de EROs utilizando CM-H₂DCFDA foi avaliado também a produção de radical superóxido utilizando a sonda fluorescente *Mitox Red*. Essa sonda é específica para superóxido mitocondrial. A figura 35 apresenta a produção de superóxido mitocondrial. Não foi observado diferença significativa entre as cepas de *S. cerevisiae* ($p>0,05$). O controle positivo foi realizado para confirmação que o experimento estava funcional.

Figura 35: Determinação da produção de superóxido mitocondrial em esferoplastos de diferentes cepas de *S. cerevisiae*, utilizando a sonda fluorescente *MitoSOX Red*. $p > 0,05$. Os resultados são representativos de três experimentos

4.14. Determinação de proteínas carboniladas

A análise da carbonilação de proteínas foi realizada utilizando o extrato proteico total e mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae* *pYES/ndt1* e $\Delta ndt1 \Delta ndt2$. A figura 36 apresenta a detecção por quimioluminescência do *Western Blotting* após a derivação com dinitrofenilhidrazina. Não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre o extrato proteico total das cepas $\Delta ndt1 \Delta ndt2$ e *pYES/ndt1*, bem como entre a fração mitocondrial das mesmas cepas. A figura 37 mostra o gel réplica corado com *Coomassie Brilliant blue R 250* 0,25% (p/v).

Figura 36: *Western Blotting* das proteínas carboniladas das cepas de *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e *pYES/ndt1* utilizando extrato proteico total e mitocôndrias isoladas. Foi utilizado anticorpo anti-DNP na diluição 1:10.000 e 10 μ g de proteínas.

1: Extrato proteico total da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$;

2: Extrato proteico total da cepa *pYES/ndt1*;

3: Mitocôndria isolada da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$;

4: Mitocôndria isolada da cepa *pYES/ndt1*;

M: Marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*).

Figura 37: Gel réplica do *Western Blotting* das proteínas carboniladas das cepas de *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e *pYES/ndt1* utilizando extrato proteico total e mitocôndrias isoladas. Coloração com *Coomassie brilliant blue* 0,25% (p/v).

M: Marcador Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (*Thermo Scientific*);

1: Mitocôndria isolada da cepa *pYES/ndt1*;

2: Mitocôndria isolada da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$;

3: Extrato proteico total da cepa *pYES/ndt1*;

4: Extrato proteico total da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$.

4.15. Microscopia confocal

Para a determinação da localização celular da proteína Ndt1 foi realizado a microscopia confocal, foram utilizados esferoplastos de *S. cerevisiae* das cepas $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e *pYES/ndt1*.

As figuras 38 e 39 apresentam as imagens da cepa $\Delta ndt1\Delta ndt2$, onde fica evidenciado que não há co-localização da proteína Ndt1, marcada em verde com as mitocôndrias observadas com fluorescência vermelha.

Figura 38: Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$. **A:** marcação das células com DAPI 1 µg/mL; **B:** marcação da proteína Ndt1 recombinante com Alexa 488; **C:** marcação das células com *MitoTracker* 100 nmol/L; **D:** Sobreposição das marcações. Objetiva de 63x. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 39: Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$. Sobreposição das marcações. Objetiva de 63x com zoom digital de 3,15. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

As figuras 40 e 41 apresentam a microscopia confocal dos esferoplastos da cepa expressando a proteína Ndt1. A microscopia mostrou que há co-localização da proteína Ndt1 com fluorescência verde e das mitocôndrias em vermelho.

Figura 40: Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de *S. cerevisiae* *pYES/ndt1*. **A:** marcação das células com DAPI 1 µg/mL; **B:** marcação da proteína Ndt1 recombinante com Alexa 488; **C:** marcação das células com *MitoTracker* 100 nmol/L; **D:** Sobreposição das marcações. Objetiva de 63x. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Figura 41: Microscopia confocal de esferoplastos da cepa de *S. cerevisiae* pYES/*ndt1*. Sobreposição das marcações. Objetiva de 63x com zoom digital de 3,15. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

NAD⁺ é uma coenzima com papel essencial em inúmeras reações enzimáticas e também é consumido em vários processos celulares redox e não redox. Sua forma reduzida, NADH, também apresenta função essencial para as células. NAD⁺ e NADH estão envolvidas em inúmeras reações, como a glicólise, ciclo de Krebs e produção de ATP devido à transferência de elétrons para a cadeia respiratória. Consequentemente ambos apresentam funções biológicas, como modulação do metabolismo energético, participação na morte celular, homeostase de cálcio e expressão gênica. NAD⁺ tem ainda um papel fundamental nas demais isoformas de nicotinamida adenina dinucleotídeos, NADP⁺ e NADPH. Essas isoformas são utilizadas na via pentose fosfato e para resistência ao estresse oxidativo. Dessa forma a disponibilidade do NAD⁺ tem relação direta em todos os principais processos metabólicos mitocondriais.

5.1. Expressão heteróloga da proteína recombinante Ndt1 em *E. coli*

O gene *ndt1* de *A. fumigatus* possui 1.323 nucleotídeos que após o processamento, codifica uma proteína com 397 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 44 KDa e pI teórico de 8,94, calculados pelo Workbench (workbench.sdsc.edu). O cDNA do gene *ndt1* de *A. fumigatus* foi utilizado para clonagens e expressão heteróloga em sistema procarioto e eucarioto.

Inicialmente, para amplificação do gene foi realizada a padronização da concentração ótima de íons magnésio, importantes co-fatores para a atividade da *Taq* DNA polimerase. Além disso, foi determinada também a temperatura ideal de anelamento dos *primers*. Inicialmente foi utilizada a temperatura de anelamento próxima da *T_{melting}*. Essa é uma temperatura teórica, calculada de acordo com a

composição de nucleotídeos de cada *primer* e considerada como aquela suficiente para romper as interações de hidrogênio entre o *primer* e o DNA molde. Em algumas temperaturas, foram obtidos vários fragmentos provenientes de pareamentos inespecíficos entre os *primers* e o DNA molde. Esse tipo de pareamento inespecífico foi minimizado pelo aumento da temperatura de anelamento.

Para melhorar o rendimento da reação e a especificidade utilizou-se dimetil sulfoxido (DMSO). Esse reagente é conhecido por inibir a formação de estruturas secundárias no DNA molde e desestabilizar a estrutura de dupla hélice. Sendo o DMSO muito útil para amplificar DNA com grande conteúdo de guanina e citosina, já que a força entre as pontes de hidrogênio dessas bases dificulta a desnaturação e causa a formação de estruturas secundárias que podem competir com as regiões de anelamento dos *primers*. No entanto, esse efeito pode levar a formação de alterações na região de anelamento dos *primers* o que causa um aumento nas taxas de mutação. Além disso, há evidências que o DMSO pode ter efeito na fidelidade da *Taq* DNA polimerase, onde o emparelhamento de bases adequado depende da formação de pontes de hidrogênio corretas, como o DMSO desestabiliza a formação da dupla hélice pode ocorrer aumento da taxa de mutação (HARDJASA *et al.*, 2010).

Na sequência de cDNA clonada em vetor *pTZ/ndt1* havia a presença de 61 nucleotídeos adicionais. Esses nucleotídeos correspondem à porção final de uma região anotada como íntron nos bancos de dados *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) e *Cadre* (www.cadre-genomes.org.uk/). As tentativas de expressão dessa sequência produzia uma proteína truncada, sugerindo que poderia ser decorrente de um erro no processamento do RNAm ou de um *splicing* alternativo. Corroborando essa última hipótese, as extremidades 5' e 3' apresentam uma sequência dinucleotídica, que sinaliza a ocorrência de *splicing*. A

sequência GT está presente nas extremidades 5' e atuam como sítio doador para *splicing* (*splicing donation site*), enquanto as extremidades 3' apresentam AG como sítio acceptor de *splicing* (*splicing acceptor site*) (CHEN & ZHANG, 1998; LONG & DEUTSCH, 1999). Como os sítios de *splicing* são degenerados e seu reconhecimento preciso *in vivo* depende de mecanismos regulatórios combinados, elementos adicionais localizados em sequências de introns ou exons podem fornecer alta flexibilidade das sequências não colocando restrições sobre os requisitos de codificação (STAMM *et al.*, 2005).

