UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DÉBORA ORCIA

**Estudo da estrutura e parceiros proteicos de
proteínas codificadas por genes de *micro-exons* de
*Schistosoma mansoni***

São Carlos
2015

DÉBORA ORCIA

**Estudo da estrutura e parceiros proteicos de
proteínas codificadas por genes de *micro-exons* de
*Schistosoma mansoni***

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Ricardo DeMarco

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

**São Carlos
2015**

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

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

Orcia, Débora

Estudo da estrutura e parceiros proteicos de proteínas codificadas por genes de micro-exons de *Schistosoma mansoni* / Débora Orcia; orientador Ricardo DeMarco - versão corrigida -- São Carlos, 2015.

126 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Genes micro-exons (MEGs). 3. Proteínas codificadas por MEGs. I. DeMarco, Ricardo, orient. II. Título.

Dedico esta tese à minha família.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para que este trabalho se concretizasse, seja na orientação, apoio, na companhia, amizade ou na convivência. Fica aqui registrado o meu sincero “Muito Obrigada”.

- Ao Prof. Ricardo DeMarco, pela orientação profissional, competente e ao mesmo tempo muito amigável, pela confiança em mim depositada e por proporcionar todas as condições para que o trabalho se realizasse da melhor forma possível.
- A todos os membros do laboratório de Biofísica, especialmente aos técnicos Andressa, Bel, Fernando e Julia, por sempre estarem presentes e dispostos a ajudar. E principalmente a Andressa, por me ensinar (o mais importante) a manusear os equipamentos de forma correta e também pelas discussões que foram essenciais para o êxito deste trabalho de doutorado.
- Aos colegas de laboratório e amigos, principalmente ao Leandro, Sina, Helô, Ra, Suma, Edson, Ana (IC), Carla, Heline, Naty Chocolate, Naiara, Deínha, Ton e Nathy. Vocês tornaram meus dias (noites e madrugadas) mais felizes pela companhia, conversas e gargalhadas!!!
- Às minha “amigas para sempre”: Na (e o pequeno Kauã), Ju, Ka, Raquel (e a pequena Nicolly), Shirley, Cris (e a pequena Lorena) e Ana. E principalmente a um quarteto fantástico que fez a minha estadia em São Carlos e os anos de doutorado parecerem dias de verão sempre, apesar das dificuldades encontradas no caminho: Helô (minha preferida), Karina, Dago e Marquinho. VALEU GALERA!!!
- Ao pós-doc José que contribui de forma fundamental para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos na área da biofísica.
- A Dra. Katia Cristina Pereira Oliveira Santos do Instituto Adolfo Lutz, por ter nos cedidos vermes para realização dos experimentos.
- A Fapesp pelo auxílio financeiro.
- Aos meus pais, Angela e Antonio, que sempre estiveram presentes e preocupados, pela educação que me deram e pelo modelo que são em minha vida.
- Ao meu irmão Má e ao meu irmão Digo (*in memoriam*), aos meus sobrinhos, amores da minha vida Leo e Kauã e ao meus afilhados Mu e Gle e outros familiares que sempre estiveram comigo como Fran, Maria e Adilson.
- E principalmente ao André, com quem compartilho minha vida com muito amor... sempre presente em todos os momentos.

É melhor tentar e falhar que ocupar-se em ver a vida passar. É melhor tentar, ainda que em vão, que nada fazer. Eu prefiro caminhar na chuva a, em dias tristes, me esconder em casa. Prefiro ser feliz, embora louco, a viver em conformidade. Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização. Mesmo se eu soubesse que amanhã o mundo se partiria em pedaços, eu ainda plantaria a minha macieira. O ódio paralisa a vida; o amor a desata. O ódio confunde a vida; o amor a harmoniza. O ódio escurece a vida; o amor a ilumina. O amor é a única força capaz de transformar um inimigo num amigo.”

Martin Luther King

RESUMO

ORCIA, D. **Estudo da estrutura e parceiros proteicos de proteínas codificadas por genes de *micro-exons* de *Schistosoma mansoni***. 2015. 126 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Os genes *micro-exons* (MEGs) foram recentemente identificados no genoma do *Schistosoma mansoni*, verme responsável pela esquistossomose, doença que afeta mais de 262 milhões de pessoas em mais de 78 países. Devido à capacidade de produção de proteínas variantes pelo *splicing* alternativo de MEGs, expressão preferencial em estágios do ciclo de vida em contato com o hospedeiro definitivo e a verificação de que várias proteínas codificadas por estes genes são secretadas para o meio externo ao parasito, acredita-se que estas proteínas possuam um papel importante na interação parasito-hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi estudar e caracterizar a estrutura e dinâmica conformacional das proteínas codificadas por MEG-11 e MEG-14 e verificar a interação da proteína MEG-14 com proteínas humanas. A análise das proteínas MEG-11 e MEG-14 produzidas em sistema recombinante com a técnica de dicroísmo circular (CD) demonstrou que ambas as proteínas apresentavam estruturas secundárias majoritariamente desordenadas quando em solução aquosa. Entretanto, foi verificado que a presença de TFE, a desidratação das proteínas e o aumento de temperatura favoreciam o surgimento de estruturas ordenadas nestas proteínas. Um ganho de estrutura secundária também foi observado para a proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolípidios e micelas de detergente carregadas negativamente. Estes resultados suportam a identificação destas proteínas como clássicas proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs) e abre a possibilidade de sua interação com diferentes parceiros e fatores a serem relacionados com os papéis multifuncionais e estados dentro do hospedeiro. Resultados prévios de experimentos de duplo-híbrido do nosso grupo apontavam uma possível interação de MEG-14 com a proteína humana S100A9. Através da técnica de pulldown foi possível confirmar uma interação dependente da presença de cálcio entre estas duas proteínas. Análises adicionais da interação MEG-14/S100A9 com as técnicas de ITC e SPR permitiram calcular a constante de dissociação entre as proteínas em aproximadamente 2 μM . Finalmente, experimentos *ex vivo* permitindo a ingestão da proteína S100A9 acoplada a uma molécula fluorescente pelo *S. mansoni* resultaram na acumulação da proteína na glândula do esôfago, local onde já foi localizada a proteína MEG-14 em *S. japonicum*, sugerindo que a interação observada nos experimentos *in vitro* está ocorrendo com a proteína MEG-14 nativa.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*. Genes *micro-exons* (MEGs). Proteínas codificadas por MEGs.

ABSTRACT

ORCIA, D. **Study of structure and protein partners of proteins coded by micro-exon genes of *Schistosoma mansoni***. 2015. 126 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The micro-exon genes (MEGs) were recently identified in *Schistosoma mansoni*'s genome, worm responsible for schistosomiasis, a disease that affects more than 262 million people in more than 78 countries. Due to the capacity of variant protein production by alternative splicing of MEGs, preferential expression in certain life stages in contact with the definitive host, and the confirmation that many proteins coded by these genes are secreted to the external environment, It's believed that these proteins have an important role in parasite-host relationship. The objective of this work was to study and characterize the structure and conformational dynamics of proteins coded by MEG-11 and MEG-14 and verify the interaction of Meg-14 protein with human proteins. The analysis of MEG-11 and MEG-14 proteins produced in recombinant system with circular dichroism (CD) shows that both proteins present secondary structures mostly disordered in aqueous solution. However, It was found that in presence of TFE, the dehydration of proteins and the increasing of temperature favor the surging of ordered structures. An increase of secondary structure was observed too for MEG-14 protein in presence of phospholipid vesicles and negative charged detergent micelles. These results support the identification of these proteins as classical intrinsically disordered proteins (IDPs) and opens the possibility of its interaction with different partners and factors related with the multifunctional roles and states in the host. Previous results of double-hybrid experiments pointed a possible interaction between MEG-14 and the human protein S100A9. By pulldown technique was possible confirm an calcium dependent interaction between these proteins. Additional analysis of MEG-14/S100A9 interaction with ITC and SPR experiments were able to calculate the dissociation constant between proteins equals to 2 μ M. Finally, *ex vivo* experiments permit the ingestion of S100A9 coupled to a fluorescent molecule by *S. mansoni*, resulting in the accumulation of protein in the esophageal gland, where was localized the MEG-14 in *S. japonicum*, suggesting that the interaction observed in the *in vitro* experiments are occurring with the native MEG-14.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Micro-exon genes (MEGs). Proteins encoded by MEGs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa da distribuição global da esquistossomose e classificação dos países/áreas conforme o risco de infecção	25
Figura 2 -	Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos – 2012	27
Figura 3 -	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Figura 4 -	Representação esquemática da estrutura dos genes pertencentes à família MEG	34
Figura 5 -	Localização de transcritos e proteínas na glândula esofágica de vermes inteiros adultos permeabilizados	35
Figura 6 -	Estruturas tridimensionais das proteínas (S1008) ₂ , (S100A9) ₂ e (S100A8/A9) ₂ ligadas ao íon cálcio	38
Figura 7 -	Sequências primárias completas das proteínas MEG-11 e MEG-14	66
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio	68
Figura 9 -	Gel de tricina 10% corado com <i>Comassie blue</i> – Teste de expressão e solubilidade	70
Figura 10 -	Análise da purificação e clivagem da cauda de hexahistidina da proteína MEG-14	71
Figura 11 -	Cromatograma da purificação em coluna de exclusão molecular da proteína MEG-14	72
Figura 12 -	Identificação da proteína MEG-14 por espectrometria de massas	73
Figura 13 -	Análise das etapas de purificação da proteína MEG-11	74
Figura 14 -	Cromatograma da purificação em coluna de exclusão molecular da proteína MEG-11	75
Figura 15 -	Cromatograma: Comparação dos perfis de eluição dos padrões com o perfil de eluição da proteína MEG-14/6Xhis	76
Figura 16 -	Dados de DLS da proteína MEG-14	77
Figura 17 -	Espectrometria de massa da proteína MEG-14	78
Figura 18 -	Gel SDS-PAGE 15%: <i>Crosslinking</i> químico da proteína MEG-14 com o reagente glutaraldeído	79
Figura 19 -	Predição do conteúdo de estrutura secundária para a fração solúvel da proteína MEG-14	80
Figura 20 -	Espectro de CD da proteína MEG-14 em solução de fosfato de sódio pH 7.0	80
Figura 21 -	Espectros de CD da proteína MEG-14 em concentrações crescentes de TFE	81
Figura 22 -	Espectro de SRCD da proteína MEG-14 em água (vermelho), e o espectro de SRCD da proteína MEG-14 em solução de TFE 100% (azul)	82
Figura 23 -	Avaliação por CD da influência do pH na estrutura secundária da	84

proteína MEG-14

Figura 24 -	Medidas de DLS com vesículas de fosfolípidios sozinhas e acrescidas da proteína MEG-14	85
Figura 25 -	Espectros de CD da proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolípidios com carga positiva e neutra	86
Figura 26 -	Espectros de CD e SRCD da proteína MEG-14 na presença de micelas do detergente SDS	87
Figura 27 -	Espectros de SRCD da proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolípidios com negativa	89
Figura 28 -	Determinação do grau de oligomerização aparente da proteína MEG-11 por cromatografia de exclusão molecular	91
Figura 29 -	Predição do conteúdo de estrutura secundária para a fração solúvel da proteína MEG-11	91
Figura 30 -	Espectro de CD da proteína MEG-11 em tampão 20mM de fosfato de sódio pH 7.0	92
Figura 31 -	Espectros de CD com a proteína MEG-11 em diferentes concentrações de TFE: 0%, 25%, 50%, 75% e 100%	93
Figura 32 -	Análise do efeito térmico na estrutura secundária da proteína MEG-11	94
Figura 33 -	Efeitos da desidratação/rehidratação no <i>folding</i> da proteína MEG-11	95
Figura 34 -	Espectros de CD da proteína MEG-11 em tampão fosfato pH 7,0 na presença de micelas do detergente aniônico SDS (preto), do detergente zwitteriônico HPS (azul) e do detergente catiônico CTAB (vermelho) – proporção 1:1000.	96
Figura 35 -	Etapas da clonagem dos genes S100A8, S100A9 (pGEX) e S100A9 (pETSumo)	99
Figura 36 -	Teste de expressão e solubilidade das proteínas S100A9/Sumo6Xhis, S100A9/GST, S100A8/6xhis, CC2D1A/Sumo6Xhis, CC2D1A/GST e GST	101
Figura 37 -	Purificação da proteína S100A8/6Xhis em coluna de afinidade Ni-NTA	102
Figura 38 -	Análise da purificação das proteínas S100A9/GST, CC2D1A/GST e GST.	103
Figura 39 -	Etapas da purificação da proteína S100A9/Sumo	104
Figura 40 -	Cromatograma da purificação em coluna de exclusão molecular da proteína S100A9	104
Figura 41 -	Análise da funcionalidade da proteína S100A9 através das técnicas de ITC e CD	105
Figura 42 -	Ensaio de <i>pulldown</i> com as proteínas S100A9 e MEG14	106
Figura 43 -	Calorimetria de titulação isotérmica da interação da proteína MEG-14 com a proteína S100A9	108
Figura 44 -	Sensorgramas da interação entre as proteínas MEG-14 e S100A9	110
Figura 45 -	Análise das estruturas secundárias das proteínas MEG-14 e S100A9	112

individuais e complexadas

Figura 46 -	Medidas de MST com a proteína MEG-14 marcada e diferentes concentrações da proteína S100A9	114
Figura 47 -	Vermes adultos ♂ do <i>S. mansoni</i> incubados com proteína S100A9 marcada	116
Figura 48 -	Vermes adultos ♂ do <i>S. mansoni</i> incubados com proteína S100A8 marcada	117
Figura 49 -	Ensaio de <i>pulldown</i> com as proteínas CC2D1A e MEG14	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oligonucleotídeos utilizados para reações de amplificações neste trabalho	44
Tabela 2 -	Condições e parâmetros utilizados na expressão das proteínas de trabalho	47
Tabela 3 -	Tampões utilizados para as proteínas de trabalho	48
Tabela 4 -	Reações da proteína MEG14 com o reagente glutaraldeído	55
Tabela 5 -	Condições utilizadas para realização das medidas de CD e SRCD	59
Tabela 6 -	Combinações proteicas utilizadas no ensaio de <i>pulldown</i> . Ensaio realizado com e sem a adição de cloreto de cálcio	62
Tabela 7 -	Parâmetros teóricos das construções das proteína MEG-11 e MEG-14	67
Tabela 8 -	Parâmetros teóricos das construções das proteínas S100A8, S100A9, CC2D1A e GST	100
Tabela 9 -	Parâmetros termodinâmicos referente a titulação da proteína MEG14 na proteína S100A9, obtidos através da técnica de calorimetria de titulação isotérmica	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	<i>Circular Dichroism</i> , Dicroísmo Circular
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DO	Densidade Óptica
DDPG	<i>1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> , Espalhamento Dinâmico de Luz
DMPC	<i>1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i>
DOTAP	<i>dioleoyl-3-trimethylammonium-propane</i>
DPPC	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DPPS	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine</i>
DSPE	<i>1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-folate</i> (polyethylene glycol)
ESI-MS	<i>Eléctron Spray Ionization – Mass Spectrometry</i> , espectrometria de massas por ionização “electronspray”
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)piperacina-N’ -(2-etanosulfônico)
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> , Calorimetria de Titulação Isotérmica
K_a	Constante de associação
K_d	Constante de dissociação
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LUV	<i>Large Unilamellar Vesicles</i> , Vesículas unilamelares grandes
MM	Massa Molecular
Ni-NTA	Resina de níquel e ácido nitrilotriacético
pb	Pares de bases de nucleotídeos
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Reação em Cadeia da Polimerase
pI	<i>Ponto Isoelétrico</i>
POPG	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho</i>
POPC	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>

POPE	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>
RT-PCR	Transcrição-Reversa seguida de PCR
RU	Unidades de Ressonância
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> , <i>Ressonância Plasmônica de Superfície</i>
TFE	TriFluoroEthanol
UV	<i>Ultravioleta</i>
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	25
1.1 A esquistossomose e o parasita <i>Schistosoma mansoni</i>	25
1.2 A interação parasita-hospedeiro	30
1.3 Genes Micro-exons (MEGs) e proteínas codificadas por MEGs (PCMs)	32
1.4 Proteína S100A9 e proteína CC2D1A	36
1.4.1 Proteína S100A9 e complexo S100A8/A9	37
1.4.2 Proteína CC2D1	39
 <u>2 OBJETIVOS</u>	 41
 <u>3 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	 43
3.1 Clonagem dos genes de MEG-11, MEG-14, S100A8, S100A9-GST e S100A9-Sumo	41
3.2 Subclonagem dos genes MEG-11, MEG-14, S100A8, S100A9-GST e S100A9-Sumo	44
3.3 Expressão heteróloga das proteínas	47
3.4 Purificação da proteína MEG-14	49
3.5 Purificação da proteína MEG-11	50
3.6 Purificação da proteína S100A9 (construção fusionada a Sumo) e da proteína S100A8	51
3.7 Purificação da proteína S100A9 (construção fusionada a GST) e da proteína GST	52
3.8 Quantificação das amostras proteicas	52
3.8.1 Espectroscopia de absorção	52
3.8.2 Ácido bicinconínico (BCA)	53
3.9 Determinação do estado oligomérico das proteínas através da curva de calibração	54
3.10 <i>Crosslinking</i> químico	55
3.11 Espectrometria de Massas	55
3.12 Preparação das vesículas de fosfolipídios	56
3.13 Técnicas espectroscópicas	57

3.13.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	57
3.13.2 Dicroísmo circular convencional (CD) e por radiação sincrotron (SRCD)	58
3.13.3 Fluorescência intrínseca	60
3.14 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	61
3.15 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	61
3.16 <i>Pulldown</i>	62
3.17 Termoforese em microescala (MST)	63
3.18 Experimentos <i>ex vivo</i>	64
 <u>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	 65
4.1 Análise inicial das sequências das proteínas MEG-11 e MEG-14	65
4.2 Clonagem e subclonagem dos MEG-11 e MEG-14	67
4.3 Expressão e solubilidade das proteínas MEG-11 e MEG-14	68
4.4 Purificação da proteína recombinante MEG-14	70
4.5 Purificação da proteína recombinante MEG-11	73
4.6 Caracterização biofísica da proteína MEG-14	75
4.6.1 Determinação do grau oligomérico da proteína MEG-14	75
4.6.2 Predição do conteúdo de estrutura secundária da proteína MEG-14	79
4.6.3 Determinação da estrutura secundária da proteína MEG-14 em solução aquosa e em solução de TFE	80
4.6.4 Influência da variação de pH sobre a estrutura da MEG-14	83
4.6.5 Interação da proteína MEG-14 com vesículas de fosfolipídios e detergentes	86
4.7 Caracterização biofísica da proteína MEG-11	90
4.7.1 Determinação do grau oligomérico da proteína MEG-11	90
4.7.2 Predição do conteúdo de estrutura secundária da proteína MEG-11	91
4.7.3 Determinação da estrutura secundária da proteína MEG-11 em solução aquosa e em solução de TFE	92
4.7.4 Variação térmica da proteína MEG-11 em solução aquosa	93
4.7.5 Efeitos da desidratação e rehidratação na estrutura da proteína MEG-11	95

4.7.6 Interação da proteína MEG-14 com micelas de detergentes	96
4.8 Interação MEG-14 com S100A9 e CC2D1A	97
4.8.1 Clonagem e subclonagem das construções de S100A8/6Xhis, S100A9/Sumo-6Xhis, S100A9/GST	97
4.8.2 Expressão das proteínas S100A8/6Xhis, S100A9/Sumo6Xhis, S100A9/GST, CC2D1A/GST, GST e CC2D1A/Sumo6Xhis	100
4.8.3 Purificação da proteína S100A8/6Xhis	102
4.8.4 Purificação das proteínas S100A9/GST, CC2D1A/GST e GST	102
4.8.5 Purificação da proteína S100A9/Sumo-6Xhis	103
4.8.6 Análise da funcionalidade da proteína S100A9 recombinante	105
4.8.7 Ensaio de <i>pulldown</i> com as proteínas MEG-14/6Xhis e S100A9/GST	106
4.8.8 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através da técnica de ITC	107
4.8.9 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através da técnica de SPR	109
4.8.10 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através das técnicas de CD e SRCD	110
4.8.11 Termoforese em microescala (<i>MicroScale Thermophoresis</i> - MST)	113
4.8.12 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através de ensaios com o parasita <i>ex vivo</i>	115
4.8.13 Ensaio de <i>pulldown</i> com as proteínas MEG-14/HIS e CC2D1A/GST	117
<u>5 CONCLUSÕES</u>	119
<u>REFERÊNCIAS</u>	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose e o parasita *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose, popularmente conhecida como barriga d'água, é uma doença que atinge a humanidade há séculos. É causada por um pequeno verme sanguíneo do gênero *Schistosoma*. Existem cinco espécies de *Schistosoma* que causam doenças ao homem, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. intercalatum* e *S. mansoni*.¹ A esquistossomose é a segunda doença tropical mais difundida mundialmente, acometendo cerca de 262 milhões de pessoas em 78 países, e estima-se que outras 700 milhões encontram-se sob risco de contrair a doença.² Os países que são afetados por essa parasitose são países em desenvolvimento e situam-se em regiões tropicais e subtropicais. Isso ocorre devido à relação direta desta parasitose com a precariedade no saneamento básico, baixos padrões socioeconômicos e também a necessidade de um hospedeiro intermediário típico de regiões tropicais. A figura 1 ilustra a distribuição global da esquistossomose e a classificação das regiões que são afetadas com base no risco de infecção.