O *splicing alternativo* é um processo que aumenta a diversidade de RNAm expressa a partir de um genoma, além de aumentar o número de isoformas de proteínas, representando assim um processo central na formação de organismos complexos (KELEMEN *et al.*, 2012). Os padrões de *splicing* alternativo estão sob constante mudança, permitindo assim que um organismo responda às alterações ambientais e fisiológicas, determinando quais regiões do seu genoma que serão expressas (STAMM *et al.*, 2005; KELEMEN *et al.*, 2012).

Em fungos filamentosos o *splicing* alternativo é mais comum do que em leveduras, porém ocorre com menor frequência do que em eucariotos superiores. A forma mais comum de *splicing* alternativo em fungos filamentosos é aquele onde há retenção do intron, diferente do que ocorre em mamíferos onde a forma mais comum é o *skipping* de exon. A regulação do *splicing* alternativo em fungos filamentosos também difere muito da regulação presente em mamíferos, sendo a forma prevalente de regulação em fungos feita por *riboswitches*. Alguns autores indicam através de experimentos realizados que há sequências dentro do íntron que parecem ser relevantes para mudanças nos sítios de *splicing* 3' levando a um

splicing alternativo, no entanto, nossos resultados não apresentam alteração de dinucleotídeo no sítio de *splicing* 3' (KEMPKEN, 2013; GRÜTZMANN *et al.*, 2014).

Em *Neurospora crassa* há evidências de que 162 de 9.773 genes codificadores de proteínas apresentam *splicing* alternativo (KEMPKEN, 2013). Trevisan e colaboradores (2011) demonstraram a presença de *splicing* alternativo em *A. nidulans*, onde a transcrição de *pacC* era modulada pelo *splicing* alternativo de *palB*. Em *A. flavus* a partir da análise de 565 proteínas foi estimado que 1,6% do RNAm desses genes sofrem *splicing* alternativo. Posteriormente, através de uma atualização do banco de dados foi estimado que até 15,6% dos genes de *A. flavus* podem codificar mais de um peptídeo. Representando dessa forma um grau de *splicing* alternativo muito elevado quando comparado com ascomycetos, onde o processo afeta geralmente de 1,3 a 4,3% de todos os genes (CHANG *et al.*, 2010; CHANG & MUDDIMAN, 2011). Apesar da proximidade genética com esses dois últimos, ainda não foram encontradas evidências que o *splicing* alternativo ocorre em *A. fumigatus*.

A técnica de PCR-*overlapping* foi utilizada para obtenção de uma sequência sem os 61 nucleotídeos adicionais, uma vez que esses estavam levando à introdução de um códon de parada e gerando uma proteína truncada. Essa técnica permite adicionar ou retirar sequências de interesse no DNA molde, utilizando *primers* específicos e a *Taq* DNA polimerase. Após a realização da PCR-*overlapping*, a sequência clonada sem alteração de nucleotídeos que gerasse um códon de parada e na fase de leitura correta foi utilizada para clonagens em vetores de expressão.

Para a expressão em *E. coli* (sistema procarioto) foi utilizado o vetor pET28-a(+). Esse vetor possui uma sequência de reconhecimento pela enzima T7 RNA

polimerase, que após a indução da expressão, consegue utilizar praticamente todos os recursos da célula para biossintetizar a proteína de interesse, sendo obtida uma grande quantidade da proteína de interesse.

A purificação da proteína Ndt1 foi realizada a partir dos corpos de inclusão. Esse processo é simples e rápido, pois grande parte das proteínas de membrana recombinante estão na forma insolúvel, ou seja, formando os corpos de inclusão. Os corpos de inclusão são formados durante a expressão da proteína na bactéria, sendo que esse processo ocorre devido à síntese rápida da proteína e o enovelamento lento, formando os agregados.

O processo de purificação utiliza o TECP, um agente redutor de dissulfeto, neste caso agindo para manter a função da proteína, uma vez que o estado reduzido é importante para manutenção da integridade da proteína (MUKHOPADHYAY, 1997; GETZ, 1999).

Após a lise bacteriana, os corpos de inclusão são submetidos a lavagens para eliminação dos componentes bacterianos que podem atuar como possíveis contaminantes da proteína de interesse. As lavagens do sedimento celular utilizando tampões acrescidos com detergentes ou agentes caotrópicos, como cloreto de guanidina e uréia, permitem a purificação da proteína de interesse, através da remoção dos debrís celulares. A adição de detergentes nos tampões de ressuspensão e lavagem, Triton X-100 e N-laurilsarcosina, respectivamente, também atuam impedindo a formação de agregados da proteína desnaturada (ROZEMA & GELLMAN, 1995; MUKHOPADHYAY, 1997; WINGFIELD, 2002).

Após a purificação da proteína, foi realizado *Western blotting* e espectrometria de massas, para confirmação da identidade da proteína recombinante purificada. O *Western blotting* identificou a proteína recombinante purificada utilizando anticorpo

anti-cauda de histidina, uma vez que o vetor expressando a proteína de interesse adiciona uma sequência contendo seis histidinas. A sequência da proteína obtida através da espectrometria de massas foi comparada com a sequência de aminoácidos da proteína Ndt1 de *A. fumigatus* depositada no GenBank (XP_752148Afu), onde foi confirmada a identidade da proteína recombinante Ndt1 a qual não se apresentou com alterações de aminoácidos.

5.2. Expressão heteróloga da proteína recombinante Ndt1 em *S. cerevisiae*

Para caracterização bioquímica do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *A. fumigatus* foi escolhido à expressão heteróloga em leveduras *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$, uma vez que essa levedura possui suas proteínas bem caracterizadas.

A avaliação do crescimento das cepas na presença de inibidores da proteína Ndt1 (batofenantrolina/piridoxal 5'-fosfato) e flavona foi realizada utilizando meio mínimo fermentativo. A cepa controle apresentou um crescimento ligeiramente menor que a cepa *pYES/ndt1*. Na presença dos inibidores da proteína Ndt1, ambas as cepas tiveram seu crescimento diminuído. Isso pode ser devido ao fato de que esses inibidores atuem inibindo não apenas Ndt1, mas diversos transportadores mitocondriais como o transportador de succinato-fumarato, dicarboxilato e citrato (PALMIERI *et al.*, 1997; PALMIERI *et al.*, 1999; REMANI *et al.*, 2008).

Na presença de flavona, ambas as cepas apresentaram uma drástica redução em seu crescimento. Essa redução no crescimento pode ser explicada pelo fato de que a entrada de elétrons na cadeia respiratória foi acentuadamente diminuída, uma

vez que as NADH desidrogenases alternativas encontravam-se inibidas por flavona, somado ao fato de que *S. cerevisiae* não possui complexo I.

Mudanças nas concentrações de NAD^+ ou na relação NAD^+/NADH tem sido extensivamente estudadas em vários processos metabólicos e em inúmeros organismos (BIEGANOWSKI *et al.*, 2006; YING, 2008). Os estudos em *S. cerevisiae* apresentam como foco principal as consequências metabólicas da alteração da relação NAD^+/NADH no citosol e nas mitocôndrias o que resulta em alterações na biomassa, acúmulo de etanol e glicerol (VEMURI *et al.*, 2007; HOU *et al.*, 2009; HOU & VEMURI, 2010; AGRIMI *et al.*, 2011). Inúmeros estudos relacionam as alterações da relação NAD^+/NADH com as alterações do *lifespan* das leveduras, podendo essas alterações ocorrerem no *lifespan* replicativo ou cronológico das leveduras (ASHRAFI *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2004; BROACH, 2012).

Nossos resultados demonstram uma possível dependência dos níveis de NAD^+ nos processos metabólicos que envolvem o crescimento da levedura. Uma vez que a curva de crescimento da cepa expressando a proteína Ndt1 mostrou-se diferente da curva da cepa controle. A primeira cresce mais que a cepa controle e esse crescimento é mais evidente a partir do momento que a proteína recombinante Ndt1 passa a ser detectada nas mitocôndrias. Alguns autores têm defendido que a alteração dos níveis de NAD^+ ou ainda a suplementação com precursores desta coenzima podem contribuir para uma nova abordagem terapêutica e para o aumento do *healthspan* e/ou *lifespan* nos organismos, uma vez que em células “velhas” ocorrem mudanças nos níveis de NAD^+ (YOSHINO *et al.*, 2011; CANTÓ *et al.*, 2012; MOUCHIROUD *et al.*, 2013; VERDIN, 2014).

Além disso, Palmieri *et al.* (2009) e Agrimi *et al.* (2011) demonstraram que as leveduras *S. cerevisiae* $\Delta ndt1\Delta ndt2$ apresentavam um crescimento mais lento em meio mínimo não-fermentável, sendo o crescimento recuperado quando a cepa era transformada com uma das isoformas do transportador de nicotinamida adenina dinucleotídeo. Esse resultado mostra que existe uma relação entre o conteúdo de NAD^+ mitocondrial e o metabolismo energético. Em meio mínimo, as leveduras precisam sintetizar biomoléculas indisponíveis e a energia necessária é proveniente dos processos redox dependentes de NAD^+ . Isso explicaria porque, em meio mínimo, leveduras *knockout* para transportadores de NAD^+ ($\Delta ndt1\Delta ndt2$) tiveram sua taxa de crescimento reduzida.

5.3. Caracterização bioquímica da proteína recombinante Ndt1

Uma vez otimizada a expressão e crescimento das duas cepas de *S. cerevisiae*, utilizamos ferramentas bioquímicas para a caracterização do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *A. fumigatus* em *S. cerevisiae*. O primeiro passo foi a preparação de esferoplastos. Essa técnica é utilizada quando os organismos possuem a parede celular rígida, como é o caso dessas leveduras. A digestão dos polissacarídeos presentes na parede celular com enzimas líticas aumenta o rendimento e a eficiência do isolamento mitocondrial nesses organismos (SLANINOVA *et al.*, 2003).

Após esse tratamento as mitocôndrias foram isoladas e utilizadas para a determinação do potencial de membrana mitocondrial utilizando como substrato NADH e NAD^+ . Quando NADH foi adicionado na suspensão mitocondrial, houve a formação de potencial de membrana em ambas as cepas. O potencial de membrana

foi utilizado para fosforilação de ADP, sendo revertido pela adição de carboxiatractilosídeo, um inibidor do translocador de ADP/ATP, demonstrando assim que o ADP adicionado estava sendo utilizado para síntese de ATP. Em seguida, após a adição de FCCP houve a dissipação do potencial de membrana. Como esperado, não houve diferença do potencial de membrana entre as cepas avaliadas, uma vez que a entrada de elétrons na cadeia respiratória ocorreu através das NADH desidrogenases alternativas (LUTTIK *et al.*, 1998; BAKKER *et al.*, 2001).

Por outro lado, quando NAD^+ foi adicionado, houve a formação do potencial de membrana mitocondrial, apenas na cepa *pYES/ndt1*. O potencial de membrana formado foi menor, quando comparado com o induzido por NADH. Apesar de menor, a adição de ADP promoveu uma diminuição entre 10-20 mV, o qual foi suficiente para promover a fosforilação do ADP. A cepa duplo mutante, após a adição de FCCP, mostrou um potencial de membrana residual, possivelmente devido a presença de substratos endógenos, os quais mantêm o gradiente eletroquímico suficiente para manter a função mitocondrial (LEHNINGER *et al.*, 1993).

O experimento para determinação do transporte de NAD^+ também foi realizado utilizando mitocôndrias isoladas. Na cepa expressando a proteína recombinante, o aumento da fluorescência de NADH foi maior que o da cepa duplo mutante. Este aumento da fluorescência é compatível com a conversão de NAD^+ para NADH pelas enzimas do ciclo de Krebs presentes na matriz mitocondrial. A adição do coquetel de substratos (malato, α -cetoglutarato e piruvato) em ambas as cepas promoveu um ligeiro aumento da fluorescência de NADH (dados não apresentados), uma vez que esses substratos são capazes de entrar nas mitocôndrias através de outras vias e participar da formação de NADH pelo ciclo de Krebs.

S. cerevisiae e *A. thaliana* apresentam duas isoformas do transportador de NAD^+ , Ndt1 e Ndt2. Na levedura, ambas proteínas estão presentes na mitocôndria, enquanto que na planta apenas a isoforma 1 está presente nas mitocôndrias (TODISCO *et al.*, 2006; PALMIERI *et al.*, 2009). Nossos experimentos demonstraram que a proteína de *A. fumigatus* codificada pelo gene *ndt1* transporta NAD^+ em mitocôndrias isoladas de levedura. O ligeiro aumento na fluorescência de NADH na cepa $\Delta\text{ndt1}\Delta\text{ndt2}$ pode ser devido à presença de outras proteínas na membrana mitocondrial interna que também transportam NAD^+ , porém com menor afinidade. Esse é o caso da proteína Rim2p, identificada com um transportador mitocondrial de nucleotídeo de pirimidina, porém transporta mais eficientemente nucleosídeos de pirimidina trifosfatos (MAROBBIO *et al.*, 2006; TODISCO *et al.*, 2006).

As mitocôndrias são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, produzindo ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória ocorre a formação de EROs pelo escape dos elétrons, principalmente nos complexos I e III (ANDREYEV *et al.*, 2005). As EROs mitocondriais desempenham inúmeras funções celulares, atuando em vias de sinalização e em processos degenerativos. Como são a principal fonte de EROs, as mitocôndrias possuem sistemas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase, sistema glutatona e tioredoxina. A presença desses sistemas antioxidantes é extremamente importante, uma vez que eles controlam as concentrações de EROs para que não ocorra o estresse oxidativo e danos celulares. As EROs podem causar danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1993; ANDREYEV *et al.*, 2005; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Para determinação de EROs foram utilizadas duas metodologias a primeira utilizando a sonda fluorescente CM-H₂DCFDA e a segunda utilizando a sonda fluorescente *Mitosox Red*. A primeira sonda (CM-H₂DCFDA) utilizada para determinação de EROs celulares, é hidrolisada por esterases da membrana plasmática adquirindo caráter polar. Em seguida, acumula-se no interior celular, sofrendo oxidação na presença de espécies reativas de oxigênio. Ao sofrer oxidação, emite fluorescência. Essa sonda não é específica para nenhuma espécie reativa de oxigênio, porém ela não detecta espécies reativas de nitrogênio.

A segunda metodologia utilizada para a determinação de EROs (*Mitosox Red*), determina especificamente superóxido mitocondrial. Em ambas metodologias não foram observadas diferenças significativas na produção de EROs entre as cepas: *pYES/ndt1*; $\Delta ndt1\Delta ndt2$ e selvagem. A cepa *pYES/ndt1* e selvagem apresentam uma produção de espécies reativas de oxigênio muito similares. Dessa forma, em condições de metabolismo fermentativo, a expressão da proteína Ndt1 não aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio.