Figura 1 - Mapa da distribuição global da Esquistossomose e classificação dos países/áreas conforme o risco de infecção.

Fonte: WORLD... ²

Os parasitas do gênero *Schistosoma*, pertencem ao filo dos *Platelmintos*, a classe *Trematoda* e a subclasse *Digenea*. Diferentemente de outros trematódeos, os parasitas deste gênero são vermes dióicos e apresentam nítido dimorfismo sexual. Os parasitas adultos se apresentam como vermes longos e delgados. O macho, mais espesso do que a fêmea e de coloração esbranquiçada, apresenta ao longo de seu corpo, no segmento posterior, um tubo longitudinal, o canal ginecóforo, onde se aloja a fêmea. Além disso, seu tegumento apresenta-se recoberto de minúsculas projeções, os tubérculos, mais presentes na porção dorsal do segmento posterior. No segmento anterior apresenta duas ventosas, sendo a mais periférica uma ventosa oral e a uma pequena distância desta, uma outra ventosa ventral, denominada acetábulo. A fêmea mais longa e delgada que o macho, apresenta coloração escura. Esta pigmentação é derivada da digestão da hemoglobina presente no sangue, gerando um pigmento de cor escura acinzentado, a hemozoína. Além disso, possui poucos tubérculos em seu tegumento e apresenta em sua extremidade anterior duas ventosas menores, oral e ventral, próximas uma da outra.^{1,3-4}

O casal de parasitas permanece acoplado por toda vida após atingirem sua total maturação. Ao contrário do que ocorre com o macho, a maturação da fêmea acontece somente após o pareamento entre os vermes. Os casais pareados vivem na luz dos vasos sanguíneos de seus hospedeiros definitivos, preferencialmente no interior dos plexos venosos perivesical (*S. haematobium*) ou mesentérico (outras espécies), onde se alimentam de sangue e globulinas através da glicólise anaeróbica, sendo seus dejetos regurgitados no sangue do hospedeiro.^{1,3}

No Brasil, o único causador da esquistossomose é o *S. mansoni*. Esta parasitose é endêmica em vasta extensão do território nacional, e considerada ainda um grave problema de saúde pública, pois acomete milhões de pessoas provocando um número expressivo de infecções graves e óbitos. Atualmente, estima-se que aproximadamente 25 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a doença, e que cerca de 1,5 milhões encontram-se infectadas.⁵⁻⁶

A distribuição geográfica da esquistossomose no território brasileiro pode ser observada na figura 2, sendo que esta distribui-se mais intensamente numa faixa de terras contínuas e contíguas ao longo de quase toda a costa litorânea da região Nordeste, a partir do Rio Grande do Norte em direção ao Sul, incluídas as zonas quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia,

onde se interioriza alcançando Minas Gerais, no Sudeste, seguindo o trajeto de importantes bacias hidrográficas.⁷

Figura 2 - Distribuição da Esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos–2012.

Fonte: BRASIL...⁷

O parasita, *S. mansoni*, possui um ciclo de vida composto por vários estágios (figura 3-A), que inicia-se quando o hospedeiro definitivo, homem contaminado, elimina suas fezes com ovos do parasita em rios, lagos ou represas, em regiões onde não há saneamento básico. Ao entrar em contato com a água e com estímulos de luminosidade, os ovos incham, eclodem e liberam os miracídeos, que representam o primeiro estágio de vida livre do parasita. Os miracídeos nadam até encontrar seu hospedeiro intermediário, que no caso do *S. mansoni* são os caramujos do gênero *Biomphalaria*. Os miracídeos penetram pelos tecidos do caramujo, onde ocorre a multiplicação da forma assexuada, os esporocistos, que darão origem às formas multicelulares, as cercárias. Estas são a segunda forma livre

do parasita e também a forma infectante. As cercárias abandonam o molusco e ao encontrarem seu hospedeiro definitivo, penetram pela pele. Estas continuam a penetrar os tecidos até encontrar pequenos vasos sanguíneos. Neste processo as cercárias perdem suas caudas, transformando-se em esquistossômulos. Viajam então pelas veias, passando pelo coração e atingem os pulmões pelas artérias pulmonares, onde se fixam. Após alguns dias ocorre a transformação para a forma jovem, na qual liberam-se e migram pelas veias pulmonares, coração e artéria aorta até atingirem a veia porta hepática, no fígado, onde ocorrerá o amadurecimento dos parasitas em formas sexuais: macho e fêmea, e o acasalamento. Após este acasalamento, os parasitas migram juntos, contra o fluxo sanguíneo (migração retrógrada), atingindo as veias mesentéricas intestinais (figura 3-B), onde iniciam a postura dos ovos, sendo a fêmea capaz de produzir cerca de 300 ovos por dia. Os ovos apresentam um espinho, denominado espícula, que auxilia sua retenção nos tecidos, principalmente nos vasos sanguíneos. Os ovos atravessam as paredes dos vasos sanguíneos atingindo o intestino onde são liberados juntamente com as fezes, fechando o ciclo.^{1,8}

Figura 3 - Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Adaptada de DUNNE et al. ⁸

Grande parte dos ovos não chegam a atravessar o lúmen até o intestino, permanecendo na corrente sanguínea, sendo disseminados para diversos tecidos, acumulando-se principalmente no fígado. Estes ovos secretam enzimas proteolíticas que provocam reações inflamatórias e granulomatosas eosinofílicas típicas, que progressivamente são substituídas por depósitos fibrosos. Estas reações inflamatórias geram um acúmulo anormal de líquidos no interior da cavidade abdominal (peritoneal), sendo este quadro clínico denominado ascite (popularmente conhecido como Barriga d'água), uma das principais complicações causadas por esta parasitose.³

Não existe uma vacina contra a esquistossomose. O tratamento pode ser realizado com indivíduos infectados por meio da administração de duas drogas, Praziquantel ou Oxamniquina. As duas apresentam semelhanças na eficiência e nos efeitos colaterais, entretanto, por apresentar um menor custo o Praziquantel é mais

utilizado em oposição a Oxamniquina.⁹ Além disso, atualmente o praziquantel é o único medicamento indicado/utilizado pelos programas de controle da esquistossomose no mundo. É empregado em tratamentos em larga escala, apresentando uma alta eficiência, baixo custo, efeitos colaterais brandos e é administrado em dose única. Estudos demonstraram que o praziquantel interfere na homeostase de Ca^{2+} , atuando nos canais deste íon, entretanto o mecanismo real de ação desta droga ainda não foi completamente elucidado.¹⁰ O praziquantel é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*, mas é eficaz somente para parasitas adultos, não sendo eficaz contra parasitas na forma/estágio juvenis, não evitando desta forma uma reinfecção até mesmo que imediata. Estes fatores corroboram com o fato que o número de pessoas infectadas pouco mudou ao longo das últimas décadas.⁴ Além disso, uma redução da susceptibilidade do *Schistosoma mansoni* ao Praziquantel tem sido reportada e a resistência à droga pode ser induzida em condições experimentais, levantando a possibilidade de que poderia ser uma situação também vista em campo.¹⁰⁻¹¹ Desta forma, o desenvolvimento de novos mecanismos de intervenção são prioridade, como a criação de uma vacina, novas drogas e novas formas de diagnósticos. Para isso é necessário um maior conhecimento acerca deste parasita a nível molecular, para que assim possamos entender a dinâmica por ele utilizada na modulação da resposta imune.

1.2 A interação parasita-hospedeiro

A esquistossomose é provavelmente uma das doenças mais antigas da humanidade. As três fases evolutivas e migratórias dos vermes em seu hospedeiro definitivo (esquistossômulo, verme adulto e ovo) definem os aspectos fisiológicos e patológicos observados na interação parasito-hospedeiro da doença. Os ovos e as reações granulomatosas que os envolvem constituem os principais fatores causadores de morbidade, pois os vermes adultos apresentam eficientes estratégias de evasão do sistema imune humano, podendo permanecer em seus vasos sanguíneos por décadas, sendo totalmente expostos ao sistema imunológico, mas sem desencadear uma resposta inflamatória.^{3,8,12} Os parasitas não só utilizam táticas de evasão do sistema imune, mas também subvertem e utilizam a resposta imune

do hospedeiro para facilitar seu próprio desenvolvimento e sua transmissão.^{8,12} Diversos mecanismos de modulação foram propostos como fatores de modificação da resposta imune, entre eles: a utilização de antígenos de superfície e mimetismo molecular (mediado por proteínas e outras moléculas secretadas/expostas), interferência ativa no mecanismo da síntese de citocinas e indução da apoptose de células do hospedeiro.¹²⁻¹⁶

A principal interface de interação parasito-hospedeiro é o tegumento do parasita. Este é composto por estruturas celulares dinâmicas, que exercem importantes papéis fisiológicos, como a regulação osmótica, recepção sensorial, nutrição, transdução de sinal, além de atuar como uma barreira física protetora para o parasita. Além do mais, as diversas camadas que constituem o tegumento estão em contínuo processo de renovação, o que dificulta o reconhecimento e a ligação de proteínas do hospedeiro a esta estrutura, facilitando desta forma, a evasão do parasita ao sistema imune. Através do tegumento também são secretadas/expostas uma gama de proteínas e moléculas que atuam diretamente na modulação da resposta imune.¹⁷⁻¹⁹

Outra importante interface de interação recentemente estudada é a cavidade do esôfago do parasita. O esôfago é dividido em duas regiões, anterior e posterior. Ao redor da região posterior há um agregado celular composto de vesículas secretoras, que compreendem a glândula do esôfago (posterior), estrutura responsável pela expressão de diversas proteínas e moléculas que são liberadas no lúmen do esôfago. Não menos importante, ao redor da porção anterior do esôfago há também um agregado celular (menor comparado ao do esôfago posterior), composto também por vesículas secretoras. Esta região é classificada como um órgão secretor independente, e foi recentemente nomeada como glândula do esôfago anterior. A luz do compartimento do esôfago anterior é semelhante ao formato de um espaguete, o que permite que as células do hospedeiro que entram nesta cavidade sofram um emaranhamento, aumentando desta forma, o tempo de retenção destas células no local, e o consequente aumento do tempo de interação com as secreções do parasita. Análises de microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que leucócitos formam um cordão no esôfago posterior. Neste cordão foi possível observar a presença de diferentes tipos de leucócitos, como neutrófilos, eosinófilos e leucócitos mononucleares em diversos

estágios de degradação, além de plaquetas com grânulos característicos e detritos presentes no centro do lúmen, rodeados de um denso precipitado de proteínas. Em um outro estudo, utilizando-se anticorpos contra uma proteína expressa pelo parasita, a proteína MEG-4.1, foi possível evidenciar a presença da mesma fortemente associada com a corrente de leucócitos, mostrando de maneira direta a interação de uma proteína do parasita com células do sistema imune humano. Foi demonstrado ainda que anticorpos do hospedeiro interagem de forma intensa nestes compartimentos, indicando que as secreções presentes nestes locais são altamente imunogênicas. Desta forma, pode-se concluir que o esôfago não é um simples tubo muscular que transporta o sangue da cavidade oral para o intestino. Ambas as regiões deste importante compartimento estão intimamente relacionadas à sobrevivência do parasita, tanto por ser nessa região que se inicia o processo de digestão das hemácias, quanto pela proteção exercida através da neutralização das células e moléculas do sistema imune do hospedeiro.²⁰⁻²¹

Para garantir o equilíbrio e a perpetuação contínua do parasita sem efeitos deletérios ao homem, foi necessário o estabelecimento de um complexo mecanismo de interação parasita-hospedeiro. Este mecanismo foi desenvolvido durante milhares de anos, no qual o parasita adaptou-se a seu hospedeiro, modulando e aproveitando o sistema imune para seu próprio desenvolvimento. Esta capacidade de adaptação do parasita juntamente com o seu mecanismo de infecção, são apontados como os protagonistas por limitar a morbidade dos hospedeiros e garantir a perpetuação das espécies do parasita, propiciando sua co-evolução com a espécie humana. Contudo, os mecanismos moleculares da interface do sistema imunológico com o parasita estão distantes de serem completamente compreendidos, tornando necessário maior conhecimento a nível básico dos moduladores envolvidos nestas interações.^{8,12}

1.3 Genes Micro-exons (MEGs) e proteínas codificadas por MEGs (PCMs)

Em 2009 foram publicados simultaneamente os genomas do *S. mansoni* e *S. japonicum*, e em 2011 do *S. haematobium*, as três principais espécies de *Schistosomas* que causam a parasitose ao homem.²²⁻²⁴ Estes trabalhos forneceram

um grande número de novas informações moleculares sobre os parasitas, possibilitando novas e diferentes perspectivas e abordagens em relação à biologia e fisiologia dos parasitas, a interação destes com seus hospedeiros e também novos potenciais alvos farmacológicos e vacinais contra a esquistossomose.

Juntamente com a publicação do genoma do *S. mansoni* foi descrito um grupo de genes que apresentavam características bastantes singulares. Esse grupo foi denominado genes micro-exons (*micro-exon genes* - MEGs). Os *micro-exons* são *exons* muito curtos, que já foram descritos para alguns genes em diferentes espécies. Os genes que apresentam micro-exons em suas estruturas podem variar de 0,5 a 1,6% do total de genes de um organismo.²⁵ Na maioria dos casos, somente um único *micro-exon* é detectado por gene. Entretanto, para o *S. mansoni* observou-se inicialmente um grupo de 14 genes que apresentavam um elevado número de *micro-exons* em suas estruturas, além disso, nenhum desses genes codificam proteínas que tenham similaridade com proteínas fora do gênero *Schistosoma*, indicando que provavelmente exercem funções bem específicas.²²

A figura 4 mostra de maneira resumida as principais características estruturais dos genes pertencentes à família MEG. Alguns grupos de MEGs são constituídos por membros, que estão indicados entre parênteses. Os exons estão representados em “caixas” com diferentes cores, cada uma referente a uma característica específica: *micro-exons* com tamanho múltiplos de 3 pares de bases (indicados em vermelho) ou não múltiplos de 3 pb (indicados em alaranjado); exons longos maiores de 36pb que possuem tamanhos que são múltiplos de 3pb (indicados em azul) ou não são múltiplos de 3pb (indicados em verde); prováveis exons de iniciação e terminação (cinza); regiões não traduzidas (UTR) (preto). Além disso, os números acima de cada caixa representam o tamanho do exon em nucleotídeos e os íntrons apresentam-se como traços de tamanho fixo.

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura dos genes pertencentes à família MEG.

Fonte: Adaptada de BERRIMAN et al.²²

Foi observado que os *micro-exons* compreendem cerca de 75% das seqüências codificantes dos MEGs, sendo estes flanqueados nas extremidades 5' e 3' por exons convencionais contendo regiões UTR (regiões não-traduzidas). Além disso, os *micro-exons* múltiplos de 3 pares de bases (pb) predominam na estrutura dos MEGs.²²

O trabalho realizado em 2010 por DeMarco e colaboradores, utilizando MEGs selecionados, demonstrou que algumas cópias dos genes produzem numerosas formas de *splicing* alternativo. Tais eventos fornecem uma explicação para a manutenção de pequenos *exons* com comprimento múltiplo de 3, pois permitem que pequenas porções possam ser removidas de um transcrito sem alterar o quadro de leitura. Como resultado, observou-se que a tradução de tais transcrições variantes pode gerar diversas isoformas de proteínas a partir de cada MEG, sendo a maioria delas com pequenas diferenças de peso molecular e ponto isoelétrico (pI).²⁶

Algumas proteínas codificadas por MEGs (PCMs) foram detectadas em secreções de ovos e esquistossômulos.^{22,26} Além disso, experimentos de imunolocalização e WISH (*Whole mount In-Situ Hybridization*) em vermes adultos do parasita *S. japonicum* permitiram a localização de PCMs e seus transcritos na glândula do esôfago do parasita. A figura 5, mostra os transcritos das proteínas MEG-4.2 e MEG-14 localizados exclusivamente na glândula do esôfago do verme adulto. Além do mais, é possível observar a localização da proteína MEG-4.1, nesta mesma região.²⁰ Estes dados corroboram com a hipótese de que as proteínas pertencentes a esta família estejam sendo secretadas/expostas para o meio externo, possibilitando contato direto com o sistema imunológico humano, uma vez que a grande maioria das PCMs possui peptídeo sinal previsto em sua sequência (figura 4).

Figura 5 - Localização de transcritos e proteínas na glândula esofágica de vermes inteiros adultos permeabilizados.

Fonte: LI et al.²⁰

Outra evidência de que as PCMs estão expostas ao sistema imune foi obtida através da análise filogenética e estrutural dos genes pertencentes a família MEG, utilizando-se sequências de transcritos e predições gênicas das três principais

espécies que acometem o homem (*S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*). Neste estudo verificou-se que os ortólogos desta classe de genes, para as espécies de *Schistosoma* utilizadas, apresentavam uma maior taxa de mutação quando comparadas com um conjunto de genes codificando proteínas com peptídeo sinal (controle). Análises adicionais com os genes parálogos demonstraram também que a exposição das proteínas ao sistema imunológico humano é um fator determinante para o aumento da taxa de mutação para esses genes.²⁷

A geração de proteínas variantes e, portanto, os antígenos, como uma estratégia para evitar uma resposta imune do hospedeiro já foi descrita de maneira análoga para outros dois parasitas sanguíneos (protozoários), *Trypanosoma* e *Plasmodium*, sugerindo que a variação de proteínas que observamos em *Schistosoma* é um componente de uma estratégia de evasão imune, conferindo algum benefício sobre o hospedeiro.²⁸⁻²⁹ No entanto, existem diferenças significativas entre *Schistosoma* e os dois protozoários. Deste modo, ainda existem grandes dúvidas em relação à função das proteínas codificadas por MEGs e o eventual mecanismo de escape do sistema mediado por elas.

1.4 Proteína S100A9 e proteína CC2D1A

Estudos prévios envolvendo experimentos de duplo híbrido realizados em nosso grupo, utilizaram a proteína codificada pelo MEG-14 como isca contra uma biblioteca de leucócitos humanos. Nestes estudos foram encontrados dois possíveis parceiros de interação para a proteína MEG-14. Sendo eles, as proteínas humanas pertencentes ao sistema imunológico, S100A9 e a CC2D1A. Como descrito anteriormente, as proteínas codificadas pelos MEGs são proteínas que encontram-se em contato direto com o sangue de seu hospedeiro, e desta forma, interações entre PCMs e proteínas do sistema imunológico humano são totalmente plausíveis.

1.4.1 Proteína S100A9 e complexo S100A8/A9

A proteína S100A9 pertence à família de proteínas S100, que representa o maior subgrupo dentro da superfamília de proteínas de ligação ao cálcio, *EF-hand*.³⁰ A designação *EF-hand* foi criada por R. H. Kretsinger, após o estudo de uma pequena proteína ligadora de cálcio, a parvalbumina, isolada do musculo de carpa. A parvalbumina, assim como as outras proteínas pertencentes a superfamília *EF-hand*, possui um motivo comum do tipo hélice-loop-hélice, que apresenta alta afinidade pelo íon cálcio, sendo as letras E e F referentes as hélices que constituem o motivo hélice-loop-hélice da parvalbumina.³¹

As proteínas da família S100 foram primeiramente identificadas por B.W. Moore, e foram assim nomeadas por serem solúveis em solução de sulfato de amônio 100% saturada.³⁰ Em humanos, foram identificados 25 membros dessa família, sendo que os genes das S100 são encontrados somente em vertebrados. Estruturalmente, estas proteínas são pequenas, possuindo entre 10 a 13 KDa, e possuem em sua sequência primária a presença de dois motivos do tipo *EF-hand* e compartilham entre si identidade em torno de 50% na constituição de aminoácidos.³²

A proteína S100A9, juntamente com a S100A8 e S100A12 constituem um subgrupo de proteínas S100, denominado calgranulinas. A maioria das S100 encontram-se em homodímeros, entretanto, duas das calgranulinas, a S100A8 e a S100A9, podem formar heterodímeros e heterotetrâmeros na presença de cálcio. A oligomerização que ocorre em grande parte das proteínas da família S100, são majoritariamente dependentes de cálcio. Além disso, a ligação do cálcio às proteínas resulta na exposição de superfícies hidrofóbicas das mesmas, podendo promover interações com proteínas ou moléculas alvo.³³⁻³⁵

A estrutura tridimensional dos complexos (S100A8)₂ e (S100A9)₂ resolvidas por cristalografia (figura 5- A e B), mostram que os homodímeros apresentam semelhanças estruturais com as outras proteínas da família S100, possuindo dois sítios de ligação ao cálcio, do tipo *EF-hand*. Assim como nas demais proteínas S100, os motivos *EF-hands* encontrados são observados em regiões distintas das estruturas, sendo que o motivo presente no C-terminal é um clássico motivo de ligação ao Ca²⁺, enquanto que o motivo encontrado no N-terminal exibe uma

extensa estrutura de loop, específica para proteínas S100, conhecido como pseudo-canônico, possuindo uma afinidade de Ca^{2+} reduzida. A estrutura tridimensional do heterocomplexo $(\text{S100A8/A9})_2$ também foi resolvida por cristalografia (figura 5-C), revelando que a ligação do cálcio aos *loops* (EF-hand) do C-terminal são essenciais para a formação do heterotetrâmero, explicando o porquê da dependência deste íon para a formação do complexo.^{34,36-37}

Figura 6 - Estruturas tridimensionais das proteínas $(\text{S100A8})_2$, $(\text{S100A9})_2$ e $(\text{S100A8/A9})_2$ ligadas ao íon cálcio

Fonte: KORNDORFER et al.;³⁴ GUIGNARD et al.;³⁶ ISHIKAWA et al.³⁷

S100A8 e S100A9 são preferencialmente expressas por células de origem mielóide. São as proteínas mais abundantes em neutrófilos, compreendendo aproximadamente 40% do conteúdo proteico do citosol e consideradas responsáveis majoritariamente pela contribuição da capacidade de ligação de cálcio dessas células.³⁷ Experimentos de *knock-out* do gene S100A8 em camundongos acarretaram a morte dos mesmos durante o desenvolvimento embrionário, mostrando assim que este gene é essencial para a vida. Surpreendentemente, o *knock-out* do gene S100A9, não acarretou alterações fenotípicas nos camundongos, indicando desta forma, que estas proteínas exercem funções distintas.³⁸⁻⁴⁰

O aumento do nível sérico do heterodímero S100A8/S100A9 em humanos já foi relatado para diversas doenças inflamatórias e autoimunes, sendo algumas delas, artrite reumatoide, fibrose cística, e Alzheimer.⁴¹⁻⁴³ Além do mais, diversos estudos demonstraram a interação do complexo S100A8/A9 e do homodímero

S100A9 com os receptores proinflamatórios, RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts* - Receptor para Produtos Finais de Glicosilação) e TLR4 (*Toll-Like Receptors 4*).⁴⁴⁻⁴⁵ Estes receptores são uns dos responsáveis pela inicialização da sinalização da cascata inflamatória, bem como pela geração de citocinas e moléculas de adesão celular.⁴⁶⁻⁴⁷ Desta forma, o eixo de interação do heterodímero e do homodímero S100A9 com os receptores RAGE e TLR4 está diretamente relacionado a perpetuação do estímulo inflamatório.

1.4.2 Proteína CC2D1

As proteínas CC2D1 humanas são conservadas através da evolução, com ortólogos em espécies de invertebrados, incluindo *C. elegans*, e estão intimamente relacionadas com a proteína CC2D1 de rato (identidade de aminoácidos igual a 82,1%). A família de proteínas CC2D1 é composta por dois membros: CC2D1A e CC2D1B, que partilham uma identidade de aminoácidos de 40,8% em seres humanos.⁴⁸ O gene CC2D1B humano foi mapeado no cromossomo 1, mas ainda não foi associado a nenhuma doença humana. Contudo, dados preliminares indicam que CC2D1B atua como um repressor de transcrição.⁴⁹ A análise da sequência de aminoácidos da CC2D1A humana revelou a presença de vários domínios conservados, incluindo quatro domínios DM14 (*Drosophila melanogaster* 14) de função desconhecida, que são conservadas em homólogos da família CC2D1A/B, um domínio hélice-loop-hélice (HLH), um domínio C2 conservado (proteína quinase C região conservada 2), um domínio rico em prolina cogitado como o responsável por ligações/interações da proteína, motivos de oligomerização *coiled-coil*, sítios de fosforilação putativa para proteína-quinases A e C, e dois sítios de proteína calmodulina quinase cálcio dependente II/IV (CaMK).⁵⁰⁻⁵²

Inicialmente a proteína CC2D1A foi indicada como ativadora do fator nuclear κ B1 e como repressora de transcrição do gene receptor de serotonina-1A, e sua desregulação foi associada com transtorno depressivo maior.⁵³ Além disso, uma deleção no C-terminal do gene CC2D1A foi ligada ao atraso mental não-sindrômico.⁵⁴ Um estudo realizado demonstrou que a proteína CC2D1A, também conhecida como TAPE (proteína associada ao TBK1 em endolisossomos) interage

de forma cooperativa com receptores da imunidade inata, TLR3 e TLR4, induzindo assim a ativação sinérgica do IFN- β (interferon- β : fator pró-inflamatório).⁵⁵ Neste mesmo trabalho foi demonstrado a co-localização da CC2D1A ligada a uma proteína lisossômica em endossomos de células de mamíferos.⁵⁵

Desta forma, diversos estudos com a proteína CC2D1A sugerem que funcionalmente esta proteína atue como uma proteína andaime que interage/conecta várias distintas funções celulares, através da interação com diversas proteínas.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo obter informações estruturais e biofísicas das proteínas codificadas pelos micro-exons 11 (MEG-11) e 14 (MEG-14), além de confirmar e analisar a interação da proteína MEG-14 com importantes proteínas do sistema imunológico humano, as proteínas S100A9 e CC2D1A. Este estudo foi realizado a fim de auxiliar no melhor entendimento das funções biológicas de algumas dessas proteínas codificadas por MEGs, uma vez que esta classe de proteínas é inédita e não possui similaridade com outras proteínas fora do gênero *Schistosoma*.

Desta forma, os objetivos específicos foram:

- Clonar e expressar em sistema heterólogo as proteínas codificadas pelos MEGs 11 e 14;
- Estabelecer um protocolo de purificação para cada produto recombinante;
- Estudar e caracterizar essas proteínas através de técnicas biofísicas, como dicroísmo circular convencional (CD), dicroísmo circular utilizando radiação síncrotron (SRCD), fluorescência intrínseca e espalhamento dinâmico de luz (DLS);
- Confirmar e estudar a interação da proteína codificada pelo MEG-14 com seus dois possíveis parceiros proteicos, a proteína S100A9 e CC2D1A, a partir da utilização do ensaio de *pull-down*, e das técnicas de CD e SRCD, ressonância plasmônica de superfície (SPR), calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e ensaios *ex vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem dos genes de MEG-11, MEG-14, S100A8, S100A9-GST e S100A9-Sumo

Inicialmente, foram realizadas as amplificações das sequências codificantes dos genes MEG-11 e MEG-14 a partir de reações de RT-PCR (Transcrição-Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase). A primeira etapa deste procedimento, consistiu-se em extrair o RNA mensageiro (RNAm) de vermes adultos através da utilização do kit *Total RNA Extraction Kit [Mini] Protocol Book* (Real Genomics), seguindo-se o protocolo indicado pelo fabricante. Este RNAm foi utilizado como molde inicial para a reação de RT, realizada utilizando-se o kit *SuperScript® III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen). Os DNAs complementares (cDNA) gerados foram utilizados para as reações de PCR, juntamente com 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM dos primers flanqueadores específicos para cada clone (tabela 1), 2,5 unidades de *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Fermentas), 5 µL de 10X *High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂* (Fermentas) e água suficiente para completar o volume final de 50 µL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (*Eppendorf Mastercycler® gradient*), segundo o programa: 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e extensão da cadeia a 72 °C por 1 minuto. Este procedimento foi repetido durante 35 ciclos e foi seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

As duas construções da S100A9 (S00A9/pGEX e S100A9/pETSumo) foram amplificadas por PCR utilizando-se como *template* uma alíquota da biblioteca de cDNA de leucócitos humanos (Clontech), seguindo-se os mesmos parâmetros utilizados no PCR citado acima. O gene correspondente à proteína S100A8 foi otimizado para códon *usage* de *E. coli* através da síntese de um gene sintético pela empresa GENONE BIOTECHNOLOGIES (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Entretanto, devido à presença de um sítio de restrição específico para uma das enzimas utilizadas no meio da sequência do gene sintetizado, foi necessário desenhar *primers* com sítios de restrição diferentes dos iniciais e seguir com a reação de PCR, segundo as rotinas citadas anteriormente.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para reações de amplificações neste trabalho

Nome	Plasmídeo de expressão	Sequências dos oligonucleotídeos
MEG-11/Fw (BamHI)	pETSumo	GGATCC GATGGTGAAGAGGAAGAAAATGAAGAGG
MEG-11/Rv (XhoI)	pETSumo	CTCGAG TGATGGCGCAGTTAAAAATGCT
MEG-14/Fw (NdeI)	pET28a	CATATG ACTTCAGCAAATAGTCGTAC
MEG-14/Rv (EcoRI)	pET28a	GAATTC TTAAGCTTCATCATGTGGT
S100A9/Fw (BamHI)	pGEX	A GGATCC TAATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTGG
S100A9/RV (XhoI)	pGEX	G CTCGAG TTAGGGGGTGCCCTCCCCGAG
S100A9/Fw (BamHI)	pETSumo	CGCATCC ATGACTTGCAAAATGTCGCAGCTGG
S100A9/Rv (XhoI)	pETSumo	G CTCGAG TTAGGGGGTGCCCTCCCCGAG
S100A8/Fw (BamHI)	pET28a	GGATCC ATGCTGACTGAACTGGAAAAAGC
S100A8/Rv (XhoI)	pET28a	CTCGAG TTACTCTTTGTGGGACTCTTCGTG

Fonte: Elaborada pela autora

*Os nucleotídeos em vermelho representam os sítios de clivagem para enzimas de restrição que estão entre parênteses em azul.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados a partir de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, seguidos de purificação com *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, os produtos purificados foram inseridos em plasmídeo de propagação pGEM®-T (Promega), por meio de uma reação de ligação. A quantidade dos insertos foram calculados a partir da expressão abaixo:

$$\frac{50\text{ng de pGEM} \times \text{tamanho do inserto (Kb)}}{\text{tamanho do vetor (Kb)}} \times 1:3 (\text{vetor: inserto}) = \text{quantidade do inserto (ng)}$$

Ao volume de cada inserto foram adicionados 50 ng do vetor pGEM®-T, 5 µL de *2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase* (Promega), 3 unidades de *T4 DNA Ligase* (Promega) e água *nuclease-free* para um volume final de 10 µL. As reações foram incubadas por 16 horas a 4 °C. Os produtos das reações de ligação foram

utilizados para transformar, através de choque térmico, células de propagação competentes por CaCl_2 da linhagem DH5- α de *E. coli*.

Para a transformação, adicionou-se 50 μL de células competentes a cada reação de ligação (10 μL). Estas misturas foram homogeneizadas e mantidas em gelo por 20 minutos e em seguida, foram transferidas para banho-maria à 42 °C durante 2 minutos, sendo imediatamente transferidas para o gelo por mais 5 minutos. Após o choque térmico foram adicionados 200 μL de meio de cultura Luria-Bertani líquido (LB), incubando-se as misturas celulares por 60 minutos a 37 °C. As suspensões de células foram plaqueadas em meio sólido LB (com 1,5% de ágar) contendo 0,5 mM de IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) (Sigma-Aldrich), 80 $\mu\text{g/mL}$ X-gal ((5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) (Fermentas) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich). Cinco colônias de coloração branca de cada clone foram inoculadas em 6 mL de LB líquido com 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, seguidos de incubação por 16 horas a 37 °C, com agitação de 200 rpm. Em seguida procedeu-se com a extração de DNA plasmidial através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

Visando confirmar os plasmídeos recombinantes, foram realizadas análises de restrições para verificação da liberação dos insertos. As endonucleases utilizadas para cada clone estão descritas na tabela 1, sendo a reação composta de 500 ng de DNA plasmidial, 0,25 unidade de cada endonuclease (FastDigest Enzymes -Thermo scientific), 1 μL do tampão *FastDigest Buffer* 10X (Thermo scientific) e quantidade de água suficiente para 10 μL . Para verificação das identidades das sequências, os clones positivos foram levados ao sequenciamento automático no equipamento ABI 3130x1 (*Applied Biosystems*) utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o vetor pGEM-T, SP6 e T73G.

3.2 Subclonagem dos genes MEG-11, MEG-14, S100A8, S100A9-GST e S100A9-Sumo

Para a subclonagem dos insertos em plasmídeos de expressão, foram realizadas reações de digestão com os clones positivos anteriormente clonados em pGEM-T e com os plasmídeos de expressão previamente definidos para cada gene de trabalho (tabela 1). Desta forma, foram realizadas reações de digestão com 2 ng de plasmídeo recombinante/expressão, 3 µL do tampão *FastDigest Buffer* 10X, 1 unidade de cada enzima *FastDigest* (específica para cada construção – tabela 1) e água em quantidade suficiente para 50 µL. As reações foram mantidas a 37 °C por 4 horas e em seguida os fragmentos de DNA liberados foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), após eletroforese em gel de agarose 1%.

As reações de ligação dos insertos nos plasmídeos de expressão foram realizadas na proporção 1:3 (plasmídeo: inserto), sendo o procedimento similar ao da ligação ao pGEM-T citada acima. As reações de ligação foram utilizadas para transformar cepas de bactérias DH5-α, por choque térmico. As bactérias transformadas foram plaqueadas em LB contendo canamicina (25 µg/mL). Os plasmídeos foram então selecionados por clivagem com enzimas de restrição específicas para cada construção durante 2 horas a 37 °C. Após a confirmação dos recombinantes por análise de restrição, os clones selecionados foram submetidos novamente a sequenciamento para a verificação da integridade do inserto e em seguida, transformados em células de expressão por choque térmico, seguindo-se o protocolo descrito anteriormente. Nestes procedimentos, os clones MEG-11/pETSumo, S100A9/pGEX, S100A9/pETSumo e S100A8/pET28a foram inseridos em cepa Rosetta (DE3) de *E. coli*, e o clone MEG-14/pET28a inserido em cepa BL21 (DE3) de *E. coli*.

3.3 Expressão heteróloga das proteínas

Para cada proteína foi inoculada uma colônia isolada de *E. coli* contendo os plasmídeos recombinantes em 5 mL de meio líquido LB acrescido de antibióticos específicos de seleção (tabela 2) e incubados sob agitação constante de 250 rpm, durante 16 horas à 37 °C. Os pré-inóculos foram acrescentados separadamente em meio LB em uma proporção 1:50, suplementado novamente com antibióticos específicos. As suspensões celulares foram incubadas sob agitação constante de 250 rpm, à 37 °C durante aproximadamente 2 horas ou até a cultura atingir uma absorbância entre 0,6 e 0,8 no comprimento de onda de 600 nm. Em seguida as culturas foram induzidas com IPTG e incubadas. A concentração do indutor, bem como as condições de expressão para cada proteína estão apresentadas na Tabela 2. Alíquotas dos estágios de pré-indução e pós-expressão foram coletadas e analisadas através de SDS-PAGE para verificação do nível de expressão das proteínas.

Tabela 2 - Condições e parâmetros utilizados na expressão das proteínas de trabalho

Nome das proteínas	Cepa de expressão	Antibióticos utilizado	Temperatura de expressão	Tempo de expressão	Quantidade de IPTG
MEG-11/Sumo-6Xhis	Roseta (DE3)	Canamicina (50 µg/mL) + Cloranfenicol (32 µg/mL)	37 °C	4 horas	0,5 mM
MEG-14/6Xhis	BL21 (DE3)	Canamicina (50 µg/mL)	37 °C	4 horas	0,5 mM
S100A9/GST	Roseta (DE3)	Ampicilina (50 µg/mL) + Cloranfenicol (32 µg/mL)	20 °C	16 horas	0,3 mM
S100A9/Sumo	Roseta (DE3)	Canamicina (50 µg/mL) + Cloranfenicol (32 µg/mL)	20 °C	16 horas	0,3 mM

continua

continuação

Nome das proteínas	Cepa de expressão	Antibióticos utilizado	Temperatura de expressão	Tempo de expressão	Quantidade de IPTG
S100A8/6Xhis	Roseta (DE3)	Canamicina (50 µg/mL) + Cloranfenicol (32 µg/mL)	20 °C	16 horas	0,3 mM
CC2D1A/GST	Roseta (DE3)	Ampicilina (50 µg/mL) + Cloranfenicol (32 µg/mL)	18 °C	16 horas	0,3 mM

Fonte: Elaborada pela autora

Após a expressão as células foram coletadas por centrifugação a 1100xg, em centrífuga refrigerada a 4⁰C, por 40 minutos. Os extratos celulares foram ressuspendidos em 15 mL de tampão específico para cada proteína (tabela 3). As suspensões celulares foram então lisadas por sonicação durante 16 minutos com pulsos intervalados de 30 segundos. Em seguida, os produtos das lises foram centrifugados por 20 minutos, 10.000 rpm à 4⁰C, separando-se as frações solúveis (porção sobrenadante que compreende as proteínas solúveis expressas pela bactéria) das frações insolúveis (porção precipitada que corresponde aos restos celulares e proteínas insolúveis). Aliquotas dessas frações foram analisadas através de SDS-PAGE 15% para avaliar a solubilidade das proteínas expressas.

Tabela 3 – Tampões de lise utilizados para as proteínas de trabalho

Nome das proteínas	Tampões utilizados
MEG-11/Sumo-6Xhis	20 mM de fosfato de Sódio pH 8.0, 250mM de NaCl, 5% de glicerol, 0.05% Tween
MEG-14/6Xhis	50 mM de Tris pH 8.0, 100mM de NaCl
S100A9/GST	50 mM de Tris pH 7.0, 150mM de NaCl
S100A9/Sumo-6Xhis	20 mM de fosfato de Sódio pH 7.0, 500mM de NaCl, 0.05% Tween
S100A8/6Xhis	20 mM de fosfato de Sódio pH 7.0, 500mM de NaCl
CC2D1A/GST	20 mM de fosfato de Sódio pH 8.0, 250mM de NaCl, 10% de glicerol, 0.05% Tween
GST	50 mM de Tris pH 7.0, 150mM de NaCl

Fonte: Elaborada pela autora

3.4 Purificação da proteína MEG-14

A proteína MEG-14 foi subclonada em plasmídeo de expressão pET28a. Este plasmídeo garante a expressão da proteína fusionada a uma cauda de seis resíduos de histidina (hexahistidina) na extremidade amino terminal. A função da cauda de hexahistidina é auxiliar a purificação das proteínas por meio de cromatografia de afinidade em coluna com metal imobilizado. Desta forma, a fração solúvel da proteína MEG-14 foi aplicada a 5 mL de resina Ni-NTA (Qiagen), previamente equilibrada com 50 mL do tampão para esta proteína (tabela 3). Em seguida, a coluna foi lavada com 100 mL de tampão acrescido de 10 mM de Imidazol e posteriormente, a proteína foi eluída em três lavagens de 15 mL com tampão de lise acrescido de 100 mM, 250 mM e 500 mM de Imidazol. Os eluatos correspondentes a todas as etapas de purificação foram coletados, e alíquotas dos mesmos foram analisadas através de eletroforese em gel de Tricina 16%, para avaliação do grau de pureza da amostra.

A quantificação da concentração de proteína foi realizada através do método do ácido bicinconínico (BCA), descrito no item 3.8.2. Em seguida, a cauda de hexahistidina, fusionada à extremidade amino-terminal, foi removida através da digestão com trombina bovina (Sigma-Aldrich). Para o procedimento foi utilizada 1 unidade de trombina para clivar 250 µg de proteína MEG-14, “overnight” à temperatura ambiente. Após a clivagem, a trombina foi removida da solução proteica através da incubação por 20 minutos e posterior passagem da mesma em coluna contendo resina de benzamidina (Benzamidine Sepharose 4 Fast Flow – GE Healthcare).