Em geral, existem inúmeras controvérsias quanto a utilização de sondas fluorescentes para determinação de EROs em leveduras. Além disso, a determinação de EROs devido sua natureza reativa torna esse processo complicado (CARDOSO *et al.*, 2012). Segundo Bonini e colaboradores (2006) e Wrona & Wardman (2006), a sonda DCFDA não é específica e gera artefatos, além de ser sensível a alterações de pH, que por sua vez poderia levar ao aumento na fluorescência. As leveduras *S. cerevisiae* mantêm um ΔpH (diferença do pH interno da célula com o pH externo) (IMAI e OHNO, 1995; MORTENSEN *et al.*, 2006; AABO *et al.*, 2011) e modificações no pH interno das leveduras poderiam ocasionar alterações nas sondas fluorescentes.

Além disso, sondas fluorescentes para determinação de EROs em compartimentos celulares específicos, como é o caso do *MitoSox Red* são mais suscetíveis à interferências. Essas sondas são dependentes do potencial de membrana e a sua fluorescência irá variar conforme o potencial de membrana variar independente da presença de EROs. Além dessas sondas poderem ser alteradas pelo pH celular, elas podem sofrer alterações pelas modificações de pH na mitocôndria. Uma vez que as mitocôndrias apresentam um ΔpH , que é diferente nos seus compartimentos e esse pode variar dependendo da atividade metabólica (CARDOSO *et al.*, 2012).

Por esse motivo, para confirmar os dados anteriores, utilizamos a detecção de carbonilação de proteínas. A carbonilação ocorre quando radicais livres oxidam alguns aminoácidos presentes nas cadeias laterais de proteínas, ocorrendo principalmente em resíduos de prolina, arginina, lisina e treonina. Os grupos carbonil formados são estáveis e de fácil detecção. Esses grupos são utilizados como indicadores para avaliar a intensidade do dano oxidativo causados pelas EROs em proteínas. Algumas proteínas são mais suscetíveis a carbonilação que outras, por exemplo, a presença de metais de transição em proteínas é uma característica que aumenta a suscetibilidade à carbonilação. Proteínas pertencentes ao ciclo de Krebs e a cadeia respiratória também são mais suscetíveis a carbonilação uma vez, que essas proteínas estão presentes na matriz mitocondrial e as mitocôndrias são as principais fontes de EROs (STANDMAN & LEVINE, 2003; NYSTRÖM, 2005; DALLE-DONNE *et al.*, 2006).

A determinação das proteínas carboniladas foi realizada utilizando o extrato proteico total e mitocôndrias isoladas das cepas de *S. cerevisiae* *pYES/ndt1* e $\Delta ndt1\Delta ndt2$. Na determinação não foi observada diferença significativa entre as

proteínas carboniladas das cepas tanto no extrato proteico total quanto na fração mitocondrial. Nota-se que há uma quantidade maior de proteínas carboniladas na fração mitocondrial como esperado, uma vez que as mitocôndrias são as principais fontes de EROs. Dessa forma, sob a condição de crescimento em meio mínimo fermentativo não foi observado aumento na geração de EROs ou de proteínas carboniladas nas cepas de *S. cerevisiae* avaliadas.

Dessa forma a expressão da proteína Ndt1 de *A. fumigatus* em levedura não causou nenhuma alteração significativa no estado redox e na geração de EROs. Essa observação pode ser devido ao fato de que NAD^+ possui papel tanto protetor quanto na geração de EROs. Por um lado os níveis de NAD^+ são importantes para a produção de NADP^+ e NADPH, os quais desempenham uma função protetora contra o estresse oxidativo. Esses co-fatores atuam na enzima glutathione redutase, catalisando a regeneração de glutathione reduzida. A glutathione reduzida é essencial para enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e glutathione S-transferase. Além disso, NADPH também possui um papel no sistema antioxidante tioredoxina (ARNER & HOLMGREEN, 2000; WU *et al.*, 2004; YING, 2008). Por outro lado, o aumento na disponibilidade de NADH e a entrada de elétrons na cadeia transportadora pode favorecer um maior escape de elétrons e a formação de ânion superóxido (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1993; ANDREYEV *et al.*, 2005)

Os transportadores mitocôndrias são proteínas de membrana codificadas principalmente pelo DNA nuclear, os quais após a sua síntese no citosol são endereçadas para a mitocôndria. Algumas proteínas possuem peptídeo sinal, que sinalizam o endereçamento para a mitocôndria, enquanto outras proteínas possuem sequências sinalizadoras internas (PALMIERI & PIERRI, 2009; FERRAMOSCA & ZARA, 2012; KULAWIAK *et al.*, 2012). A proteína Ndt1 não possui peptídeo sinal

sendo que seu endereçamento para a mitocôndria ocorre através de sinalização interna (dados não apresentados).

Para confirmar que o transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo foi expresso e endereçado corretamente para a membrana mitocondrial interna, foi realizada microscopia confocal das cepas *pYES/ndt1* e $\Delta ndt1\Delta ndt2$. Para a microscopia foi utilizado anticorpos anti-Ndt1 e a sonda *MitoTracker*, para marcação da proteína Ndt1 e das mitocôndrias, respectivamente. Dessa forma, foi possível evidenciar que o transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo co-localiza-se com as mitocôndrias na cepa *pYES/ndt1* (Figura 41). Porém o mesmo perfil não foi observado na cepa controle ($\Delta ndt1\Delta ndt2$). Nessa, não houve co-localização da marcação mitocondrial com as marcações do anticorpo anti-Ndt1. Esse fato era esperado, uma vez que essa cepa não expressa os transportadores mitocondriais de nicotinamida adenina dinucleotídeo.

Mesmo com a presença dos transportadores mitocondriais, os mecanismos pelos quais os níveis de NAD^+ , NADH e da relação NAD^+/NADH são mantidos na mitocôndria ainda precisam ser melhores esclarecidos em *S. cerevisiae* e em fungos patogênicos como o *A. fumigatus* (GIANCASPERO; LOCATO & BARILE, 2013). Mesmo com a elucidação da cadeia respiratória clássica e da via alternativa é preciso entender ainda a presença dessas proteínas em determinadas fase do ciclo biológico do fungo. O transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo também pode ser mais expresso em determinadas fase do ciclo biológico do fungo e também pode estar envolvido em mecanismos de defesa do fungo frente a condições de estresse.

Nossos resultados confirmam a função bioquímica do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo de *A. fumigatus*, porém são necessários mais estudos para elucidação dos mecanismos biológicos e o envolvimento dessa proteína em diversas condições de crescimento e resistên *A. fumigatus*.

6 - Conclusão

Os resultados apresentados nos permite concluir que:

- A sequência de cDNA obtida pela técnica de PCR-*overlapping* possui 1.194 nucleotídeos que codifica uma proteína com 397 aminoácidos;
- A proteína recombinante Ndt1 expressa em *E. coli* foi purificada dos corpos de inclusão;
- A produção e purificação do anticorpo policlonal anti-Ndt1 apresentou um alto grau de especificidade com a proteína Ndt1;
- A expressão heteróloga da proteína Ndt1 em *S. cerevisiae* comprovou sua atividade como transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo;
- A produção de espécies reativas de oxigênio, superóxido mitocondrial e a determinação de proteínas carboniladas não apresentaram diferença significativa entre as cepas;
- A microscopia confocal confirmou a co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias de *S. cerevisiae*.

7 - Referências Bibliográficas

- AABO, T. *et al.* Intracellular pH distribution as a cell health indicator in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Royal Society – Interface**, p. 1-9, 2011.
- ABAD, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 155-182, 2010.
- AGRIMI, G. *et al.* Deletion or Overexpression of Mitochondrial NAD⁺ Carriers in *Saccharomyces cerevisiae* Alters Cellular NAD and ATP Contents and Affects Mitochondrial Metabolism and the Rate Glycolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n.7, p. 2239-2246, 2011.
- ANDERSON, R. M. *et al.* Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n. 20, p. 18881-18890, 2002.
- ANDERSON, R. M. *et al.* Nicotinamide and *PNC1* govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, n. 423, p. 181-185, 2003.
- ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial Metabolismo of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry**, v. 70, p. 200-214, 2005.
- ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European Journal Biochemistry**, v. 267, p. 6102-6109, 2000.
- ASHRAFI, K. *et al.* Sip2p and its partner snf1p kinase affect aging in *S. cerevisiae*. **Genes Dev.**, v. 14, p. 1872-1885, 2000.
- ATKIN, A. L. Preparation of Yeast Cells for Confocal Microscopy. **From: Methods in Molecular Biology: Confocal Microscopy Methods and Protocols**, v. 122, p. 131-139, 1999.
- BAKKER, B. M. *et al.* Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.15-37, 2001.