A solução proteica foi concentrada em concentrador *Millipore* de 3 kDa até o volume de aproximadamente 2 mL. Em seguida, esta solução foi centrifugada a 16000xg, por 10 minutos a 4 °C, para descarte de possíveis precipitados. Logo em seguida, o sobrenadante foi aplicado na coluna de exclusão molecular *superdex 75 10/300 GL* (GE Healthcare), visando obter a proteína com um elevado grau de pureza e simultaneamente transferir a proteína para os tampões específicos para cada experimento. A coluna foi previamente equilibrada com o tampão utilizado nas

corridas. O fluxo utilizado foi 0,5 mL/minuto, sendo coletadas frações de 1 mL e o monitoramento da absorbância realizado em 220 nm (ausência de aminoácidos aromáticos). Alíquotas das frações que apresentaram um ganho na absorbância foram corridas em gel de Tricina 16% para análise. As amostras foram alíquotadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

3.5 Purificação da proteína MEG-11

A proteína MEG-11 foi subclonada em plasmídeo de expressão pETSumo. As proteínas expressas neste plasmídeo carregam na região amino-terminal uma proteína de fusão (Sumo) acrescida de uma cauda de hexahistidina. Desta forma, a proteína MEG-11 foi primeiramente purificada utilizando-se coluna contendo resina Ni-NTA, sendo o procedimento de purificação realizado de maneira semelhante ao citado anteriormente, alterando-se as eluições, que foram realizadas com duas lavagens de 15 mL de tampão específico acrescido 500 mM e 600 mM de Imidazol, respectivamente. A quantificação da proteína acrescida da sumo fusão foi realizada através de medidas da absorbância e da relação com o coeficiente de extinção apresentado pela proteína.

Em seguida, a Sumo fusão foi clivada utilizando-se a enzima ULP-1 (conhecida como SUMO protease). Esta enzima foi obtida pela expressão heteróloga do seu gene que foi cedida pelo prof. Dr. Marcos V. A. Navarro, do grupo de biofísica “Sergio Mascarenhas” do IFSC. O gene foi inserido em células de expressão da linhagem BL21 de *E. coli*, expressas a 18 °C, durante 16 horas, após a indução com 0,1 mM de IPTG, seguindo os mesmos parâmetros de expressão descritos no item 3.3. A purificação da enzima foi realizada em coluna de níquel, como foi descrito anteriormente (item 3.4), utilizando-se o tampão 25 mM de Tris pH8.0, 300 mM de NaCl e 10% de glicerol. Após a purificação, a pureza da amostra foi verificada por SDS-PAGE e quantificada por BCA. A reação de clivagem foi realizada na proporção 1 mg de SUMO protease para 50 mg da solução de proteína/Sumo eluída, sendo a mesma realizada a 16 °C durante 2 horas.

Para retirada do imidazol da amostra proteica, a mesma foi passada em coluna *HiTrap Desalting* (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão específico para a proteína MEG-11. A absorbância foi monitorada em 280 nm, com fluxo de 2 mL/minuto e as frações coletadas de 2 mL. Em seguida a solução foi passada novamente em coluna de afinidade em níquel, uma vez que a proteína clivada não interage mais com a resina, somente a sumo fusão e a sumo protease, havendo desta maneira a separação entre elas. Desta forma, o eluato foi coletado e em seguida foram realizadas 2 lavagens de 10 mL com tampão de lise acrescido de 10 mM de Imidazol, também coletados. Posteriormente, lavou-se a coluna com 20 mL de tampão acrescido de 600 mM de imidazol para retirada da sumo fusão e da SUMO protease da coluna. Todas as frações foram coletadas e analisadas através de gel de tricina 10%.

Para as demais etapas de concentração das amostras e purificação em coluna de exclusão molecular, procedeu-se de maneira similar ao descrito anteriormente para a proteína MEG-14.

3.6 Purificação da proteína S100A9 (construção fusionada à Sumo) e da proteína S100A8

Assim como a proteína MEG-11, a proteína S100A9 também foi expressa fusionada com a proteína de fusão Sumo. Os procedimentos da primeira purificação em coluna de Ni-NTA, quantificação, clivagem com a SUMO protease, segunda purificação em Ni-NTA e a purificação por exclusão molecular foram realizadas de maneira análoga ao descrito para a proteína MEG-11.

A purificação da proteína S100A8 foi realizada tal como realizada para a proteína MEG-14, entretanto, para a proteína S100A8, foi utilizado o seu coeficiente de extinção para quantificação proteica. Além disso, não foi realizada a clivagem de sua cauda de hexahistidina, sendo os experimentos realizados com a presença da mesma.

3.7 Purificação da proteína S100A9 e CC2D1A (fusionadas a GST) e da proteína GST

As proteínas S100A9 e CC2D1A fusionadas a proteína GST e somente a proteína GST, foram previamente purificadas para posterior realização do experimento de *pulldown*. A fração solúvel do extrato celular foi passado por uma coluna contendo resina Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow, sendo a mesma em seguida lavada com 20 mM de tampão adequado para cada proteína. As eluições foram realizadas utilizando 2 lavagens com 10 mL com tampão acrescido de 10 mM de glutathione reduzida. As eluições foram reunidas, concentradas, quantificadas e em seguida aplicadas em coluna HiTrap Desalting (GE Healthcare), para retirada da glutathione reduzida.

3.8 Quantificação das amostras proteicas

3.8.1 Espectroscopia de absorção

As concentrações das proteínas recombinantes estudadas neste trabalho (todas, exceto a proteína MEG-14, por apresentar ausência de aminoácidos aromáticos em sua estrutura primária) foram determinadas através da medição de suas absorbâncias em 280 nm, em um espectrofotômetro U-2800 (HITACHI) (em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm) ou em um espectrofotômetro nanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*). Esta absorbância foi relacionada ao coeficiente de extinção molar de cada proteína. Os coeficientes foram obtidos através das submissões das sequências de aminoácidos das proteínas ao programa *ProtParam* ⁶⁶ (<http://web.expasy.org/protparam/>) do servidor ExPASy (*Expert Protein Analysis System* - <http://www.expasy.org/>). Além de fornecer o coeficiente de extinção molar, este programa fornece informações adicionais, como peso molecular, pI teórico, porcentagem de aminoácidos, entre outros.

Os cálculos foram realizados a partir da Lei de Lambert-Beer através da seguinte equação:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon \times l}$$

na qual: ϵ = coeficiente de extinção molar ($M^{-1}.cm^{-1}$)

l = caminho ótico (cm)

A_{280} = absorbância da amostra em 280 nm

c = concentração da amostra (M)

3.8.2 Ácido bicinconínico (BCA)

A quantificação de proteínas através do método do ácido bicinconínico (BCA) é simples, rápida e precisa. O método combina a redução do íon cobre (Cu^{+2} para Cu^{+1}) pela proteína em um meio alcalino, com o ácido bicinconínico (BCA). O BCA apresenta alta sensibilidade e seletividade na detecção colorimétrica do cátion de cobre (Cu^{+1}), apresentando coloração púrpura após sua interação com este íon. Este complexo solúvel em água exibe uma alta absorbância à 562nm com resultados aproximadamente lineares, permitindo a quantificação de proteínas na faixa de 20 - 2.000 $\mu g/mL$.

A determinação da concentração da proteína MEG-14 foi realizada utilizando-se o kit *BCA Protein Assay (Thermo Scientific)*, conforme as instruções do fabricante, sendo a leitura realizada no comprimento de onda igual 562 nm, através da medição em um espectrofotômetro U-2800 (HITACHI), utilizando-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

3.9 Determinação do estado oligomérico das proteínas através da curva de calibração

Para a determinação do estado oligomérico das proteínas MEG-11 e MEG-14, foi realizada a curva de calibração utilizando-se a cromatografia por exclusão molecular. Esta técnica visa estimar as massas das proteínas/complexo a partir da comparação do seu tempo de retenção na coluna em relação a padrões de massa moleculares conhecidos. Os padrões empregados para o ensaio foram a Aprotinina (6.500 Da), Ribonuclease (13.700 Da), Anidrase carbônica (29.000 Da), Ovoalbumina (43.000 Da), Conalbumina (75.000 Da) e Bluedextran (*void* volume).

O coeficiente de partição (K_{av}), que representa os volumes de eluição relativos, pode ser calculado como um parâmetro a partir da equação abaixo,

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

na qual V_e é o volume de eluição da proteína, V_o é o volume de *void* da coluna, e V_t é o volume geométrico da coluna. O V_o foi determinado utilizando-se *Bluedextran*. As massas das proteínas foram determinadas pela interpolação da regressão linear da curva padrão através dos valores de K_{av} . Desta forma, os volumes de eluição foram expressos em termos de K_{av} , que foi determinado para cada proteína padrão utilizando-se a expressão $(V_e - V_o) / (V_t - V_o)$. A separação de todas as amostras foi realizada em três mix: um contendo somente o *Bluedextran*, o mix A (Conalbumina, Anidrase Carbônica, Ribonuclease e Aprotinina) e o mix B (Ovoalbumina, Ribonuclease e Aprotinina). Essa separação foi realizada em coluna *superdex 75* (GE Healthcare) empregando-se o tampão Tris 50 mM pH 8.0 e NaCl 150 mM, para as misturas dos padrões e para ambas proteínas.

3.10 Crosslinking químico

O ensaio de *crosslinking* foi utilizado para avaliar o estado oligomérico da proteína MEG-14 em solução. Para isso, foram adicionadas diferentes concentrações do reagente glutaraldeído em uma concentração fixa da proteína MEG-14 (tabela 4). As reações foram incubadas à 25 °C durante 3 horas, e em seguida foi adicionado às amostras tampão desnaturante (loading buffer – contém SDS, β -mercapetanol). As mesmas foram fervidas a 100 °C por 5 minutos e analisadas em gel de poliacrilamida 15%.

Tabela 4 - Reações da proteína MEG-14 com o reagente glutaraldeído

MEG14 (μ M)	Glutaraldeído (concentração final)	Volume final (μ L)
30	0%	20
30	0,01%	20
30	0,02%	20
30	0,05%	20
30	0,07%	20
30	0,1%	20
30	0,2%	20
30	0,5%	20
30	1,0%	20
30	2,0%	20
30	3,0%	20
30	5,0%	20

Fonte: Elaborada pela autora

3.11 Espectrometria de Massas

Neste trabalho foi implementada a técnica de ionização por *electrospray* (ESI-MS – *Eléctron Spray Ionization* – *Mass Spectrometry*), com o objetivo de se obter a confirmação da identidade desta proteína a partir da análise do tamanho

médio encontrado em contraste com o valor esperado. Nos experimentos realizados, procedemos com a injeção direta da proteína recombinante MEG-14 na concentração de 2 μ M no espectrômetro de massa micrOTOF-QII (*Bruker*).

Além disso, foi realizada a tripsinização da proteína MEG-14 em gel para análise por espectrometria de massas. A banda da proteína visualizada por SDS-PAGE foi excisada e descorada com 100 mM de bicarbonato de amônio com 50% de acetronitrila por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida a mesma foi digerida utilizando-se a solução de 50 mM de bicarbonato de amônio acrescida de 100 ng/ μ L de tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade* – Promega) durante 16 horas a 37 °C. Os peptídeos provenientes da digestão foram então analisados por espectrometria de massas. A identificação dos peptídeos foi realizada utilizando-se o programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

3.12 Preparação das vesículas de fosfolipídios

Para este trabalho foram preparadas vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles*, LUV), com os seguintes fosfolipídios: DDPG (*1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho*), POPG (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho*), POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), DPPC (*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*), DMPC (*1,2-Dimyristoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholine*), DPPS (*1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine*), DOTAP (*dioleoyl-3-trimethylammonium-propane*), DSPE (*1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-folate (polyethylene glycol)*) e POPE (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine*).

A preparação das LUVs foi realizada em tubos de vidro devidamente limpos em todas as etapas sucedidas pelo processo de extrusão. Primeiramente os fosfolipídios foram solubilizados em uma mistura de solução de metanol e clorofórmio na proporção 1:4 (v/v), respectivamente. A solução de solvente foi evaporada lentamente sob fluxo de N₂, seguida de secagem em sistema *SpeedVac*, por 2 horas. Posteriormente, o filme formado foi hidratado em tampão semelhante ao da amostra de proteína e ressuspenso até sua total solubilização. Em seguida as

soluções foram incubadas à 60 °C por 1 hora, sendo em seguida levadas ao extrusor com controle de temperatura. As vesículas foram extrusadas com membrana de corte de 100 nM (Avanti Polar Lipids) até a solução apresentar-se totalmente translúcida.

3.13 Técnicas espectroscópicas

3.13.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para este trabalho o DLS foi utilizado para analisar diferentes estados de oligomerização. Esses estados podem ser estudados devido ao incremento na massa molecular, de forma que medindo-se a proteína em diferentes condições, seu estado oligomérico pode ser avaliado. Outra aplicação de DLS é na verificação do grau de pureza da amostra, que é medida através de sua polidispersividade. Um baixo valor de polidispersividade está associado a um elevado grau de pureza, e indica que todas as proteínas estão em uma única conformação oligomérica, e que esta estrutura é muito bem estabelecida nessas condições.

Todas as medidas foram realizadas em um instrumento *Zetasizer μ V* (Marvern) utilizando-se cubeta de quartzo de 2 μ L. O primeiro experimento foi realizado com a proteína MEG-14 na concentração de 8 mg/mL em tampão 20 mM Tris pH8.0 acrescido de 100 mM de NaCl, para avaliação do estado oligomérico da proteína e confirmação do seu estado de pureza. Além disso, o DLS foi utilizado para determinar se a fração solúvel da proteína MEG-14 interagiria com bicamadas lipídicas.

Inicialmente, foram realizadas medidas de DLS com vesículas de fosfolipídios na concentração de 1 mM na ausência e presença de 100 μ M da proteína MEG-14. As vesículas utilizadas foram: DDPG (*1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho*), POPG (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phospho*), POPC (*1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*).

3.13.2 Dicroísmo circular convencional (CD) e por radiação síncrotron (SRCD)

Como parte fundamental da caracterização das proteínas MEG-11, MEG14, S100A9 e do complexo MEG-14/S100A9, foram realizadas medidas de dicroísmo circular (CD) em diferentes condições, indicadas na tabela 5. As medidas de CD convencional para as proteínas foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corporation, Japão) em cubeta de quartzo de 1 mm de caminho óptico, na faixa de 190 nm a 250 nm, à 25 °C. O *background* relativo aos tampões foram subtraídos de todos os espectros.

A colaboração do nosso grupo com a pesquisadora Bonnie A. Wallace do “*Institute of Structure and Molecular Biology, Birkbeck College, University of London, United Kingdom*” permitiu a utilização da técnica de SRCD, executadas pelo Dr. José Luiz S. Lopes. Os espectros de SRCD da proteína MEG-14 em diversas condições (Tabela 5) foram obtidos linha de luz CD1 nas Instalações do Instituto de Armazenamento em Anel (ISA) (Aarhus, Dinamarca). Resultados similares foram obtidos na linha de luz DISCO (Soleil Synchrotron, França) e na linha de luz CD12 (ANKA Synchrotron, Alemanha). Os espectros de SRCD das proteínas MEG-14, S100A9 e do complexo MEG-14/S100A9 (a uma razão molar de 1:1) foram realizadas na linha de luz CD1 nas Instalações do Instituto de Armazenamento em Anel (ISA) (Aarhus, Dinamarca). As medidas foram realizadas na faixa de 280 nm - 170 nm, utilizando-se cubeta de quartzo desmontável (Hellma Ltd, UK) de caminho óptico de 0,0009 centímetros, a 25 °C.

O processamento dos espectros tanto para CD quanto para SRCD foi realizado utilizando-se o software CDTtools.⁵⁷ Os espectros finais foram expressos em unidades epsilon delta, utilizando-se um peso médio de resíduos de 117, 99 e 119 para a MEG-14, S100A9 e MEG-11, respectivamente.

Tabela 5 - Condições utilizadas para realização das medidas de CD e SRCD.

Técnica	Proteína	Ensaio	Tampão	Variações	Concentração da(s) proteína(s)
CD	MEG-14	Determinação da estrutura secundária	20 mM fosfato de sódio pH 7.0	-	10 µM
		Efeito de solventes (TFE)	20 mM fosfato de sódio pH 7,0 + concentração de TFE	TFE de 0 à 100%	10 µM
		Variação de pH (de 0.5 em 0.5)	20 mM de Fosfato de potássio Monobásico	pH de 2,0 à 3,5	10 µM
			20 mM de Acetato de sódio	pH de 4,0 à 5,5	10 µM
			20 mM de Fosfato de sódio	pH de 6,0 à 8,0	10 µM
			20 mM de Borato de sódio	pH de 8,5 à 10,5	10 µM
			20 mM de Fosfato de sódio dibásico	pH de 11,0 à 12,0	10 µM
		Interação com vesículas de fosfolípidios (LUVs) ou micelas de detergentes	20 mM fosfato de sódio pH 7,0 + LUVs ou micelas de detergentes (proporção 1:1000 proteína: lipídio)	Fosfolípidios/ detergentes: DPPC, DMPC, POPC, DPPS, DOTAP, DSPE, POPE e SDS	10 µM
	MEG-11	Determinação da estrutura secundária	20 mM fosfato de sódio pH 7,0	-	8 µM
		Efeito de solventes (TFE)	20 mM fosfato de sódio pH 7,0	TFE de 0 à 100%	8 µM
		Variação de temperatura	20 mM fosfato de sódio pH 7,0	Temperatura variando de 10 à 90 °C	8 µM
		Efeitos da desidratação e rehidratação	Água	Desidratação em placa de quartzo	1,5 mg/mL
		Interação com micelas de detergentes	20 mM fosfato de sódio pH 7,0	CTAB, HPS e SDS	8 µM

continua

continuação

Técnica	Proteína (s)	Ensaio	Tampão	Variações	Concentração da(s) proteína(s)
CD	S100A9	Análise da funcionalidade da proteína heteróloga	20 mM Tris pH 8.0 + 50 mM NaCl	-	20 µM
	MEG-14			-	7,5 µM
	S100A9	Interação MEG-	10 mM Tris pH 8.0 + 1 mM	-	7,5 µM
	MEG-14 + S100A9	14/S100A9	de CaCl ₂	-	7,5 µM
SRCD	MEG-14	Determinação da estrutura secundária	20 mM fosfato de sódio pH 7,0	-	0,1 mM
		Efeito de solventes (TFE)	20 mM fosfato de sódio pH 7.0 + concentração de TFE	TFE 0 e 100%	0,1 mM
		Interação com vesículas de fosfolípidios (LUVs) ou micelas de detergentes	20 mM fosfato de sódio pH 7,0 + LUVs ou micelas de detergentes (proporção 1:1000 proteína: lipídio)	Fosfolípidios/ detergentes: POPG e SDS	0,1 mM
	MEG-14			-	0,3 mM
	S100A9	Interação MEG-		-	0,3 mM
	MEG-14 + S100A9	14/S100A9	10 mM Tris pH 8,0 + 1mM de CaCl ₂	-	0,3 mM

Fonte: Elaborada pela autora

3.13.3 Fluorescência intrínseca

Através da técnica de Fluorescência intrínseca é possível monitorar a região em torno do resíduo triptofano (W), a partir da emissão de fluorescência emitida por este aminoácido. Os resultados obtidos com esta técnica em conjunto com demais experimentos podem facilitar a delimitação de mudanças estruturais apresentadas por proteínas em soluções.

As medidas foram realizadas com a proteína MEG-11 em um fluorímetro ISS-K2 (ISS-IL, USA) em cubeta de quartzo com amostra contendo 10 µM da proteína MEG-11, a 25 °C, com comprimento de onda de excitação em 295 nm e a emissão monitorada de 310 à 450 nm.

3.14 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Com intuito de se analisar a interação entre as proteínas MEG-14 e S100A9 foi realizado um experimento de ITC utilizando-se um microcalorímetro VP-ITC (Microcal). O equipamento foi lavado previamente à realização da medida e uma titulação teste de água em água foi realizada a fim de se verificar a presença de possíveis contaminantes na cela ou na seringa. Tomou-se o cuidado de diluir as duas proteínas e a solução de cloreto de cálcio na mesma solução tampão (Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM e 1 mM de CaCl_2). A cela de referência foi preenchida com água *MilliQ* e a cela de amostra foi preenchida com 30 μM da proteína S100A9 (construção PETSUMO). Para o ensaio de ligação a seringa foi preenchida com 500 μM da proteína MEG14. O experimento foi realizado a 25 °C, com velocidade de agitação de 300 rpm, modo de resposta alto, equilíbrio rápido e automático. Foram realizadas 40 injeções de 6 μl cada com intervalos de 150 s. Titulações controle (MEG14 em tampão) foram utilizadas para subtrair o calor de diluição dos experimentos para análise dos dados. Os dados, depois da integração dos picos da isoterma, gerados pelo ITC, foram subtraídos dos dados da titulação controle e a concentração foi normalizada. O ajuste não linear dos dados foi feito em modelos de “sítios não interagentes e independentes”, pelo programa *Origin* (versão7, *OriginLab*, integrado ao *software* do calorímetro).

Para verificar se a proteína S100A9 estava em sua conformação correta e ativa, titulou-se cálcio na proteína previamente purificada com EGTA, o que garantiu a ausência do íon na amostra. O procedimento foi realizado como descrito anteriormente, com a proteína S100A9 (concentração de 56,3 μM) na cela e cálcio na concentração 10 mM na seringa.

3.15 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

Para melhor análise da interação entre a proteína MEG-14 e a proteína S100A9 foi utilizada a técnica de SPR. Inicialmente, a proteína MEG-14 (4 μM) em

acetato de sódio 10 mM (pH 4,5) foi acoplada a um sensor chip CM5 usando-se um kit de acoplamento de amina, seguido por lavagem com tampão Hepes (20 mM).

Os ensaios de SPR foram realizados em um instrumento BIAcore X (GE Healthcare), sendo a proteína S100A9 injetada sobre a superfície do sensor chip na faixa de 1-128 nM, com uma taxa de fluxo de 30 μ L/min. A associação foi monitorada durante o tempo de injeção (10 min), e a dissociação durante 10 minutos após o fim de cada injeção. Antes do próximo ciclo, foi iniciada a regeneração da superfície do sensor com um mínimo de injeções de 2 M MgCl₂ no tampão de corrida da cinética de ligação. O software BIAevaluation versão 4.1 (BIAcore AB) foi utilizado para a montagem das curvas com o modelo de ligação Langmuir 01:01.

3.16 Pulldown

Para confirmar a interação entre as proteínas S100A9 ou CC2D1A e a proteína MEG14 foram realizados ensaios de *pulldown*, tendo como objetivo demonstrar *in vitro* a interação entre as proteínas. As reações foram montadas na presença e ausência de cloreto de cálcio como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 - Combinações proteicas utilizadas no ensaio de *pulldown*. Ensaio realizado com e sem a adição de cloreto de cálcio

Teste	HIS-X	GST-Y	CaCl ₂
1	HIS-MEG14	GST-S100A9/CC2D1A	-
2	-	GST-S100A9/CC2D1A	-
3	HIS-MEG14	-	-
4	HIS-MEG14	GST	-
5	HIS-MEG14	GST-S100A9/CC2D1A	0,5 mM
6	-	GST-S100A9/CC2D1A	0,5 mM
7	HIS-MEG14	-	0,5 mM
8	HIS-MEG14	GST	0,5 mM

Fonte: Elaborada pela autora

As diferentes combinações proteicas foram utilizadas para se confirmar a interação (teste 1 e 5), verificar o estado de purificação das proteínas

S100A9/CC2D1A (teste 2 e 6), analisar a forma da interação da proteína MEG-14 com a resina (inespecificamente) (teste 3 e 7) e verificar a possibilidade de interação entre a MEG14 e a GST (teste 4 e 8).

Inicialmente 30 μ L da resina *glutathione sepharose* foram adicionados a microtubos e centrifugados por 5 minutos a 8 °C e 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a resina lavada com 500 μ L de H₂O, seguidos por uma lavagem com 500 μ L de tampão (Tris 50 mM, NaCl 150 mM com e sem 0,5 mM de CaCl₂), pH 8,0. Os ensaios de *pulldown* foram realizados utilizando-se 1 mL de cada proteína pré-purificada fusionada à GST, conforme descrito na tabela 1. As proteínas foram incubadas por 1 h sob leve agitação a 4 °C. Após esse período, centrifugou-se por 5 minutos, a 8 °C e 4.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. À resina foram adicionados 1000 μ L da amostra HIS-MEG-14 (tabela 1), incubando-a e centrifugando-a nas mesmas condições anteriores. Posteriormente a resina foi lavada três vezes com 500 μ L de tampão acrescido de 0,1% de Triton X-100, seguidos por três lavagens com o mesmo tampão sem Triton X-100. Entre cada lavagem foi realizada uma centrifugação de 5 minutos, 8 °C e 4000 rpm, seguida por descarte do sobrenadante. A eluição das proteínas foi realizada pela adição de 40 μ L de tampão (Tris 50 mM, NaCl 150 mM com e sem 0,5 mM de CaCl₂) e tampão para SDS-PAGE 1X, e aquecimento por 5 minutos a 100 °C. As amostras foram finalmente centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%

3.17 Termoforese em microescala (MST)

Para monitorar a interação da proteína MEG-14 com as proteínas S100A9 e S100A8 foi utilizada a técnica de Termoforese em Microescala (*MicroScale Thermophoresis* – MST). Os reagentes utilizados, como a sonda fluorescente, coluna de purificação e os capilares fazem parte do kit *Monolith™ NT.115 Protein Labeling Kit RED-NHS (Amine Reactive)* (NanoTemper Technologies). Primeiramente, 100 μ L da proteína MEG-14 (0,2 mg/mL) foram incubados com 10 μ L da sonda *RED fluorescent dye* NT-647 (0,3 mg/mL) e 90 μ L de tampão 20 mM de Fosfato de sódio pH 8,0 por 30 minutos em local com ausência de luz. Em seguida,

a solução foi rapidamente purificada utilizando-se coluna presente no kit, passando as proteínas para tampão 20 mM de *Hepes* acrescido de 1 mM de CaCl_2 . Em seguida as reações foram preparadas mantendo-se constante a concentração da proteína MEG-14 marcada, enquanto que a concentração da S100A9 não marcada foi variada entre 8 nM e 65 μM e a concentração da proteína S100A8 foi variada entre 1 nM e 60 μM . Após uma curta incubação, as amostras foram colocadas em capilares de vidro hidrofílico e a análise foi realizada utilizando-se o *Monolith NT.115 Series MicroScale Thermophoresis* (NanoTemper technologies).

3.18 Experimentos *ex vivo*

Primeiramente, as proteínas S100A8 e S100A9 foram conjugadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 555 através da reação com amina-reativa. Em seguida, com a colaboração da Dra. Katia Cristina Pereira Oliveira Santos do Instituto Adolfo Lutz, foi possível a obtenção de vermes adultos (♂ e ♀) logo após a perfusão destes de camundongos infectados. Os vermes foram lavados com meio RPMI, e em seguida cultivados à 37 °C durante 4 horas em atmosfera com 5% de CO_2 em meio de cultura RPMI 1640 acrescido de gentamicina (80 $\mu\text{g/mL}$), penicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) e 10% de Soro Fetal Bovino (Life Technologies) contendo as proteínas marcadas a uma concentração de 0,6 mg/mL. Logo após os vermes foram lavados três vezes com solução de PBS (1X) e fixados com paraformaldeído 4%. As lâminas foram montadas com solução de Fluoromount. As análises foram realizadas em microscópio com contraste de fase da marca Olympus modelo BX53 acoplado à câmera com captura de imagem e utilização do software Cellsens Digital Imagen Standart.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análise inicial das sequências das proteínas MEG-11 e MEG-14

A proteína MEG-11 possui 79 resíduos de aminoácidos, sendo 22 pertencentes ao peptídeo sinal e 18 à hélice transmembrana, como pode ser observado na figura 7-A. Para a proteína MEG-14, são 140 resíduos de aminoácidos, dos quais 26 pertencem ao peptídeo sinal e 23 à hélice transmembrana, como pode ser observado na figura 7-B. A determinação da região transmembrânica e do peptídeo sinal foi realizada através da utilização dos programas TMHMM e SignalP, respectivamente.

Com o objetivo de facilitar a expressão heteróloga dessas proteínas, as regiões de peptídeo sinal e hélice transmembrana foram removidas, restando apenas suas frações solúveis, representadas por 39 resíduos de aminoácidos para o caso da MEG-11 e por 87 resíduos para a MEG-14. Na figura 7 podem ser observadas as sequências completas das duas proteínas em estudo, bem como as regiões solúveis, que foram as utilizadas para este trabalho.

Figura 7 - Sequências primárias completas das proteínas MEG-11 e MEG-14. Os resíduos identificados com a cor verde são pertencentes aos peptídeos sinais. Os resíduos identificados em vermelhos são pertencentes às hélices transmembranas. Os resíduos prolina estão identificados em azul e os resíduos carregados em verde. A) Sequência referente à MEG-14 e em B) sequência referente à MEG-11. As porções utilizadas para posterior clonagem e expressão heteróloga estão indicadas e nomeadas como porção solúvel.

Fonte: Elaborada pela autora

É possível observar que as sequências de ambas proteínas apresentam um elevado número de resíduos prolina, alto número de resíduos polares e resíduos carregados e baixo número de resíduos hidrofóbicos. Além disso, a proteína MEG-14 apresenta ausência de aminoácidos aromáticos, o que impossibilita a determinação de um possível coeficiente de extinção molar, como pode ser visto na tabela 7.

As características físico-químicas teóricas das construções das proteínas MEG-11 e MEG-14, como massa molecular e pI, foram obtidas a partir da submissão da estrutura primária no programa *ProtParam tool* (tabela 7).

Tabela 7 - Parâmetros teóricos das construções das proteína MEG-11 e MEG-14

Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de resíduos de aminoácidos	pI teórico	Coeficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$)	Abs _{280nm} 0,1% (1g/L)
MEG-11/Sumo-6Xhis	17795,8	155	5,5	6990	0,393
MEG-11	4518,9	39	4,73	5500	1.217
MEG-14/6Xhis	10 612	107	10.82	-	-
MEG-14	8579,5	87	10,53	-	-

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Clonagem e subclonagem das MEG-11 e MEG-14

Visando a obtenção das proteínas MEG-11 e MEG-14, as porções dos genes referentes às frações solúveis destas proteínas foram amplificados através de reações de RT-PCR. Como era esperado, os produtos destas reações apresentaram tamanhos de aproximadamente 117pb e 264pb, para MEG-11 e MEG-14, respectivamente (figura 8-A). Em seguida, os produtos amplificados foram purificados após eletroforeses em gel 1%, e posteriormente inseridos em plasmídeo de propagação pGEM-T. Nesta etapa foi possível selecionar os clones positivos através de análise de restrição (figura 8-B) e confirmar a identidade das sequências clonadas através do sequenciamento destes clones. Com intuito de subclonar estes genes em plasmídeos de expressão, os mesmos foram liberados do pGEM-T através de reações de digestão utilizando-se enzimas de restrição específicas previamente determinadas para cada gene (tabela 1). Em seguida, a MEG-11 foi inserida no plasmídeo pETSumo e a MEG-14 no plasmídeo pET28a(+). Para confirmação das clonagens foram realizadas novas análises de restrição (figura 8-C), seguidas de sequenciamento dos clones positivos, para garantia da integridade das sequências de trabalho.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Em A) Amplificações dos genes MEG-11(1) e MEG-14 (2); B) Análise de restrição: MEG-11 (3) e MEG-14 (4) em vetor de propagação pGEM-T; C) Análise de restrição: MEG-11(5 e 6) e MEG-14 (7) nos vetores de expressão pETSumo e pET28a, respectivamente. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor pGEM-T (3015 pb), o inserto MEG-11 (117pb), o inserto MEG-14 (264pb), o vetor pETSumo (5600pb) e o vetor pET28a(+) (5368pb). Padrões Moleculares: m referente ao padrão de massa molecular Gene Ruler 100pb DNA Ladder (Fermentas) e M referente ao padrão de massa molecular Gene Ruler 1Kb DNA Ladder (Fermentas).

Fonte: Elaborada pela autora

4.3 Expressão e teste de solubilidade das proteínas MEG-11 e MEG-14

As expressões heterólogas das proteínas foram realizadas em célula *E.coli*, sendo a proteína MEG-11 expressa em cepa Rosetta (DE3), e a proteína MEG-14 em cepa BL21 (DE3). A cepa Rosetta é derivada da cepa BL21, sendo a primeira

projetada para melhorar a expressão de proteínas eucariotas que possuem códons raros utilizados em *E. coli*. Outra singularidade apresentada pela cepa Rosetta é que esta possui resistência adicional ao antibiótico cloranfenicol. Comumente as duas cepas apresentam promotor *lac*, que possui a capacidade de induzir a produção da T7 RNA polimerase, quando em presença de um indutor. Desta forma, foram realizados testes para analisar em quais das cepas as proteínas MEG-11 e MEG-14 apresentavam um melhor rendimento no nível de expressão. Após esta seleção os plasmídeos recombinantes foram transformados nas células específicas para cada proteína e ambas expressas à 37°C durante 4 horas após a adição de 0,5 mM de IPTG.

A análise da expressão das proteínas MEG-11 e MEG-14 foi realizada através de SDS-PAGE utilizando-se alíquotas coletadas antes e após a indução das expressões. Na figura 9, podemos observar as bandas relativas às proteínas expressas. A proteína MEG-11 (figura 9-A) expressa juntamente com a sumo-fusão acrescida de uma cauda de hexahistidina exibiu uma massa aproximada de 23 kDa. Esta massa molecular obtida foi superior à esperada, que era de aproximadamente 18 kDa (tabela 7), entretanto este aumento se deve ao fato da baixa migração da fusão Sumo-6Xhis em SDS-PAGE (apresenta 13 kDa, entretanto migra como 18 kDa). Para a proteína MEG-14 fusionada à cauda de hexahistidina, que exibe massa molecular de 10,612 kDa, no gel de Tricina 10% (SDS-PAGE) observamos um tamanho de aproximadamente 18 kDa (figura 9-B). A explicação provável consiste no fato de que a proteína apresenta um alto conteúdo de resíduos hidrofílicos, sendo assim, a ligação de SDS na proteína é baixa, afetando, desta forma, a mobilidade em géis de SDS-PAGE.

Figura 9 - Gel de tricina 10% corado com Comassie blue – Teste de expressão e solubilidade. A) Proteína MEG-11/Sumo-6Xhis à 37°C: 1. Pré induzido; 2. Induzido; 3. Fração insolúvel; 4. Fração solúvel. B) Proteína MEG-14/6Xhis à 37°C: 5. Pré induzido; 6. Induzido; 7. Fração insolúvel; 8. Fração solúvel. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína MEG-11 fusionada a Sumo acrescida da cauda de hexahistidina, e a proteína MEG-14 fusionada a cauda de hexahistidina. M indica o padrão molecular de alto peso.

Fonte: Elaborada pela autora

Após a expressão, as células foram coletadas, lisadas e centrifugadas, separando-se assim, as frações solúveis (proteínas solúveis) e insolúveis (restos celulares e proteínas insolúveis). Alíquotas destas frações foram analisadas por SDS-PAGE (figura 8), no qual foi possível constatar que ambas as proteínas apresentaram-se preferencialmente na fração solúvel. Esta fração foi utilizada posteriormente em processos de purificação.

4.4 Purificação da proteína recombinante MEG-14

A primeira etapa de purificação da proteína MEG-14 foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Após a ligação em coluna e lavagens, a proteína MEG-14 foi eluída em 100 mM, 250 mM e 500 mM de Imidazol (figura 10-A). Nesta etapa foi possível obter a proteína com um alto grau de pureza. As eluições foram reunidas e quantificadas através do kit BCA. Em seguida, a cauda de histidina foi clivada com trombina bovina, sendo retirada alíquotas de diferentes tempos de incubação (figura 10-B). O tempo de incubação para o qual obtivemos uma total clivagem da cauda foi de 16 horas, desta forma este tempo foi definido como padrão para esta etapa. Posteriormente, a retirada da trombina foi realizada

através da incubação da solução proteica com resina de benzamidina durante 20 minutos seguida de filtragem.

Figura 10 - Análise da purificação e clivagem da cauda de hexahistidina da proteína MEG-14. A) Gel de tricina 10% corado com azul de Comassie blue – Purificação em coluna de afinidade Ni-NTA: em 1) Eluição com 100 mM de Imidazol; 2) Eluição com 250 mM de Imidazol e 3) Eluição com 500 mM de Imidazol. B) Gel de tricina 16% corado com Comassie blue – Clivagem da cauda de hexahistidina da proteína MEG-14: em 4) Proteína pré-clivagem; 5), 6) e 7) Frações após a adição de trombina, 2, 4 e 16 horas, respectivamente. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína MEG-14 com a cauda de hexahistidina e a proteína MEG-14.

Fonte: Elaborada pela autora

A segunda etapa de purificação da proteína foi realizada por cromatografia de exclusão molecular, utilizando-se a coluna *superdex 75* (GE Healthcare). Esta purificação foi realizada para a retirada do Imidazol da amostra, bem como para a separação da cauda de hexahistidina previamente clivada. Nesta etapa a proteína foi purificada em diferentes tampões, sendo que a escolha foi baseada nas necessidades de cada uma das técnicas de caracterização estrutural e biofísica para qual a proteína purificada foi submetida. Na figura 11 podemos observar o elevado grau de pureza apresentado na amostra da proteína MEG-14 após sua purificação em coluna de exclusão, além do cromatograma da purificação da mesma.

Figura 11 - Cromatograma da purificação em coluna de exclusão molecular da proteína MEG-14: em 1 observamos o pico correspondente à proteína MEG-14 e em 2 o pico correspondente à eluição do imidazol. Gel de tricina 10% corado com azul de Coomassie, mostrando os tubos 11 e 12 referentes à proteína MEG-14.

Fonte: Elaborada pela autora

Para atestar a identidade da proteína purificada foi realizada uma análise utilizando-se espectrometria de massas. Após a purificação da proteína MEG-14 em coluna de exclusão molecular, uma alíquota desta proteína foi aplicada em gel de tricina 16%, sendo posteriormente digerida por tripsinização e inserida no espectrômetro. Os peptídeos ionizados no espectrômetro de massas foram analisados no programa MASCOT, que através de cruzamentos de dados disponíveis em bancos de dados, indicou a proteína sob código gi/23305778. Este código corresponde à proteína MEG-14, sendo desta forma confirmada a identidade da mesma. Na figura 12 pode ser observado a cobertura dos peptídeos identificados na sequência desta proteína, abrangendo cerca de 25% da mesma. Entretanto, a amostra utilizada para esta análise foi a proteína recombinante, que apresenta ausência do peptídeo sinal e da hélice transmembrana. Sendo assim, uma segunda análise foi realizada removendo-se estas porções e calculando-se a nova abrangência dos peptídeos identificados, sendo esta cerca de 40% da sequência de trabalho, garantindo mais uma vez a identidade da proteína.

Figura 12 - Identificação da proteína MEG-14 por espectrometria de massas. Em vermelho estão indicados os aminoácidos correspondentes aos peptídeos identificados. As regiões não pertencentes à proteína recombinante estão dentro das regiões circundadas.

Fonte: Elaborada pela autora

4.5 Purificação da proteína recombinante MEG-11

A proteína MEG-11/Sumo-6Xhis foi purificada utilizando-se cromatografia de afinidade em coluna de níquel, na qual a mesma foi eluída nas lavagens de 500 mM e 600 mM de Imidazol (figura 13-A). Em seguida, a Sumo fusão foi clivada através da incubação com sumo protease, por 20 minutos à temperatura ambiente (figura 13-B). Para retirada do Imidazol foi utilizada a coluna *HiTrap Desalting* (GE Healthcare), e em seguida a solução foi aplicada novamente em uma coluna de afinidade para sua purificação, uma vez que a proteína clivada não interage mais com a resina, somente a sumo fusão e a sumo protease, havendo desta maneira a separação entre elas. Na figura 13-C, pode-se observar o gel de tricina 10% correspondente a esta etapa, na qual é possível observar que no primeiro eluato e na primeira lavagem obtivemos a proteína em solução pura e livre da fusão SUMO.