- BAKER, J. L. *et al.* *Streptococcus mutans* NADH Oxidase Lies at the Intersection of Overlapping Regulons Controlled by Oxygen and NAD⁺ Levels. **The Journal of Bacteriology**, v. 196, p. 2166-2177, 2014.
- BARROS, M.H. *et al.* Higher Respiratory Activity Decreases Mitochondrial Reactive Oxygen Release and Increases Life Span in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 49883-49888, 2004.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. A. *Aspergillus*: biology and industrial applications. **Biotechnology**, v. 23, p. 1-404, 1992.
- BIEGANOWSKI, P. *et al.* Synthetic Lethal and Biochemical Analyses of NAD and NADH Kinases in *Saccharomyces cerevisiae* Establish Separation of Cellular Functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22439-22445, 2006.
- BODEY, G. P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, p. 413-437, 1989.
- BONINI, M. G. *et al.* The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 968-975, 2006.
- BOYER, P. D. *et al.* A new concept for energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 70, n. 10, p. 2837-2839, 1973.
- BOYER, P. D. *et al.* Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 46, p. 955-1026, 1977.
- BRAKHAGE, A. A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annual Review Microbiology**, v. 56, p. 433-455, 2002.
- BROACH, J. R. Nutritional Control of Growth and development in Yeast. **YeastBook Gene Expression & Metabolism**, v. 192, p. 73-105, 2012.

- CANTÓ, C. *et al.* The NAD⁺ Precursor Nicotinamide Riboside Enhances Oxidative Metabolism and Protects against High-Fat Diet-Induced Obesity. **Cell Metabolism**, v. 12, p. 838-847, 2012.
- CAMARGO, J. F.; HUSAIN, S. Immune correlates of protection in human invasive aspergillosis. **Clinical Infectious Diseases Advance**, p. 1-27, 2014.
- CARDOSO, A. R. *et al.* Mitochondrial compartmentalization of redox processes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, p. 2201-2208, 2012.
- CHAKRABARTI, A. *et al.* Invasive aspergillosis in developing countries. **Medical mycology**, v. 49, p. S35-S47, 2011.
- CHANG, K. Y. *et al.* Detection of alternative splice variants at the proteome level in *Aspergillus flavus*. **Journal Proteome Research**, v.9, p. 1209-1217, 2010.
- CHANG, K. Y.; MUDDIMAN, D. C. Identification of alternative splice variants in *Aspergillus flavus* through comparison of multiple tandem MS search algorithms. **BMC Genomics**, v.12, p. 1-10, 2011.
- CHAUDHARY, N.; MARR, K. A. Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway diseases. **Clinical and Translational Allergy**, v. 1, p. 1-7, 2011.
- CHEN, T.; ZHANG, M. Pombe: a gene-finding and exon-intron structure prediction system for fission yeast. **Yeast**, v. 14, p. 701-710, 1998.
- CUNHA, F. M.; DEMASI, M.; KOWALTOWSKI, A. J. Aging and calorie restriction modulate yeast redox state, oxidized protein removal, and the ubiquitin-proteasome system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 51, p.664-670, 2011.
- DAGENAIS, T.R.T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p. 447-465, 2009.

- DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chemica Acta, International Journal of Clinical Chemistry**, v. 329, p. 23-38, 2003.
- DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.
- DEMASI, A. P., PEREIRA, G. A., NETTO, L. E. Cytosolic thioredoxin peroxidase I is essential for the antioxidant defense of yeast with dysfunctional mitochondria. **FEBS Letter**, v. 509, p. 430-434, 2001.
- DENNING, D. W. Invasive Aspergillosis. **Clinical Infectious Disease**, v.26, p.781-805, 1998.
- DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, p. 1142-1151, 2003.
- DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, p. 195-204, 2010.
- DENU, J. M. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD⁺-dependent deacetylases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, p.41-48, 2003.
- DINAMARCO, T. M. Clonagem, expressão e caracterização do gene da oxidase alternativa mitocondrial de *Aspergillus fumigatus*. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto** (Tese de Doutorado), 2008.
- Di STEFANO, M. e CONFORTI, L. Diversification of NAD biological role: the importance of location. **The FEBS Journal**, v.280, p. 4711-4728, 2013.
- DOLLE, C.; RACK, J. G.M.; ZIEGLER, M. NAD and ADP-ribose metabolism in mitochondria. **The FEBS Journal Minireview**, v. 280, p. 3530-3541, 2013.

- DU, L. *et al.* Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n. 20, p.18426-18433, 2003.
- FAHEY, J. L.; WUNDERLICH, J.; MISHELL, R.. The immunoglobulins of mice. I-Four major classes of imunoglobulins: 7S2-, 7S1-, 1A, 2A- and 18S1M – Globulins. **Journal of Experimental Medicine**, v.120, p. 223-242, 1964.
- FANG, E. F. *et al.* Defective Mitophagy in XPA via PARP-1 Hyperactivation and NAD⁺/SIRT1 Reduction. **Cell**, v. 157, p. 882-896, 2014.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: Molecular mechanisms of import into mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1933, p. 494-502, 2012.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidativ stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.
- FORTÚN, J. *et al.* Aspergillosis. Formas clínicas y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 4, p. 201-208, 2012.
- GARRIGUES, J. C. *et al.* New in vitro assay based on glucose consumption for determining intraconazole and amphotericin B activities against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 38, n.12, p. 2857-2862, 1994.
- GETZ, E. B. *et al.* A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 73-80, 1999.
- GIANCASPERO, T. A.; LOCATO, V.; BARILE, M. A Regulatory Role NAD Redox Status on Flavin Cofactor Homeostasis in *S. cerevisiae* Mitochondria. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-16, 2013.

GLAB, N. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmatic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria.

Molecular Genetics and Genomics, v. 223, p. 24-32, 1990.

GRÜTZMANN, K. *et al.* Fungal Alternative Splicing is Associated with Multicellular Complexity and Virulence: A Genome-Wide Multi-Species Study. **DNA Research**, v. 21, p.27-39, 2014.

HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw mano r fatal flaw? **Biocycle**, v.36, n.4, p.32-35, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-619, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. **Free Radicals in Biology and Medicine**, p. 86-187, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Reactive species can pose special problems needing special solutions: some examples. **Free Radicals in Biology and Medicine**, p. 341-394, 2007.

HARDJASA, A. *et al.* Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 14, p. 161-164, 2010.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 54, p.1015-1069, 1985.

HERBRECHT, R. *et al.* Voriconazole versus amphotericin b for primary therapy of invasive aspergillosis. **The New England Journal of Medicina**, v. 347, n. 6, p. 408-415, 2002.

- HERRERO-YRAOLA, A. *et al.* Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. **The EMBO Journal**, v.20, n.10, p.2404-2412, 2001.
- HOGABOAM, C.M. *et al.* *Aspergillus* and asthma-any link? *Medical Mycology*, v.43, p.197-202, 2005.
- HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S., LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, p. 469-488, 1996.
- HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.11, p.1953-1963, 2007.
- HOMEI, A.; WORBOYS, M. Fungal Disease in Britain and The United States 1850-2000: Aspergillosis: A Disease of Modern Technology. **Palgrave Macmillan**, v. 1, cap. 5, p. 118-136, 2013.
- HOPE. W. W. *et al.* The Initial 96 Hours of Invasive Pulmonary Aspergillosis: Histopathology, Comparative Kinetics of Galactomannan and (133)-D-Glucan, and Consequences of Delayed Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p.4879-4886, 2010.
- HORTON, R. M. PCR-Mediated Recombination and Mutagenesis. **Molecular Biotechnology**, v.3, p. 93-99, 1995.
- HOU, J. *et al.* Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 11, p. 253-261, 2009.
- HOU, J.; VEMURI, G. N. Using Regulatory information to manipulate glycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1123-1130, 2010.