Figura 13 - Análise das etapas de purificação da proteína MEG-11. A) Gel de tricina 10%: purificação em coluna de afinidade Ni-NTA da proteína MEG-11/Sumo-6Xhis, eluição de 500 mM (1) e 600 mM (2) de Imidazol; B) Clivagem da fusão Sumo: Fração pré-clivagem (3) e pós clivagem (4); C) Segunda coluna de afinidade – remoção da fusão sumo e SUMO protease, eluato – proteína MEG-11 (5), lavagens com tampão + 10 mM de Imidazol (6 e 7) e eluição da sumo fusão e sumo protease com tampão acrescido de 500 mM de Imidazol (8). M indica o padrão de massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora

Para promover uma purificação adicional da proteína e realizar a troca para soluções adequadas, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna *superdex 75* (GE Healthcare). O cromatograma referente à corrida bem como o SDS-PAGE realizado com as amostras oriundas da cromatografia podem ser observados na figura 14, a partir do qual foi possível confirmar o alto grau de pureza das amostras.

Figura 14 - Cromatograma da purificação em coluna de exclusão molecular da proteína MEG-11. Gel de tricina 10% corado com azul de *Comassie blue*, mostrando os tubos 14 e 15 referentes à proteína MEG-14.

Fonte: Elaborada pela autora

4.6 Caracterização biofísica da proteína MEG-14

4.6.1 Determinação do grau oligomérico da proteína MEG-14

Inicialmente, para avaliar o grau oligomérico apresentado pela proteína MEG-14 foi realizado o experimento de cromatografia por exclusão molecular. Realizamos uma estimativa da massa do possível complexo de MEG-14 a partir da comparação do seu tempo de retenção na coluna em relação a seis padrões de massa molecular. Os padrões empregados foram a Aprotinina (6.500 Da), Ribonuclease (13.700 Da), Anidrase carbônica (29.000 Da), Ovoalbumina (43.000 Da), Conalbumina (75.000 Da) e Blue dextran (void volume). O perfil de eluição da proteína MEG14/6Xhis comparado com os perfis dos padrões é mostrado na figura 15.

Figura 15 - Cromatograma: Comparação dos perfis de eluição dos padrões com o perfil de eluição da proteína MEG-14/6Xhis. Determinação do grau de oligomerização aparente da proteína MEG-14 por cromatografia de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pela autora

Analisando-se o perfil cromatográfico da proteína MEG-14/6Xhis e comparando-se com os padrões utilizados, observamos que encontra-se entre a Ovalbumina (43.000 Da) e a Anidrase carbônica (29.000Da), com seu pico máximo de eluição em 11,9 mL, apresentando desta forma, massa molecular aparente maior do que a esperada, que seria igual a 10.612 Da. A partir da interpolação da curva de calibração, apresentada na figura 15, foi possível determinar a massa aparente, sendo aproximadamente igual a 35,9 kDa.

Outra técnica utilizada para avaliar o estado oligomérico da proteína MEG-14 foi o DLS (*Dynamic Light Scattering*), a partir do qual obtivemos resultados adicionais, como a confirmação da presença de uma única população de moléculas na amostra, indicando pureza e homogeneidade da proteína MEG14 após a sua purificação em coluna por exclusão molecular. A partir dos ensaios de DLS obtivemos uma estimativa da massa molecular da proteína, que foi $46,7 \pm 14,9$ kDa (figura 16).

Figura 16 - Dados de DLS da proteína MEG-14. A massa estimada para a proteína foi $46 \pm 14,9$ kDa, além disso, a proteína apresenta-se em uma única população, indicando a pureza e homogeneidade da amostra.

Fonte: Elaborada pela autora

Considerando-se o erro associado, percebemos que os resultados obtidos por DLS são condizentes com os obtidos a partir da curva de calibração. Entretanto, ambos experimentos apresentam um erro intrínseco, uma vez que preveem que todas as proteínas em estudo possuem formato globulares. Este fato é mais evidente para a proteína MEG-14, pois como será descrito detalhadamente no próximo item, esta proteína apresenta ausência de estrutura tridimensional, apresentando-se de forma estendida e não enovelada, podendo desta maneira, exibir uma massa molecular aparente maior do que a realmente apresentada.

Desta forma, com o intuito de se determinar a massa molecular da proteína MEG-14/6Xhis, foi realizada a infusão da proteína inteira no espectrômetro de massa. A partir da análise do espectro de saída do equipamento foi possível identificar que a maioria dos picos detectados correspondem às diferentes formas carregadas da proteína, com as cargas variando de +7 a +16 (figura 17). Com os valores de massa/carga correspondentes a estes picos foi possível deduzir a massa molecular para a proteína, sendo ela de 10613 ± 7 Da. Esta massa é coincidente com a massa esperada para o monômero de MEG-14/6Xhis (10612 Da), indicando que a proteína apresenta-se de forma monomérica. No entanto, deve-se notar que as medidas são realizadas na fase gasosa e que interações que ocorrem em solução

podem ser desestabilizadas nesta fase. Além disso, o processo de ionização para ejetar a proteína para fase gasosa pode ser responsável por uma eventual quebra do complexo proteico.

Figura 17 - Espectrometria de massa da proteína MEG-14. Espectro de massa obtido a partir da infusão da proteína MEG-14 recombinante em um aparelho ESI Q-TOF. Os diferentes picos representam a proteína ionizada com diferentes cargas, que são indicadas pelas linhas azuis. A massa deduzida a partir deste espectro corresponde a um monômero de MEG-14.

Fonte: Elaborada pela autora

Considerando que os resultados apresentados pelas três técnicas anteriores eram conflitantes em relação ao estado oligomérico em que se encontra a proteína MEG14, realizamos um ensaio de *crosslinking* empregando o reagente glutaraldeído a fim de obter informações adicionais. O *crosslinking* é uma técnica bioquímica que permite a visualização de estados oligoméricos, pois promove a ligação covalente entre moléculas, as quais não se rompem durante o processo de eletroforese na presença de SDS.

A tabela 4 reúne as informações das concentrações utilizadas do reagente. A reação foi incubada a 25 °C durante 3 horas, e em seguida foi adicionado tampão da amostra desnaturante na mesma. Posteriormente a amostra foi fervida e analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. Na figura 18 podemos observar que a proteína MEG14, que possui peso molecular aproximadamente de 8,5 kDa (apresentando um valor maior em géis de SDS-PAGE), apresenta-se majoritariamente em sua forma monomérica, sugerindo que este é o real estado de oligomerização desta proteína em solução.

Figura 18 - Gel SDS-PAGE 15%: *Crosslinking* químico da proteína MEG-14 com o reagente glutaraldeído, em 1) proteína MEG14 sem o reagente de *crosslinking*, de 2 a 12 proteína MEG14 com concentrações crescentes de glutaraldeído, como apresentado na tabela 4.

Fonte: Elaborada pela autora

4.6.2 Predição do conteúdo de estrutura secundária da proteína MEG-14

Foram realizadas predições da estrutura secundária baseada na sequência primária da fração solúvel da proteína MEG-14 utilizando-se os programas GOR4, PSIPRED, RONN e Spritz e GlobPlot2, a partir dos quais não foi possível identificar estrutura regular entre 92 a 100% da proteína (figura 19). Como apresentado na Figura 7, a proteína MEG-14 apresenta um alto percentual de resíduos polares, carregados e de prolina, além de apresentar um baixo número de resíduos hidrofóbicos. Este tipo de composição sugere que a proteína MEG-14 deve apresentar-se de forma estendida e não de forma enovelada, caracterizando-se como um exemplo clássico de proteínas intrinsecamente desordenadas (IDPs). As IDPs são proteínas que quando em solução apresentam ausência de elementos estruturais em toda a sua extensão ou em parte de suas estruturas. Entretanto, em condições específicas, estas proteínas são capazes de adotar diferentes conformações.

Em seguida, foram realizadas medidas de CD com a proteína em diferentes concentrações de TFE (TriFluoroEthanol). O TFE é um solvente capaz de induzir a formação de estruturas helicoidais, uma vez que desestabiliza as pontes de hidrogênio entre a proteína e o solvente, favorecendo o estabelecimento de interações intramoleculares. Na presença de concentrações progressivas de TFE, a proteína exibiu uma modificação em seu espectro inicial (em solução aquosa), passando a apresentar dois mínimos em 222 nm e 208 nm (figura 21). Esta conformação espectral é característica de proteínas que apresentam hélices em sua estrutura secundária. O comportamento observado para MEG-14 na presença de TFE é típico de proteínas intrinsecamente desordenadas.

Figura 21 - Espectros de CD da proteína MEG-14 em concentrações crescentes de TFE: 0% (preto), 25% (vermelho), 50% (verde), 75% (azul) e 100% (magenta).

Fonte: Elaborada pela autora

Estes primeiros ensaios sugeriram que a proteína MEG-14 se tratava de uma IDP, confirmando os dados apresentados pela predição. Entretanto, para melhor caracterização da estrutura e dinâmica desta proteína, foi necessário a colaboração do nosso grupo com a pesquisadora Bonnie A. Wallace do “*Institute of Structure and Molecular Biology, Birkbeck College, University of London, United Kingdom*”, onde foram realizados diversos ensaios de SRCD (*Synchrotron Radiation Circular Dichroism*) pelo Dr. José Luiz S. Lopes. A partir da utilização da técnica de SRCD, foi possível

analisar os picos de baixo comprimento de onda que proporcionam uma informação mais precisa sobre proteínas que são essencialmente desordenadas (como no caso da MEG-14).

Inicialmente foram realizadas medidas de SRCD com a proteína MEG-14 em solução de fosfato de sódio pH 7,0. O espectro apresentou um mínimo entre 195 nm e 198 nm e um pequeno máximo entre 180 nm e 185 nm (figura 22). Como discutido anteriormente, este espectro é característico de proteínas com baixo conteúdo de estrutura secundária. Em seguida, medidas de SRCD realizadas com a proteína em 100% de TFE, apresentaram um espectro com dois mínimos em 222 nm e 208 nm e um máximo em 185 nm (figura 22), sendo este espectro característico de proteínas que apresentam hélices em sua estrutura secundária.

Figura 22 - Espectro de SRCD da proteína MEG-14 em água (vermelho), e o espectro de SRCD da proteína MEG-14 em solução de TFE 100% (azul).

Fonte: Elaborada pela autora

A deconvolução de ambos os espectros foram realizadas através do servidor *DichroWeb analysis* para determinação do conteúdo de estrutura secundária, sendo

que a proteína MEG-14 em solução aquosa apresentou 80% de desordenação. Já a proteína em solução de 100% de TFE exibiu uma diminuição do seu estado desordenado (48%) e um consequente ganho em estrutura do tipo α -hélice (passando de 2 para 26%). Entretanto, os estudos com TFE mostram que mesmo em condições favoráveis, a proteína MEG-14 continua a apresentar 48% de estrutura desordenada. Certamente, esta incapacidade de adquirir 100% de estrutura ordenada deve-se ao fato da proteína apresentar uma alta porcentagem de resíduos prolina (14%). Estes resíduos rígidos são conhecidos como hélice disjuntor, devido à capacidade de impedir a formação de estruturas ordenadas, quando presentes em locais inapropriados na sequência proteica.

4.6.4 Influência da variação de pH sobre a estrutura da MEG-14

A estrutura secundária da proteína MEG-14 foi analisada frente a diferentes pHs através da técnica de dicroísmo circular convencional (CD), para observar se esta proteína poderia ser sensível a estas variações. Na figura 23 podemos observar os espectros de CD da proteína MEG-14 em pH variando de 2 até 12, em passos de 0,5. De acordo com os resultados, mesmo em pHs extremos, os espectros de CD obtidos permanecem praticamente inalterados em seu formato, mantendo um pico negativo em 198 nm. Esses resultados nos permitem afirmar que não houve alteração em seu conteúdo de estrutura secundária e que em diferentes pHs a proteína permanece essencialmente desordenada.

Figura 23 - Avaliação por CD da influência do pH na estrutura secundária da proteína MEG-14. Os vários espectros apresentados referem-se a análise de amostras da proteína MEG-14 em diferentes pHs.

Fonte: Elaborada pela autora

4.6.5 Interação da proteína MEG-14 com vesículas de fosfolípidios e detergentes

Foram realizados estudos para determinar se a fração solúvel da proteína MEG-14 interagia com bicamadas lipídicas, visto que a proteína nativa contém uma hélice transmembrana que foi retirada da versão recombinante e, portanto, a proteína nativa existirá em um ambiente de interface entre a membrana plasmática e o meio externo a célula do parasita. Inicialmente, foram realizadas medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) de vesículas de fosfolípidios carregados negativamente DDPG e POPG, e vesículas zwitteriônicas (POPC) na ausência e presença da proteína MEG-14 (figura 24). É possível observar que nas medidas realizadas somente com vesículas (quadros superiores) o raio das partículas detectadas está em torno de 50 nm. Esse tamanho é condizente com o tamanho esperado das vesículas, que foram preparadas utilizando-se uma membrana de

corte de 100 nm. Nos quadros inferiores observamos as medidas de DLS das vesículas após a adição da proteína MEG-14, para os quais na presença das vesículas carregadas negativamente (POPC e DDPG) podemos notar um grande aumento no raio, sugerindo que a proteína seja a responsável por promover a fusão das vesículas. Tal efeito só foi verificado em fosfolipídios com carga negativa visto que medidas de DLS com vesículas de fosfolipídios zwitteriônicas (POPC) não apresentaram modificação no tamanho após incubação com a proteína MEG-14.

Figura 24 - Medidas de DLS com vesículas de fosfolipídios sozinhas e acrescidas da proteína MEG-14. Nos quadros superiores pode-se observar medidas de DLS dos fosfolipídios, sendo estes respectivamente POPC, DDPG e POPG. Nos quadros inferiores pode-se observar medidas referentes aos fosfolipídios acrescidos da proteína MEG-14.

Fonte: Elaborada pela autora

Para analisar se as interações da proteína MEG-14 com membranas de fosfolipídios gerariam alguma mudança na estrutura desordenada da proteína, foram realizadas medidas de CD em que a proteína foi incubada na presença de detergentes e vesículas de fosfolipídios com diferentes composições do grupo cabeça, sendo sempre a razão proteína-lipídio ou proteína-detergente 1:1000. Na Figura 25, podemos observar os espectros da proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolipídios com cargas positiva e neutra.

Figura 25 - Espectros de CD da proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolipídios com carga positiva e neutra. A) DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine), POPC B) DPPS (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine), C) DOTAP (dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) e D) DSPE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-folate (polyethylene glycol)) e POPE (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine).

Fonte: Elaborada pela autora.

Como observado nos espectros da figura 25, a proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolipídios com carga positiva e neutra (PC) não demonstrou nenhuma alteração em seu espectro. Entretanto, a incubação da proteína MEG-14 com micelas do detergente carregado negativamente, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (figura 28), promoveu uma mudança no espectro da proteína, com um aumento na intensidade do pico de 222 nm e uma concomitante diminuição no mínimo de 198 nm, mostrando que a proteína adquiriu uma conformação ordenada parcial. Estes ensaios também foram realizados por SRCD, para o qual foi possível obter um melhor monitoramento das regiões com menor comprimento de onda. A comparação dos espectros realizados utilizando o CD convencional e o SRCD com a proteína em solução contendo micelas de SDS podem ser analisados na figura 26.

Os dados de SRCD com a proteína na presença de fosfolípidios com carga positiva e zwitteriônicos não são apresentados, uma vez que corroboram com os dados de CD, não acrescentando maiores informações.

Figura 26 - Espectros de CD e SRCD da proteína MEG-14 na presença de micelas do detergente SDS. A) Espectro de CD da proteína em tampão fosfato pH 7,0 (preto) e da proteína na presença de micela do detergente SDS (aniônico) – na proporção 1:1000 (vermelho). B) Espectro de SRCD da proteína em tampão fosfato (preto) e da proteína em diferentes concentrações de micelas do detergente SDS (Legenda na figura).

Fonte: Elaborada pela autora.

A incubação da proteína MEG-14 com vesículas de fosfolípidios com carga negativa foi realizada, porém não foi possível realizar as medidas por CD

convencional, uma vez que ao adicionar proteína às vesículas, a solução antes translúcida passou a apresentar turbidez, impedindo desta forma a leitura, devido à alta absorção das amostras. Entretanto, estes ensaios foram realizados novamente pelo Dr. José Luiz S. Lopes utilizando-se SRCD, pois efeitos de absorção/espalhamento que prejudicam a medida, diminuindo a intensidade do sinal, são aliviados devido à geometria do aparelho de SRCD. Analisando-se os espectros de SRCD da proteína MEG-14 na presença de diferentes concentrações de vesículas de fosfolípidos com carga negativa (POPG -1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) foi possível observar que assim como em presença de micelas negativas (SDS), a proteína MEG-14 apresenta um ganho de estrutura secundária, demonstrando que há a interação da proteína com essas vesículas (figura 27).

Figura 27 - Espectros de SRCD da proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolipídios com carga negativa. Painel superior: Espectros de SRCD da proteína MEG-14 na presença de vesículas de fosfolipídios POPG. Painel Inferior: magnitude dos picos das regiões 198 nm e 222 nm.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Caracterização biofísica da proteína MEG-11

4.7.1 Determinação do grau oligomérico da proteína MEG-11

Assim como para a proteína MEG-14, a avaliação do grau oligomérico apresentado pela proteína MEG-11 foi realizado a partir do experimento de cromatografia por exclusão molecular. Os padrões utilizados bem como o tampão de corrida, foram semelhantes ao descrito no item 4.5.1. Analisando-se o perfil cromatográfico da proteína MEG-11 (figura 28-A) e comparando com os padrões utilizados, observamos que esta encontra-se entre a Ribonuclease (13.700 Da) e a Aprotinina (6.500Da), com seu pico máximo de eluição em 15,09mL. A partir da interpolação da curva de calibração, apresentada na figura 28-B, foi possível determinar a massa aparente, sendo esta aproximadamente 9,4 KDa. A massa teórica da proteína MEG-11 é de 4,5 KDa, desta forma, a curva de calibração sugere que a proteína MEG-11 se dispõem em dímeros. Este dado deve ser analisado com cautela, pois parte do pressuposto que todas as proteínas analisadas são globulares. E assim como a proteína MEG-14, a proteína MEG-11 também é uma proteína intrinsecamente desordenada (dados mostrados posteriormente), apresentando assim ausência de estrutura ordenada, podendo exibir uma massa molecular aparente maior do que a realmente apresentada.

Figura 28 - Determinação do grau de oligomerização aparente da proteína MEG-11 por cromatografia de exclusão molecular: A) Comparação dos perfis de eluição dos padrões com o perfil de eluição da proteína MEG11. B) Interpolação da curva de calibração.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.2 Predição do conteúdo de estrutura secundária da proteína MEG-11

Foram realizadas predições da estrutura secundária baseada na sequência primária da fração solúvel da proteína MEG-11 utilizando-se os programas GOR4, PSIPRED, RONN, e GlobPlot2, a partir dos quais não foi possível identificar estrutura regular em 55 a 85% da proteína (figura 29). Assim como a proteína MEG-14, descrita anteriormente, a proteína MEG-11 apresenta um alto percentual de resíduos prolina (15,4%), de resíduos carregados (38%) e resíduos polares (43%), sendo desta forma, uma possível candidata ao grupo das IDPs.

Figura 29 - Predição do conteúdo de estrutura secundária para a fração solúvel da proteína MEG-11. Foram utilizados os programas GOR4, PSIPRED. As letras utilizadas representam: C- coil e h- alfa hélice.

Predição da estrutura secundária da proteína MEG-11														
	DGE	EEE	NEE	EEK	PPQ	PDV	PHG	KHP	LLR	KAF	LTA	PSW	LHM	
GOR4	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	hhh	hhh	CCC	CCC	CCC	
PSIPRED	CCh	hhh	hhh	CCC	CCC	CCC	CCC	Chh	hhh	hhh	hhC	CCC	CCC	
RONN e Spritz	DDD	DDD	DDD	DDD	DDD	DDD	DDD	DDD	DDD	DDD	D--	---	---	-DD
GlobPlot 2	---	---	---	-DD	DDD	DDD	DDD	DD-	---	---	---	---	---	---

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.3 Determinação da estrutura secundária da proteína MEG-11 em solução aquosa e em solução de TFE

Para avaliação do conteúdo de estrutura secundária da proteína MEG-11 foram realizados ensaios de CD convencional com a proteína em tampão 20mM de fosfato de sódio pH 7.0. A figura 30 mostra o espectro correspondente a proteína MEG-11, neste é possível identificar um mínimo notável em 198nm, característico de proteínas com ausência de elementos estruturais. Entretanto, na região entre 220 e 230nm, temos um pequeno mínimo do espectro, demonstrando que mesmo grande parte da proteína sendo desestruturada uma pequena porção possui estrutura ordenada.

Figura 30 - Espectro de CD da proteína MEG-11 em tampão 20mM de fosfato de sódio pH 7.0.

Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente, foram realizadas medidas de CD com a proteína em diferentes concentrações de TFE. O aumento da concentração de TFE no meio, fez com que o espectro apresentado pela proteína apresentasse um ganho em seu mínimo na região de 222nm e uma diminuição do mínimo na região de 198nm (figura 31), sendo estas mudanças características de ganho de estrutura secundária.

Figura 31 - Espectros de CD com a proteína MEG-11 em diferentes concentrações de TFE: 0%, 25%, 50%, 75% e 100%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Este ganho na estrutura secundária induzido pelo TFE, demonstra que mesmo sendo predominantemente desestruturada em solução aquosa, quando em condições favoráveis a proteína MEG-11 possui a capacidade de estruturação. Este ensaio, assim como a predição da estrutura e sua composição corroboram com o fato da proteína MEG-11, assim como a proteína MEG-14 ser uma clássica proteína intrinsecamente desordenada.

4.7.4 Variação térmica da proteína MEG-11 em solução aquosa

A estrutura secundária da proteína MEG-11 foi monitorada através de CD variando-se a temperatura de 10 a 90 °C. Os resultados apresentados na Figura 32, mostram que conforme aumenta-se a temperatura, os espectros passam a apresentar uma nova conformação, com um aumento da mínimo na região próxima a 222 nm e uma diminuição do mínimo na região de 198 nm, novamente, esta mudança é um indicativo de ganho de estrutura secundária da proteína. O

comportamento apresentado pela proteína MEG-11 é semelhante ao apresentado pela proteína MEG-14.

Figura 32 - Análise do efeito térmico na estrutura secundária da proteína MEG-11. A) Espectros de CD da proteína referentes às medidas realizadas variando-se a temperatura de 10°C (verde) até 90°C (vermelho). B) Gráfico das magnitudes dos picos de 198nm e 222nm conforme o aumento da temperatura.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.5 Efeitos da desidratação e rehidratação na estrutura da proteína MEG-11

A análise dos efeitos da desidratação e da rehidratação na estrutura da proteína MEG-11 foram realizadas de maneira similar à apresentada para a proteína MEG-14, diferindo somente na utilização do CD convencional. A figura 33 apresenta os espectros de CD exibidos pela proteína ao ser totalmente desidratada e em seguida rehidratada. A proteína MEG-11 apresenta um comportamento similar à proteína MEG-14, adquirindo conteúdo de estrutura ordenada quando desidratada e readquirindo seu espectro de desordenada quando rehidratada. Como explicado anteriormente, este comportamento é típico de IDPS, nas quais as interações com outras macromoléculas podem produzir interfaces não hidratadas ou um deslocamento de moléculas de água, fazendo com que assim a proteína adquira estrutura.

Figura 33 - Efeitos da desidratação/rehidratação no *folding* da proteína MEG-11. Proteína MEG-11 após ser desidratada em uma placa de quartzo (o filme foi formado com 10ul da proteína a uma concentração de 1,5mg/mL). Foram “tirados” 8 espectros em 3 posições, o espectro apresentado corresponde à média das medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.6 Interação da proteína MEG-11 com micelas de detergentes

Para analisar se as interações da proteína MEG-11 com micelas de detergentes gerariam alguma mudança na estrutura desordenada da proteína, foram realizadas medidas de CD. Nestas medidas, a proteína MEG-11 foi incubada na presença de detergentes com diferentes cargas, sendo sempre a razão proteína-detergente 1:1000. Na figura 34, podemos observar os espectros da proteína MEG-11 na presença de micelas dos detergentes CTAB (carregado positivamente), HPS (neutro) e SDS (negativo), nos quais é possível observar que os espectros não se alteraram, mesmo frente a adição das micelas de diferentes cargas. Este ensaio não suprime a possibilidade de interação da proteína MEG-11 com essas micelas, mas mostra que esta interação, ocorrendo ou não, não altera a estrutura da proteína.

Figura 34 - Espectros de CD da proteína MEG-11 em tampão fosfato pH 7,0 na presença de micelas do detergente aniônico SDS (preto), do detergente zwitteriônico HPS (azul) e do detergente catiônico CTAB (vermelho) – proporção 1:1000.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8 Interação MEG-14 com S100A9 e CC2D1A

Com a parceria da aluna Clarissa Romano dos Santos e da Dra. Joci Neuby Alves Macedo foram realizados experimentos de duplo híbrido utilizando-se a proteína MEG-14 como isca contra uma biblioteca de cDNAs de leucócitos humanos. A partir destes ensaios foi possível recuperar dois clones, um da proteína humana S100A9 e outra da proteína humana CC2D1A, indicando assim uma possível interação destas proteínas com a proteína em estudo, MEG-14. Ambas proteínas, S100A9 e CC2D1A, participam de maneira direta na mediação da resposta imune do homem. Desta maneira, a comprovação e o estudo da interação da proteína MEG-14 com essas duas importantes proteínas pode ser a base para o melhor entendimento entre a relação parasito-hospedeiro, que ainda é pouco compreendida. Devido ao grande potencial de tal descoberta, passamos a nos dedicar a tentar confirmar por ensaios *in vitro* as interações entre estas proteínas. Para isso foram clonadas e expressas construções das proteínas S100A9, CC2D1A e S100A8, sendo a última utilizada como controle negativo em alguns experimentos.

4.8.1 Clonagem e subclonagem das construções de S100A8/6Xhis, S100A9/Sumo-6Xhis, S100A9/GST

O PCR para as duas construções de S100A9, gerando fusões com a proteína SUMO e GST, foram realizados utilizando-se como *template*, cDNA de uma biblioteca de leucócitos humano. Os primers estão descritos na tabela 1. O gene correspondente à proteína S100A8 teve seus códons otimizados para expressão em *E. coli* através da síntese de um gene sintético pela empresa GENONE BIOTECHNOLOGIES (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Entretanto, devido à presença de um sítio de restrição específico para uma das enzimas que seriam utilizadas para o passo de subclonagem no meio da sequência do gene sintetizado, foi necessário desenhar *primers* com sítios de restrição diferentes dos iniciais e seguir com a reação de PCR. A figura 35-A ilustra os resultados das amplificações por PCR dos genes S100A9 (PGEX), S100A9 (PETSUMO) e S100A8 (pET28a), na qual

observamos que o tamanho de cada gene está em conformidade com o previsto, além de apresentar-se em quantidades suficientes para prosseguir com a clonagem em vetor de propagação.

Os produtos das amplificações por PCR foram purificados e posteriormente ligados ao vetor pGEM-T. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação em bactérias competentes DH5 α (*E. coli*), seguida da extração do DNA plasmidial de clones positivos e a clivagem por enzimas de restrição para analisar a presença do inserto (figura 35-B). Cada gene apresenta enzimas de restrição específicas, que podem ser observadas na tabela 1. Os clones positivos foram clivados novamente e os insertos purificados, quantificados e utilizados na etapa de subclonagem nos vetores de expressão específicos. Novamente, os plasmídeos recombinantes foram inseridos em células competentes DH5 α e seus DNAs plasmidiais foram extraído e clivados com as enzimas de restrição específicas para cada inserto, como observado na figura 35-C.

Figura 35 - Etapas da clonagem dos genes S100A8, S100A9 (pGEX) e S100A9 (pETSumo).

Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Em **A)** Amplificações dos genes S100A8(1), S100A9 construção pETSumo (2) e S00A9 construção pGEX (3); **B)** Análise de restrição: S100A8 (4), S100A9/pETSumo (5) e S100A9/pGEX (6) em vetor de propagação pGEM-T; **C)** Análise de restrição: S100A8 (7), S100A9/pETSumo (8) e S100A9/pGEX (9) nos vetores de expressão pET28a, pETSumo e pGEX, respectivamente. As setas indicam as bandas correspondentes ao vetor pGEM-T (3015 pb), o inserto S100A8 (279pb), o inserto S100A9 (345pb), o vetor pETSumo (5600pb), o vetor pET28a(+) (5368pb) e ao vetor pGEX-5X-1(4972pb). M referente ao padrão de massa molecular *Gene Ruler 1Kb DNA Ladder* (Fermentas).

Fonte: Elaborada pela autora.

Após estas etapas, os clones positivos foram sequenciados e analisados quanto à sua identidade com a sequência “molde”. Os clones que apresentaram 100% de identidade foram transformados em células de expressão Roseta (DE3).

4.8.2 Expressão das proteínas S100A8/6Xhis, S100A9/Sumo6Xhis, S100A9/GST, CC2D1A/GST, GST e CC2D1A/Sumo6Xhis

A expressão das proteínas S100A9/GST, S100A9/Sumo6Xhis, S100A8/6Xhis, CC2D1A/GST, GST (*glutathione S-transferase*) e CC2D1A/Sumo6Xhis foram realizadas a 20 °C durante 16 horas, sendo todas induzidas com 0,3 mM de IPTG. A análise das expressões das proteínas foi realizada através de SDS-PAGE utilizando-se alíquotas coletadas antes e após a indução das expressões, sendo que todas as proteínas exibiram um nível de expressão significativo, como pode ser observado na figura 38. Além disso, todas as proteínas apresentaram o tamanho esperado como pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros teóricos das construções das proteínas S100A8, S100A9, CC2D1A e GST

Proteína	Massa Molecular (Da)	Número de resíduos de aminoácidos	pI teórico	Coefficiente de extinção molar em 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$)	Abs _{280nm} 0,1% (1g/L)
S100A8/6Xhis	13559,5	121	6,93	11460	0,845
S100A8	10834,5	93	6,5	11460	1,058
S100A9/Sumo6Xhis	26421,7	229	5,85	8480	0,321
S100A9/GST	39396,3	338	5,81	49850	1,265
S100A9	13144,8	113	5,71	6990	0,532
CC2D1A/GST	44315,3	384	6,3	50225	1,133
CC2D1A/Sumo6Xhis	31340,7	275	6,29	8605	0,275
CC2D1A	18063,8	159	7,97	7115	0,394
GST	26269,5	225	5,91	42860	1,632

Fonte: Elaborada pela autora.

Após as expressões, as células foram coletadas, lisadas e centrifugadas, separando-se assim, as frações solúveis (proteínas solúveis) e insolúveis (restos celulares e proteínas insolúveis). A avaliação da solubilidade foi realizada através de SDS-PAGE, a partir da qual foi possível observar que ambas as construções da proteína S100A9, a proteína de fusão GST e a proteína S100A8 permaneciam preferencialmente na fração solúvel. O contrário ocorreu com as construções da

proteína CC2D1A, para qual mesmo após a adição de diferentes aditivos, foi possível obter somente uma pequena fração solúvel da construção fusionada a proteína GST, sendo que a construção fusionada a Sumo apresentou-se totalmente insolúvel (figura 36).

Figura 36 - Teste de expressão e solubilidade das proteínas S100A9/Sumo6Xhis, S100A9/GST, S100A8/6Xhis, CC2D1A/Sumo6Xhis, CC2D1A/GST e GST. Gel de tricina 10% corado com *Comassie blue*. Para A, D, E e F os números indicam: 1) Pré-induzido, 2) Induzido, 3) Fração insolúvel e 4) Fração solúvel. Para B e C os números indicam: 1) Pré-induzido, 2) Induzido, 3) Fração insolúvel e 4) Fração insolúvel. M indica o padrão de alto peso.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.3 Purificação da proteína S100A8/6Xhis

A proteína S00A8/6Xhis foi primeiramente purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. As eluições foram realizadas com 100, 250 e 500 mM de Imidazol (figura 37).

Figura 37 - Purificação da proteína S100A8/6Xhis em coluna de afinidade Ni-NTA. Gel de tricina 10% corado com azul de *Comassie blue*. Em 1) Eluição com 100 mM de Imidazol; 2) Eluição com 250 mM de Imidazol e 3) Eluição com 500 mM de Imidazol. As setas indicam as bandas correspondentes a proteína S100A8/6Xhis. M indica o padrão molecular de alto peso.

Fonte: Elaborada pela autora.

As eluições foram reunidas, concentradas, quantificadas e aplicadas em coluna de exclusão molecular superdex 75 (*GE Healthcare*), a partir da qual, foi possível obter a proteína S100A8/6Xhis com um satisfatório grau de pureza.

4.8.4 Purificação das proteínas S100A9/GST, CC2D1A/GST e GST

Ambas as proteínas fusionadas a GST e a proteína GST foram purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando-se a resina *Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow*. A partir desta purificação foi possível obter as proteínas com um grau de pureza intermediário, pois todas apresentavam pequenas contaminações, principalmente a proteína S100A9/GST (figura 38). Além disso, com

é possível observar na figura 38, o rendimento obtido para a proteína CC2D1A/GST foi pequeno, entretanto o suficiente para a realização do experimento posterior.

Figura 38 - Análise da purificação das proteínas S100A9/GST, CC2D1A/GST e GST. Gel de tricina 10% corado com azul de Comassie blue – Purificação em coluna de afinidade Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow das proteína S100A9/GST (A) e CC2D1A/GST (B) e GST (C): em 1) 10mM de Glutathione reduzida; 2) 10mM de Glutathione reduzida.

Fonte: Elaborada pela autora.

As eluições foram reunidas, concentradas, quantificadas e em seguida aplicadas em coluna *HiTrap Desalting* (GE Healthcare), para retirada da glutathione reduzida. Posteriormente, as três proteínas, juntamente com a proteína MEG-14 foram utilizadas para realização do experimento de *pulldown*.

4.8.5 Purificação da proteína S100A9/Sumo-6Xhis

Os procedimentos de purificação realizados para a proteína S100A9/Sumo-6Xhis foram os mesmos anteriormente citados para a proteína MEG-11, diferindo somente nas eluições da primeira coluna de afinidade em níquel, sendo esta eluída nas frações 100, 250 e 500 mM de Imidazol. As etapas iniciais de purificação, bem como a clivagem da Sumo fusão foram realizadas com êxito e podem ser observadas na figura 39.

Figura 39 - Etapas da purificação da proteína S100A9/Sumo. A) Gel de tricina 10%: purificação em coluna de afinidade Ni-NTA da proteína S100A9/Sumo-6Xhis, eluição de 100 mM (1), 250 mM (2) e 500 mM (3) de Imidazol; B) Clivagem da fusão Sumo: Fração pré-clivagem (4) e pós clivagem (5); C) Segunda coluna de afinidade – remoção da fusão sumo e SUMO protease, eluato – proteína S100A9 (6), lavagens com tampão + 10 mM de Imidazol (7 e 8), lavagem com tampão + 15 mM de Imidazol (9) e eluição da sumo fusão e sumo protease com tampão acrescido de 500mM de imidazol (10). M indica os padrões de massa molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em seguida, a proteína S100A9 foi purificada novamente em uma coluna de exclusão molecular (*superdex 75- GE Healthcare*), possibilitando a obtenção da proteína com um elevado grau de pureza (figura 40).

Figura 40 - Cromatograma da purificação em coluna de exclusão molecular da proteína S100A9, ao lado gel de poliácridamida 15% corado com azul de *Comassie blue*, mostrando os tubos 10 e 11 referentes a proteína.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.6 Análise da funcionalidade da proteína S100A9 recombinante

A análise da funcionalidade da proteína S100A9 foi realizada através de técnicas de CD e ITC, nas quais foi possível observar que a proteína expressa em sistema recombinante apresentava um espectro característico de proteínas com alto conteúdo de alfa hélices (figura 40), típico para proteínas dessa família. Além disso, nos ensaios de ITC, onde foi realizada a injeção de CaCl_2 em uma cela contendo a proteína, foi possível observar uma curva característica de interação endotérmica (figura 41), condizente com um processo de ligação específica da proteína com este íon. Dessa forma, esses ensaios demonstraram que a proteína S100A9 expressa em sistema heterólogo está enovelada corretamente e ativa.

Figura 41 - Análise da funcionalidade da proteína S100A9 através das técnicas de ITC e CD. A) Ensaio de ITC para avaliar a capacidade de ligação ao cálcio da proteína S100A9: curva de titulação (painel superior) e isotérmica de ligação (painel inferior); B) Espectro de CD da proteína S100A9.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.7 Ensaio de *pulldown* com as proteínas MEG-14/6Xhis e S100A9/GST

O primeiro teste realizado para confirmar a interação S100A9/MEG-14 foi o ensaio de *pulldown*, que teve como objetivo principal demonstrar *in vitro* a interação entre a proteína S100A9 humana e a proteína MEG-14. Foram realizados experimentos na presença e ausência de cálcio, visto que é descrito na literatura que proteínas da família S100 pertencem a uma subfamília de ligadoras de cálcio, sendo assim, muitas interações são ocasionadas somente na presença deste íon. O ensaio foi realizado utilizando-se as proteínas previamente purificadas: S100A9/GST, GST e MEG-14/6Xhis. A figura 42 representa o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% obtido após a realização do experimento de *pulldown*, sendo que as combinações proteicas observadas nos poços de 3 a 10, bem como os tampões específicos utilizados foram descritos anteriormente na seção Materiais e Métodos na tabela 1.

Figura 42 - Ensaio de *pulldown* com as proteínas S100A9 e MEG14. Gel de poliacrilamida 15%: Cada poço do gel contém o produto ligado a resina de *glutathione sepharose* após o experimento de *pulldown* em tubos onde foram adicionados: 3) MEG-14/6Xhis + S100A9/GST; 4) S100A9/GST; 5) MEG14/6Xhis; 6) GST+ MEG-14/6Xhis; 7) MEG-14/6Xhis + S100A9/GST + 1mM de CaCl₂; 8) S100A9/GST + 1 mM de CaCl₂; 9) MEG14/6Xhis + 1 mM de CaCl₂; 10) GST + MEG-14/6Xhis + CaCl₂. O poço 1 contém a proteína MEG-14/6Xhis pura. O poço 2 corresponde ao padrão de peso molecular. As setas indicam o peso molecular esperado para as proteínas GST, S100A9/GST e MEG-14/6Xhis.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como podemos observar na Figura 42, a proteína MEG-14/6Xhis foi recuperada somente no poço 7 (presença da S100A9/GST + MEG-14/6Xhis+ CaCl₂), demonstrando que há interação entre as proteínas e que esta interação é dependente do íon cálcio, uma vez que não foi possível observar a presença/recuperação da proteína MEG-14/6Xhis no poço 3, que difere do poço 7 somente pela ausência deste íon.

Para garantia da especificidade da interação foram utilizados controles negativos, sendo eles: 1) proteína MEG-14/6Xhis, para verificação de interações inespecíficas da proteína com a resina e 2) a proteína GST, para garantir que a interação está ocorrendo com a proteína S100A9 e não com a GST em fusão com esta proteína. Como pode ser observado na Figura 45, os controles negativos excluem a possibilidade da interação MEG-14 diretamente com a resina (5 e 9) ou com a proteína GST (6 e 10). Desta forma, este primeiro ensaio confirmou a interação entre MEG-14/S100A9 *in vitro* e que a mesma é dependente de cálcio.

4.8.8 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através da técnica de ITC

Para melhor compreender como a interação entre as proteínas MEG-14 e S100A9 ocorre, foram realizadas medidas de ITC com as proteínas na presença do íon cálcio, visto que no ensaio de *pulldown* foi observado a dependencia desse íon para a interação. O experimento foi realizado de tal modo que a proteína MEG-14 foi adicionada aos poucos a uma cela contendo uma solução com a proteína S100A9 e o calor resultante desta titulação foi medido.

A figura 43 apresenta os dados de saída do experimento de ITC, sendo a curva de titulação exibida no painel superior, na qual é possível observar que a reação de interação entre as proteínas MEG-14/S100A9 é um processo exotérmico. Utilizando-se o programa *Origin* foi realizado o ajuste não linear da curva isotérmica de ligação (painel inferior) empregando-se o modelo de “sítios não interagentes e independentes”, a partir do qual foi possível calcular importantes parâmetros termodinâmicos desta interação (tabela 9).

Figura 43 - Calorimetria de titulação isotérmica da interação da proteína MEG-14 com a proteína S100A9. Curva de titulação (painel superior) e isotérmica de ligação (painel inferior) da proteína MEG-14 interagindo com a proteína S100A9 em solução tampão contendo Tris 50mM pH 8.0, NaCl 100mM e 1mM de CaCl₂, medida realizada à 25°C.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos parâmetros calculados foi a estequiometria, sendo $n=1$, mostrando que uma unidade da proteína S100A9 se liga a um monômero da proteína MEG-14. Além disso, foi obtida a constante de dissociação, sendo esta igual a 2 μM , mostrando que afinidade entre as proteínas é de nível intermediário. Outros dados obtidos pelo ajuste da isotérmica da interação foram a entalpia e a entropia da reação, sendo a variação da entalpia negativa e a variação da entropia positiva, sendo desta maneira uma reação entropicamente dirigida, uma vez que a

componente entropica tem maior colaboração na totalidade da energia atrelada ao processo de ligação entre essas duas proteínas.