- HUH, W-J.; KANG, S-O. Molecular cloning and functional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.13, p.4098-4102, 1999.
- HUH, W-J. *et al.* Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p.2538-2546, 2003.
- IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3604-3608, 1995.
- ITO, J.I.; LYONS, J.M. Vaccination of Corticosteroid Immunosuppressed Mice against Invasive Pulmonary Aspergillosis. **The Journal Infectious Disease**, v.186, p.879-871, 2002.
- JARMUSZKIEWICZ, W. *et al.* Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. **Biochimica and Biophysic Acta**, p. 792-799, 2010.
- JUNGHANS, H.; METZLAFF, M. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. **Biotechniques**, v. 8, p.176, 1990.
- KARTSONIS, N. A.; NIELSEN, J.; DOUGLAS, C. M. Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents. **Drug Resistance Updates**, v. 6, n. 4, p. 197-218, 2003.
- KELEMEN, O. *et al.* Function of alternative splicing. **Gene**, v.514, p. 1-30, 2012.
- KEMPKEN, F. Alternative splicing in ascomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, p. 4235-4241, 2013.
- KOZAK, M. Point mutations define sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, v.44, p. 283-292, 1986.
- KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-343, 2009.

- KULAWIAK, B. *et al.* The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1827, p. 612-626, 2012.
- KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus* – What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? **PLOS Pathogens**, v. 9, p. 1-4, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.
- LATGÉ, J-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- LATGÉ, J-P.; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, p.355-358, 2002.
- LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5, p.227-231, 1992.
- LEE, J. W. *et al.* Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex. **Science Magazine**, v.281, p.64-71, 1998.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Principles of Biochemistry. New York, Worth Publishers, Inc., p. 542-597, 1993.
- LIN, S. J.; GUARENTE, L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, p.241-246, 2003.
- LIN, H.; KWAN, A. L.; DUTCHER, S. K. Synthesizing and Salvaging NAD⁺: Lessons Learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. **PLOS Genetics**, v.6, p.1-15, 2010.

- LONG, M.; DEUTSCH, M. Association of intron phases with conservation at splice site sequence and evolution of spliceosomal introns. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p. 1528-1534, 1999.
- LOUDON, K. W. *et al.* Invasive aspergillosis: clusters and sources? **Journal Medical Micology**, v.32, p. 217-224, 1994.
- LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, v.132, p. 2015-2020, 1984.
- LUTTIK, M. A. H. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 Genes Encode Separate Mitochondrial NADH Dehydrogenases Catalyzing the Oxidation of Cytosolic NADH. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24529-24534, 1998.
- MAROBBO, C. M. T.; DI NOIA, M. A.; PALMIERI, F. Identification of a mitochondrial transporter for pyrimidine nucleotides in *Saccharomyces cerevisiae*: bacterial expression, reconstitution and functional characterization. **Biochemistry Journal**, v. 393, p. 441-446, 2006.
- MARTINS, V. P. *et al.* Mitochondrial function in the yeast form of the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, v.40, p.297-305, 2008.
- MARTINS, V. P. *et al.* Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. **Journal Bioenergetics Biomembranes**, v. 43, p.81-88, 2011.
- MAYEVSKY, A.; BARBIRO-MICHAELY, E. Use of NADH fluorescence to determine mitochondrial function *in vivo*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, p. 1977-1988, 2009.

- McGETTRICK, A. F.; WORRALL, D. M. Extraction of Recombinant Protein from Bacteria. In: *Methods in Molecular Biology*. Totowa, Human Press Inc., p. 29-35, 2003.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p. 144-148, 1961.
- MORTENSEN, H. D. *et al.* Intracellular pH homeostasis plays a role in the NaCl tolerance of *Debaryomyces hanseii* strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 713-719, 2006.
- MOUCHIROUD, L. *et al.* The NAD⁺/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. **Cell**, v. 154, p. 430-441, 2013.
- MUKHOPADHYAY, A. Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 56, p. 61-109, 1997.
- NAGASAKI, Y. *et al.* Combination therapy with micafungin and amphotericin B for invasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised mouse model. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 379-382, 2009.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**, p. 690-750, 2005.
- NIERMAN, W. C. *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. **Nature**, v. 438, p. 1151-1156, 2005.
- NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **The EMBO Journal**, v. 24, p.1311-1317, 2005.
- ONYANGO, P. *et al.* SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.99, n.21, p.13653-13658, 2002.

- OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological assays. **Progress in Allergy**, v.15, p. 1-78, 1958.
- PALMIERI, F. *et al.* Identification of the yeast ACR1 gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. **FEBS Letters**, v. 417, p. 114-118, 1997.
- PALMIERI, F. *et al.* The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as sole carbon source. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 569-577, 1999.
- PALMIERI, F. *et al.* Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.45, p. 31249-31259, 2009.
- PALMIERI, F.; PIERRI, C. L. Structure and function of mitochondrial carriers – Role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. **FEBS Letters**, v. 584, p. 1931-1939, 2009.
- PALMIERI, F. *et al.* Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: review with new insights. **The Plant Journal**, v. 66, p. 161-181, 2011.
- PENFOUND, T.; FOSTER, J. W. NAD-Dependent DNA-Binding Activity of the Bifunctional NadR Regulator of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.2, p.648-655, 1996.
- PETRUSSA, E. *et al.* Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondrial. **FEBS Letters**, v. 307, p. 267-271, 1992.
- PITT, J.I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v.32, Suppl 1, p.17-32, 1994.
- RASMUSSEN, A. G.; MÜLLER, I. M. Multiple Energy-Conservation Bypasses in Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria. **Plant Physiology**, 2006.

- REMANI, S. *et al.* The Yeast Mitochondrial Citrate Transport Protein. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 40, p. 577-585, 2008.
- ROZEMA, D.; GELLMAN, S. H. Artificial chaperones: protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 2372-2374, 1995.
- RUNKEL, E. D.; BAUMEISTER, R.; SCHULZE, E. Mitochondrial stress: Balancing friend and foe. **Experimental Gerontology**, v. 56, p. 194-201, 2014.
- SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chains-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SHAUKAT, A. *et al.* Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristic. **Mycopathology**, v.129, p.181-188, 2005.
- SHINGU-VAZQUEZ, M.; TRAVEN, A. Mitochondria and Fungal Pathogenesis: Drug Tolerance, Virulence and Potential for Antifungal Therapy. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1376-1383, 2011.
- SLANINOVA, I. HOLUBAROVA A. SVOBODA, A. Immunodetection of spectrin-like proteins in yeasts. **Can J Microbiology**, v. 49, p. 189-196, 2003.
- STAMM, S. *et al.* Function of alternative splicing. **Gene**, v.344, p. 1-20, 2005.
- STANDMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

- STEINBACH, W. Are We There Yet? Recent Progress in the Molecular Diagnosis and Novel Antifungal Targeting of *Aspergillus fumigatus* and Invasive Aspergillosis. **PLOS Pathogens**, v. 9, p. 1-3, 2013.
- STEVENS, D.A. Vaccinate against aspergillosis. A call to arms of the immune system. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.1131-1136, 2004.
- SULLIVAN, D.; MORAN, G.; COLEMAN, D. Fungal Disease of Humans. **In: Fungi**, 2005.
- TAUBITZ, A. *et al.* Role of Respiration in the Germination Process of the Pathogenic mold *Aspergillus Fumigatus*. **Current Microbiology**, v.54, p.354-360, 2007.
- TODISCO, S. *et al.* Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.281, n.3, p.1524-1531, 2006.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, T. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.76, P. 4350-4354, 1979.
- TREVISAN, G. L. *et al.* Transcription of *Aspergillus nidulans pacC* is modulated by RNA splicing of *palB*. **FEBS Letters**, v.585, p. 3442-3445, 2011.
- TUDELLA, V. G. *et al.* In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **The International Journal Biochemistry & Cell Biololy**, v. 36, p.162-172, 2004.
- TZAGOLOFF, A. *et al.* Assembly of the mitochondrial membrane System: Processing of the apocytochrome *b* precursor RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. **The Journal of Biological Chemistry**, v.257, n.11, p.6268-6274, 1982.

- VEMURI, G.N. *et al.* Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Process National Academic Science**, v. 104, p. 2402-2407, 2007.
- VERDIER, J. M. *et al.* Preparation and characterization of yeast nuclear extracts for efficient RNA-polymerase B (II)-dependent transcription *in vitro*. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 23, p.7033-7039, 1990.
- VERDIN, E. Coupling of NAD metabolism, sirtuins and lifespan. **Nature Medicine**, v. 20, p. 25-27, 2014.
- VOULGARIS, I. *et al.* Inactivating alternative NADH dehydrogenases: enhancing fungal bioprocesses by improving growth and biomass yield? **Scientific Reports**, v. 322, n. 2, p. 1-9, 2012.
- ZIEGLER, M. New functions of long-know molecule: Emerging roles of NAD in cellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 1550-1564, 2000.
- ZIEGLER, M. The Adenine Nucleotide Translocase – a Carrier Protein Potentially Required for Mitochondrial Generation of NAD. **Biochemistry**, v. 70, p. 214-219, 2005.
- WALACE, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. **Annual Review Genetics**, p. 339-359, 2005.
- WALLSTRÖM, S. V. *et al.* Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport. **Plant and Cell Physiology Advance**, v. 55, p.881-896, 2014.

- WALSH, T. J. *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 327-360, 2008.
- WENDLAND, J. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. **Current Genetics**, v. 44, p. 115-123, 2003.
- WINGFIELD, P. T. Purification of recombinant proteins. **In: Current Protocols in Protein Science**, p. 601-604, 2002.
- WINGFIELD, P. T. Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. **In: Current Protocols in Protein Science**, p. 611-637, 2002.
- WINGFIELD, P. T. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. **In: Current Protocols in Protein Science**, p. 631-645, 2002.
- WRONA, M.; WARDMAN, P. Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2'7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 657-667, 2006.
- WU, G. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. **Journal Biology Chemistry**, v. 281, p. 8788-8795, 2004.
- YANG, H. *et al.* Nutrient-Sensitive Mitochondrial NAD⁺ Levels Dictate Cell Survival. **Cell**, v. 130, 0. 1095-1107, 2007.
- YING, W. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 179-198, 2008.
- YOSHINO, J. *et al.* Nicotinamide Mononucleotide, a Key NAD⁺ Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. **Cell Metabolism**, v. 14, p. 528-536, 2011.

YU, J. H. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*.

Microbiology, v. 38, p. 229-237, 2010.

8.1. Meios de Cultivo

8.1.1. YG

Glicose	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido (YAG) foi acrescentado ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem.

8.1.2. LB (Lúria Bertani)

Triptona	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl.....	1,0% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido foi acrescentado ágar 1,5% (p/v) antes da autoclavagem.

8.1.3. SOC

Triptona.....	2,0% (p/v)
Extrato de levedura.....	0,5,% (p/v)
NaCl.....	10,0 mmol/L
KCl.....	2,0 mmol/L
MgCl ₂	10,0 mmol/L
Glicose.....	20,0 mmol/L

O meio SOB é o meio SOC sem a adição de glicose.

As substâncias que compõem, exceto MgCl_2 e glicose, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kg/cm^2 por 20 minutos. Na hora do uso, foram adicionados MgCl_2 e glicose, a partir de soluções estoque previamente esterilizadas.

8.1.4. TB

Extrato de levedura	2,4% (p/v)
Triptona	1,2% (p/v)
Glicerol	0,4% (p/v)
KH_2PO_4	17,0 mmol/L
K_2HPO_4	72,0 mmol/L

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm^2 por 20 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado ao meio uma solução estéril de KH_2PO_4 0,17M/ K_2HPO_4 0,72M previamente esterilizada.

8.1.5. YPD

Peptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	1,0% (p/v)
Glicose	2,0% (v/v)

As substâncias que compõem o meio, exceto a glicose, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm^2 por 20 minutos. Para o meio sólido (YPD) foi acrescentado Ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem. Para o uso, foi adicionado uma solução estoque de glicose 20% previamente esterilizada.

8.1.6. SC

Base de Nitrogênio para levedura	0,67% (p/v)
Fonte de carbono:	
Rafinose e Galactose	2,0% (p/v)
Aminoácidos: Adenina, Arginina, Cisteína, Leucina, Lisina, Treonina, Triptofano.....	0,01% (p/v)
Aminoácidos: Ácido aspártico, Histidina, Isoleucina, Metionina, Prolina, Fenilalanina, Serina, Tirosina e Valina	0,005% (p/v)

O meio SC é definido como um meio de cultura mínimo para leveduras. As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água deionizada. O meio foi esterilizado por calor úmido em a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Após resfriado, foi adicionada a fonte de carbono desejada a partir de uma solução estoque estéril. O meio SC-URA⁻ tem a base nitrogenosa uracila omitida. Para o meio sólido (SC) foi acrescentado Ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem.

8.2. Soluções, tampões e reagentes

8.2.1. Tampão salina fosfato (PBS)

NaCl	0,14 mol/L
KCl	2,7 mmol/L
Na ₂ HPO ₄	8,1 mmol/L
KH ₂ PO ₄	1,5 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

8.2.2. Tampão de extração de DNA de *A. fumigatus*

NaCl.....	250,0 mmol/L
EDTA.....	25,0 mmol/L
SDS	0,5% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada.

8.2.3. Tampão de extração de DNA para *S. cerevisiae*

Tris-HCl pH 8,5.....	200,0 mmol/L
NaCl	250,0 mmol/L
EDTA	25,0 mmol/L
SDS	0,5% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada.

8.2.4. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

EDTA.....	10,0 mmol/L
Tris-acetato pH 8,0	40,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 8,0. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

8.2.5. Tampão de amostra para DNA

EDTA.....	10,0 mmol/L
Tris-HCl pH 7,5.....	10,0 mmol/L
Azul de bromofenol.....	0,25% (p/v)
Xileno Cianol FF	0,25% (p/v)
Orange G.....	0,25% (p/v)
Sacarose	0,65% (p/v)

8.2.6. Tampão de Lise

Fosfato de potássio pH 7,8.....	50,0 mmol/L
NaCl.....	400,0 mmol/L
KCl.....	100,0 mmol/L
Imidazol	10,0 mmol/L
Triton X-100.....	0,5% (v/v)
Glicerol	10% (v/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,8.

8.2.7. Tampão de Ressuspensão

NaCL.....	50,0 mmol/L
Tris-HCl.....	50,0 mmol/L
TCEP	1,0 mmol/L
EDTA	0,5 mmol/L
Glicerol	5% (v/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 8,0.

8.2.8. Tampão de Lavagem

NaCL.....	50,0 mmol/L
Tris-HCl.....	50,0 mmol/L
TCEP	1,0 mmol/L
EDTA	0,5 mmol/L
Glicerol.....	5% (v/v)
Triton X-100	1% (v/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 8,0. Para dissolver o Triton X-100 deixar a temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação.

8.2.9. Tampão de Desnaturação

NaCL.....	50,0 mmol/L
Tris-HCl.....	50,0 mmol/L
TCEP	5,0 mmol/L
EDTA	0,5 mmol/L
Glicerol.....	5% (v/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 8,0.

8.2.10. Tampão D (para diálise)

Tris-HCl.....	10,0 mmol/L
TCEP	0,1 mmol/L
EDTA	0,05 mmol/L
SLS	0,05% (p/v)

As substâncias foram dissolvidas em água deionizada, o tampão foi ajustado para pH 8,0.

8.2.11. Tampão de amostra para SDS-PAGE

B-mercaptoetanol.....	2,0% (v/v)
Tris-HCl pH 6,8.....	62,5 mmol/L
Glicerol	10,0% (v/v)
SDS.....	2,0% (p/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

8.2.12. SDS-PAGE**Gel de empilhamento 5%**

Acrilamida/Bis-acrilamida.....	5,0% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8.....	125,0 mmol/L
SDS	0,1% (p/v)
Persulfato de amônio	0,1% (p/v)
TEMED.....	0,1% (v/v)

Gel de separação 8-15%

Acrilamida/Bis-acrilamida.....	8,0% - 15,0% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8.....	400,0 mmol/L
SDS	0,1% (p/v)
Persulfato de amônio	0,1% (p/v)
TEMED.....	0,1% (v/v)

8.2.13. Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3

Tris-HCl pH 8,3.....	25,0 mmol/L
Glicina	250,0 mmol/L
SDS.....	0,1% (p/v)

8.2.14. Solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250*

Coomassie Brilhant Blue R-250	0,25% (p/v)
Metanol	45% (v/v)
Ácido acético.....	10% (v/v)

8.2.15. Solução 1 (coloração por prata)

Etanol	30% (v/v)
Ácido acético glacial.....	10% (v/v)

8.2.16. Solução 2 (coloração por prata)

Etanol	30% (v/v)
Tiosulfato de sódio	5% (p/v)
Glutaraldeído.....	25% (p/v)
Acetato de Sódio.....	7% (p/v)

8.2.17. Solução 3 (coloração por prata)

Nitrato de Prata	0,1% (p/v)
Formaldeído	0,02% (p/v)

8.2.18. Solução 4 (coloração por prata)

Carbonato de sódio	2,5% (p/v)
Formaldeído	0,02% (p/v)

8.2.19. Solução 5 (coloração por prata)

EDTA (Na ₂ .2H ₂ O).....	1,5% (p/v)
--	------------

8.2.20. Tampão de transferência (*Western Blotting*)

Tris-HCl pH 8,3.....	25,0 mmol/L
Glicina	192,0 mmol/L
Metanol	20% (v/v)
SDS.....	0,05% (p/v)

8.2.21. TBS-T

Tris-HCl pH 7,6.....	0,02 mol/L
NaCl	140,0 mmol/L
Tween 20	0,1% (v/v)

8.2.22. Solução descorante

Etanol	5,0% (v/v)
NaCl	140,0 mmol/L
Tween 20	0,1% (v/v)

8.2.23. Solução fixadora (espectrometria de massas)

Metanol	50% (v/v)
Ácido acético.....	10% (v/v)

8.2.24. Solução de lavagem (espectrometria de massas)

Bicarbonato de amônia pH 8.....	1,0 mol/L
---------------------------------	-----------

8.2.25. Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris	10, 0 mmol/L
EDTA.....	1,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

8.2.26. Tampão TE/LiAc

Tris	10, 0 mmol/L
EDTA.....	1,0 mmol/L
Acetato de Litio	100,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5.

8.2.27. Tampão TE/LiAc/PEG 3350 40%

Tris	10,0 mmol/L
EDTA.....	1,0 mmol/L
Acetato de Litio	100,0 mmol/L
PEG 3350.....	40% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5.

8.2.28. Tampão de pré-incubação para esferoplastos de *S. cerevisiae*

β -mercaptoetanol	100, 0 mmol/L
Tris-HCl pH 8,5.....	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5.

8.2.29. Tampão de digestão para esferoplastos de *S. cerevisiae*

Sorbitol	1,3 mol/L
EDTA	0,5 mmol/L
BSA	0,2% (p/v)
Imidazol	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 6,4.

8.2.30. Tampão de lise para esferoplastos de *S. cerevisiae*

Sorbitol	0,3 mol/L
EGTA	0,5 mmol/L
BSA	0,2% (p/v)
HEPES	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

8.2.31. Tampão de ressuspensão para mitocôndrias de *S. cerevisiae*

Sacarose	125,0 mmol/L
HEPES	10,0 mmol/L
KCl	65,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

8.2.32. Tampão para esferoplastos de *S. cerevisiae*

Sacarose	0,7 mol/L
EGTA	0,5 mmol/L
KCl	1,7 mmol/L
KH ₂ PO ₄	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

8.2.33. Meio de reação para determinação do potencial de membrana e transporte de NAD⁺

Sacarose	125,0 mmol/L
KCl	65,0 mmol/L
HEPES-KOH	10,0 mmol/L
BSA livre de ácidos graxos	0,1% (p/v)
KH ₂ PO ₄	1,0 mmol/L
MgCl ₂	1,0 mmol/L
EGTA	500,0 µmol/L
Ciclosporina A	0,4 µmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

8.2.34. Tampão de lise para extração de proteínas de *S. cerevisiae*

Fosfato de Sódio	50,0 mmol/L
EDTA	1,0 mmol/L
Glicerol	5% (v/v)
PMSF	1,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,4.

8.3. Espectros de fluorescência

Para verificação se o meio de reação utilizado não continha outros componentes com fluorescência no comprimento de onda de emissão de 450 nm, bem como para demonstrar que a solução de NAD^+ utilizada não havia contaminação por NADH, foi realizada a determinação do espectro de fluorescência utilizando os comprimentos de onda de excitação 366 nm e emissão de 350 nm a 650 nm.

As figuras 42 e 43 apresentam os espectros de fluorescência do meio de reação e da solução de NAD^+ , respectivamente. Ambos, não apresentaram fluorescência em 450 nm, comprimento de onda de emissão do NADH, demonstrando que não haviam componentes e NADH que pudessem interferir nos experimentos.

Figura 42: Espectro de fluorescência do meio de reação utilizado para determinação do transporte de NAD^+ . Os comprimentos de onda utilizados foram excitação 366 nm e emissão de 350 nm a 650nm.

Figura 43: Espectro de fluorescência da solução de NAD^+ . Os comprimentos de onda utilizados foram excitação 366 nm e emissão de 350 nm a 650nm.

9.1. Mapas de Vetores

As figuras 44, 45 e 46, apresentam os mapas dos vetores utilizados para as clonagens em sistema procarioto e eucarioto.

Figura 44: Mapa do vetor pGEM®-T Easy (Promega).

Figura 45: Mapa do vetor pET-28a(+).

Figura 46: Mapa do vetor pYES2.

9.2. Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 14.1.296.53.3), intitulado "Estudos bioquímicos e moleculares dos componentes mitocondriais em *Aspergillus fumigatus*: Clonagem e expressão heteróloga de um transportador de NAD⁺/NADH", de autoria de **Laís de Lourdes de Lima Bállico e Sérgio Akira Uyemura**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 30/06/2014.

Colaboradores: João José Franco; Ana Elisa Calleiro Seixas Azzolin; Yara Maria Lucisano Valim.

This is to certify that the work (Protocol number 14.1.296.53.3), entitled: "Estudos bioquímicos e moleculares dos componentes mitocondriais em *Aspergillus fumigatus*: Clonagem e expressão heteróloga de um transportador de NAD⁺/NADH", by **Laís de Lourdes de Lima Bállico e Sérgio Akira Uyemura** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, June, 30 2014.

Duração prevista do projeto: 01/07/2014 a 04/10/2014

Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan
Presidente da CEUA

Ribeirão Preto, 01 de Julho de 2014.

João Fernando Velho de Andrade Diniz
Secretário da CEUA