Tabela 9 - Parâmetros termodinâmicos referentes à titulação da proteína MEG14 na proteína S100A9, obtidos através da técnica de calorimetria de titulação isotérmica

K_a (M)	K_d (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol)	$t\Delta S$ (kcal/mol)	n	ΔS (kcal/mol)
$4,45 \times 10^5$ $\pm 4,82 \times 10^4$	2×10^{-6}	$-3,1 \pm 0,046$	0,015	4,6	$0,934 \pm 0,0103$	-7,7

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.9 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através da técnica de SPR

Para melhor análise da interação entre a proteína MEG-14 e a proteína S100A9 foi utilizada a técnica de SPR. Inicialmente, a proteína MEG-14 foi acoplada a um sensor chip CM5 usando-se um kit de acoplamento de amina. Em seguida, os ensaios de SPR foram realizados em um instrumento *BIAcore X* (GE Healthcare), sendo a proteína S100A9 injetada sobre a superfície do sensor chip em diferentes concentrações, sempre utilizando-se tampão de corrida acrescido de 1 mM $CaCl_2$. A associação foi monitorada durante o tempo de injeção, e a dissociação durante 10 minutos após o fim de cada injeção. Na figura 44 estão indicados os sensorgramas e as concentrações da proteína S100A9 (em solução) utilizadas. A partir dos sensorgramas apresentados pela interação das proteínas pode se inferir que a interação é específica, uma vez que aumentando-se a concentração da proteína S100A9 (em solução), a resposta de ligação à proteína MEG-14 (imobilizada) também é aumentada. É possível notar também que após a retirada da proteína S100A9 há uma queda lenta do sinal o que também é indicativo de uma ligação específica.

Figura 44 - Sensorgramas da interação entre as proteínas MEG-14 e S100A9.

Fonte: Elaborada pela autora.

O coeficiente de dissociação dessa interação foi calculado, utilizando-se o modelo de ligação Langmuir 01:01, apresentando valor igual a 1,8 μM . Este resultado corrobora com o dado obtido por ITC, descrito anteriormente, no qual o coeficiente de dissociação apresentado foi 2 μM . Os dados obtidos por SPR, juntamente com os resultados do *pulldown* e ITC comprovaram que a interação MEG-14/S100A9 efetivamente ocorre *in vitro*, e sobre tudo mostraram que a interação é específica, principalmente por ocorrer somente na presença de cálcio.

4.8.10 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através das técnicas de CD e SRCD

Como descrito anteriormente, a proteína MEG-14 é um exemplo clássico de IDPs, que apresenta ausência de estrutura secundária em quase todo seu comprimento. Entretanto, espera-se que em certas condições esta proteína possua

a capacidade de alterar seu estado desordenado para um mais ordenado. Para verificar se há ganho de estrutura quando a proteína MEG-14 interage com a proteína S100A9 foram realizados ensaios de CD e SRCD com as proteínas individuais e juntas, com a presença de 1 mM de CaCl_2 .

Na figura 45-A, é possível observar os espectros de CD convencional das proteínas MEG-14 e S100A9 separadas, o espectro do complexo MEG-14/S100A9 e espectro teórico (somatória dos espectros individuais). O espectro teórico foi comparado com o espectro experimental das proteínas juntas, no qual foi possível observar que a região próxima a 220 nm apresenta uma ligeira diferença. Entretanto, monitorando-se somente esta região não foi possível inferir se houve uma mudança estrutural durante a interação.

Desta forma, foi realizado o mesmo experimento utilizando-se a técnica de SRCD, novamente realizada pelo Dr. José Luiz S. Lopes, onde foi possível obter uma região de leitura maior na faixa de 170 a 270 nm. Na figura 45-B, pode ser observado o espectro de SRCD da proteína MEG-14 em solução aquosa, sendo este típico de uma proteína desordenada com elevada flexibilidade, enquanto que o espectro da S100A9 apresenta os picos atribuídos a elementos α -hélice, o que sugere que ambas as construções das proteínas adotaram a sua correta configuração em seus estados nativos. Diferenças entre o somatório dos espectros individuais e o espectro experimental sugerem que há alterações conformacionais na montagem do complexo. As diferenças observadas consistem de um ligeiro aumento do pico em 222 nm, e diferenças marcantes em comprimentos de onda abaixo de 190 nm, com o deslocamento e o aumento do pico em 184 nm. Estas mudanças são atribuídas ao ganho de conteúdo de estrutura secundária. Como as grandes diferenças ocorreram em baixas comprimentos de onda, não eram detectáveis com espectroscopia de CD convencional, no entanto, a espectroscopia SRCD pôde evidenciar as mudanças estruturais na região.

Figura 45 - Análise das estruturas secundárias das proteínas MEG-14 e S100A9 individuais e complexadas. A) Espectro de CD da interação MEG-14/S100A9 e em B) Espectro de SRCD da interação MEG-14/S100A9. Em preto: espectro da proteína MEG-14 em solução aquosa; vermelho: espectro da proteína S100 em solução aquosa; verde: soma teórica dos espectros da proteína MEG-14 e S100A9; azul: espectro do complexo MEG-14/S100A9; todas as medidas foram realizadas na presença de 1 mM de cálcio.

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nestes resultados é possível propor que a formação do complexo MEG-14/S100A9 pode ser classificada como uma interação induzida por encaixe (induced-fit interaction), em que uma alteração na estrutura de um ou de ambos os componentes é observado quando o complexo é montado. Neste tipo de interação,

um bolso/câmara (*pocket*) pode ser criado em uma das moléculas parceiras para a ligação da outra molécula específica. Como descrito anteriormente, a proteína MEG-14 é uma IDP, com mais de 80% dos seus resíduos numa conformação desordenada em solução aquosa. Desta forma, a interação induzida por ajuste discutido aqui, é mais suscetível de envolver o enovelamento parcial de regiões não ordenadas da proteína MEG-14 após a interação desta com a proteína S100A9 e não ao contrário.

4.8.11 Termoforese em microescala (*MicroScale Thermophoresis* - MST)

A interação MEG-14/S100A9 foi estudada e confirmada por meio de diferentes técnicas experimentais. Contudo, para o ensaio *ex vivo* posteriormente realizado (explicitado no próximo item), com o objetivo de se avaliar a interação no interior do parasita, tornou-se necessário o uso de um controle negativo. A partir de uma busca prévia na literatura, a proteína S100A8 foi escolhida, pois pertence à mesma família e classe da proteína S100A9, o que garante grande especificidade como controle negativo para a interação MEG-14/S100A9.

A Termoforese em microescala é uma técnica utilizada para se medir interações biomoleculares e foi utilizada para monitorar a interação da proteína MEG-14 com as proteínas S100A9 e S100A8. Para a realização do experimento de MST, a proteína MEG-14 foi marcada com uma sonda fluorescente (NT-647) por acoplamento de amina reativa. Durante o experimento, a concentração da proteína MEG-14 marcada foi mantida constante, enquanto que a concentração da S100A9 não marcada foi variada entre 8 nM e 65 μ M e a concentração da proteína S100A8 foi variada entre 1 nM e 60 μ M. O ensaio foi realizado em tampão 20 mM de *Hepes* acrescido de 1 mM de CaCl_2 . Após uma curta incubação as amostras foram colocadas em capilares de vidro hidrofílico e a análise foi realizada utilizando-se o *Monolith* NT.115 (NanoTemper technologies). A figura 46 exibe os gráficos correspondentes às análises termoforéticas dos ensaios realizados, sendo em A) o ensaio realizado com a proteína S100A9 e em B) o ensaio realizado com a proteína S100A8.

Figura 46 - Medidas de MST com a proteína MEG-14 marcada e diferentes concentrações da proteína S100A9 (A) e da proteína S100A8 (B). As concentrações no eixo x estão representados graficamente em nM.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como é possível observar na figura 49, apesar do ajuste da curva para a proteína S100A9 não corresponder completamente aos pontos experimentais, foi possível obter um padrão de resposta para a constante de dissociação. Em contraste, para a proteína S100A8 nenhuma mudança no padrão de migração de MEG-14 foi observado mesmo em altas concentrações de S100A8, sugerindo que não há interação entre estas moléculas. Desta forma, a partir destes resultados,

classificamos a proteína S100A8 como um possível controle proteico para ser utilizado nos experimentos posteriores.

4.8.12 Análise da interação das proteínas MEG-14 e S100A9 através de ensaios com o parasita *ex vivo*

Os experimentos *ex vivo* realizados com os parasitas consistiram na incubação dos mesmos em meio de cultura contendo as proteínas S100A8 ou S100A9 conjugadas com um fluoróforo. Espera-se que estes parasitas alimentem-se do meio de cultura, ingerindo estas proteínas e simulando assim a ingestão que ocorre quando o parasita encontra-se no hospedeiro. A partir destes experimentos foi possível observar um sinal de fluorescência intenso na região da glândula do esôfago de vários vermes que foram incubados com a S100A9 marcada (figura 47). A proteína MEG-14 ainda não foi imunolocalizada no parasita *S. mansoni*, entretanto os transcritos de MEG-14 foram localizados na glândula do esôfago de *S. japonicum*,²⁰ indicando que este seria o possível local de expressão desta proteína. Desta forma, a retenção da proteína S100A9 na glândula do esôfago (figura 47), indica a possibilidade da interação desta proteína com a proteína MEG-14 nativa.

Figura 47 - Vermes adultos ♂ do *S. mansoni* incubados com proteína S100A9 marcada. As figuras a esquerda representam os vermes visualizados por microscopia de campo claro, já os da direita representam os observados por microscopia de fluorescência, utilizando microscópio com contraste de fase da marca Olympus modelo BX53 acoplado a uma câmera com captura de imagem e utilização do software *Cellsens Digital Imagen Standart*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Não foi possível observar nenhum sinal fluorescente específico para o experimento utilizando-se a proteína S100A8 (controle negativo) (figura 48), sugerindo que o sinal obtido no experimento utilizando a S100A9 deve-se de fato a uma interação específica desta proteína.

Figura 48 - Vermes adultos ♂ do *S. mansoni* incubados com proteína S100A8 marcada. As figuras a esquerda representam os vermes visualizados por microscopia de campo claro, já os da direita representam os observados por microscopia de fluorescência, utilizando microscópio com contraste de fase da marca Olympus modelo BX53 acoplado a uma câmera com captura de imagem e utilização do *software Cellsens Digital Imagen Standart*.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.8.13 Ensaio de *pulldown* com as proteínas MEG-14/HIS e CC2D1A/GST

Foi realizado o ensaio de *pulldown* com intuito de confirmar a interação entre as proteínas MEG-14 e a CC2D1A. Este ensaio foi realizado de maneira similar ao descrito anteriormente para a proteína S100A9 (seção 4.8.7). Entretanto, a proteína CC2D1A não apresentou interação com a proteína MEG-14. A figura 49, apresenta o

SDS-PAGE correspondente às frações do ensaio, sendo que neste não é possível observar a banda correspondente a proteína MEG-14 em nenhuma das frações, mesmo com a adição de CaCl_2 .

Figura 49 - Ensaio de *pulldown* com as proteínas CC2D1A e MEG14. Gel de poliacrilamida 15%: Cada poço do gel contém o produto ligado a resina de *glutathione sepharose* após o experimento de *pulldown* em tubos onde foram adicionados: 1) MEG-14/6Xhis (purificada); 2) MEG-14/6Xhis + CC2D1A/GST; 3) CC2D1A/GST; 4) MEG14/6Xhis; 5) GST+ MEG-14/6Xhis; 6) MEG-14/6Xhis + CC2D1A/GST + 1 mM de CaCl_2 ; 7) CC2D1A/GST + 1mM de CaCl_2 ; 8) MEG14/6Xhis + 1 mM de CaCl_2 ; 9) GST + MEG-14/6Xhis + CaCl_2 . As setas indicam o peso molecular esperado para as proteínas GST, CC2D1A/GST e MEG-14/6Xhis.

Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, duas proteínas codificadas por genes micro-exons (MEG-11 e MEG-14) do parasita *S. mansoni* foram clonadas e expressas em sistema heterólogo. Os experimentos realizados sugerem que ambas as proteínas representam proteínas intrinsecamente desordenadas (IDP). É notável que apesar de possuírem esta característica em comum estas duas proteínas não possuem nenhuma similaridade detectável entre suas sequências primárias. No entanto elas apresentam características em comum, como a presença de uma alta porcentagem de resíduos prolina e resíduos carregados, e principalmente a de ambas serem classificadas como IDPs. Embora as condições utilizadas nos experimentos de CD e SRCD sejam diferentes das encontradas *in vivo*, acreditamos que a dinâmica da conformação das proteínas MEG-11 e MEG-14 possam estar envolvidas no recrutamento e interações com parceiros proteicos dentro do organismo hospedeiro.

A interação da proteína MEG-14 com a proteína S100A9, que está envolvida no estímulo da resposta inflamatória, tem como possível função a modulação de células do hospedeiro, uma vez que já foram encontrados leucócitos intactos na região da glândula do esôfago. Além disso, esta interação impediria a liberação de grandes quantidades de S100A9 no vômito do parasita, o que poderia exacerbar uma resposta imune contra o parasita. A confirmação dessa interação foi realizada através de diversas técnicas, sendo possível obter valores muito semelhantes de constante de afinidade, o que reforça a idéia que estes experimentos representam uma interação específica. Além disso, o fato que não foi possível detectar interação entre a proteína S100A8 e MEG-14 e que a interação entre S100A9 e MEG-14 é dependente da presença de cálcio fornecem evidencia adicional da especificidade da interação observada. Já foi observado que a concentração do complexo S100A9/S100A8 pode chegar à faixa de micromolar em certas condições patológicas,⁵⁸ e portanto a constante de afinidade observada (1,8-2 μ M) encontra-se em uma faixa relevante em condições fisiológicas.

Finalmente, experimentos *ex vivo*, utilizando-se a proteína S100A9 marcada com fluoróforo, indicaram que quando ingerida pelo parasita, esta proteína se acumula na glândula do esôfago, local onde já foi localizada a proteína MEG-14 em

S. japonicum, sugerindo que esta interação está ocorrendo, com a proteína nativa. O mesmo experimento realizado com uma proteína controle da mesma família da S100A9, a S100A8, não apresentou sinal específico de fluorescência, demonstrando mais uma vez a especificidade da interação da proteína S100A9 com a proteína MEG-14. A provável localização da proteína MEG-14 de *S. mansoni* na parede da glândula do esôfago do parasita, sugere que eventualmente o complexo S100A9/MEG-14 possa estar sujeito a um processo de reciclagem via endocitose, que levaria a degradação da proteína S100A9.

Proteínas codificadas por MEGs possuem função desconhecida e, devido ao fato das mesmas não possuírem similaridade com nenhuma outra proteína fora do gênero *Schistosoma*, não é possível realizar previsões baseadas em homologia com proteínas já descritas. No entanto, a proposição de experimentos para verificação de função poder ser feita utilizando o contexto no qual a proteína se encontra e em suas propriedades estruturais. Neste caso em particular, a existência de uma proteína intrinsecamente desestruturada na glândula do esôfago, que é uma região de interface entre o hospedeiro e o parasito, nos levou a hipótese que a MEG-14 poderia estar interagindo com proteínas do hospedeiro. A obtenção de dados que suportam esta hipótese representa um passo significativo no entendimento da relação parasito-hospedeiro e um avanço para o entendimento da função das proteínas codificadas por genes de micro-exon.

REFERÊNCIAS

- 1 NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 193-221.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**. situation and trends. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en>. Acesso em: 18 jan. 2015
- 3 GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.
- 4 GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 383–397, 2012.
- 5 BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Situação epidemiológica**: dados esquistossomose. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/656-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/esquistossomose/11244-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 18 fev. 2015.
- 6 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**. countries x indicators. 2013. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/?units=minimal®ion=all&country=bra&countries=bra&year=2013>. Acesso em: 18 fev. 2013.
- 7 BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da esquistossomose mansônica**: diretrizes técnicas. 4. ed. Brasília/DF, 2014.
- 8 DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 5, p. 420-426, 2005.
- 9 FENWICK, A.; WEBSTER, J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 577-582, 2006.
- 10 DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.
- 11 DOENHOFF, M. J. et al. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 465-469, 2002.

- 12 ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.
- 13 SALZET, M.; CAPRON, A.; STEFANO, G. B. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. **Parasitology Today**, v. 16, n.12, p. 536-540, 2000.
- 14 ANGELI, V. et al. *Schistosoma mansoni* induces the synthesis of IL-6 in pulmonary microvascular endothelial cells: role of IL-6 in the control of lung eosinophilia during infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 9, p. 2751-2761, 2001.
- 15 RAMASWAMY, K.; KUMAR, P.; HE, Y. X. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, v. 165, n. 8, p. 4567–4574, 2000.
- 16 CHEN, L.; RAO, K. V.; HE, Y. X.; RAMASWAMY, K. Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34329-34335, 2002.
- 17 JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; ZHANG, L.; SUNDERLAND, P.; MCMANUS, D. P. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions. **Bioessays**, v. 26, n. 7, p. 752–765, 2004.
- 18 HELLEMOND, J. J. van; RETRA, K.; BROUWERS, J. F.; BALKOM, B. W. van; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 691–699, 2006.
- 19 LOUKAS, A.; TRAN, M.; PEARSON, M. S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3, p. 257-263, 2007.
- 20 LI, X. H.; CASTRO-BORGES, W.; PARKER-MANUEL, S.; VANCE, G. M.; DEMARCO, R.; NEVES, L. X.; EVANS, G. J. O.; WILSON, R. A. The schistosome oesophageal gland: initiator of blood processing. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 2337, 2013.
- 21 LI, X. H.; STARK, M.; VANCE, G. M.; CAO, J. P.; WILSON, R. A. The anterior esophageal region of *Schistosoma japonicum* is a secretory organ. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 565, 2014. doi:10.1186/s13071-014-0565-8.
- 22 BERRIMAN, M. et al. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 352-358, 2009.
- 23 ZHOU, Y. et al. *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host–parasite interplay. **Nature**, v. 460, n. 7253, p. 345-352, 2009.

- 24 Young, N. D. et al. Whole-genome sequence of schistosoma haematobium. **Nature Genetics**, v. **44**, p. 221–225, 2012. doi:10.1038/ng.1065.
- 25 VOLFOVSKY, N.; HAAS, B. J.; SALZBERG, S. L. Computational discovery of internal micro-exons. **Genome Research**, v. 13, n. 6A, p. 1216-1221, 2003.
- 26 DEMARCO, R. et al. Protein variation in blood-dwelling schistosome worms generated by differential splicing of micro-exon gene transcripts. **Genome Research**, v. 20, n. 8, p. 1112-1121, 2010.
- 27 PHILIPPSEN, G. S; WILSON, R. A.; DEMARCO, R. Accelerated evolution of Schistosome genes coding for proteins located at the host-parasite interface. **Genome Biology and Evolution Advance**, 2015. doi:10.1093/gbe/evu287.
- 28 TAYLOR, J. E.; RUDENKO, G. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? **Trends in Genetics**, v. 22, n. 11, p. 614-620, 2006.
- 29 KYES, S. A.; KRAEMER, S. M.; SMITH, J. D. Antigenic variation in Plasmodium falciparum: gene organization and regulation of the var multigene family. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 9, p. 1511-1520, 2007.
- 30 MOORE, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 19, n. 6, p. 739-744, 1965.
- 31 KRETSINGER, R. H., NOCKOLDS, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. structure determination and general description. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 9, p. 3313-3326, 1973.
- 32 SHANG, X.; CHENG, X.; ZHOU, R. Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 40, n. 4, p. 449-464, 2008.
- 33 ROTH, J.; VOGL, T.; SORG, C; SUNDERKOTTER, C. Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 4, p. 155-158, 2003.
- 34 KORNDORFER, I. P.; BRUECKNER, F.; SKERRA, A. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting α -helices can determine specific association of two EF-hand proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, n. 5, p. 887-898, 2007.
- 35 GUIGNARD, F.; MAUEL, J.; MARKERT, M. Identification and characterization of a novel human neutrophil protein related to the S100 family. **Biochemical Journal**, v. 309, pt. 2, p. 395-401, 1995.
- 36 ISHIKAWA, K.; NAKAGAWA, A.; TANAKA, I.; SUZUKI, M.; NISHIHARA, J. The structure of human MRP8, a member of the S100 calcium-binding protein family, by MAD phasing at 1.9 Å resolution. **Acta Crystallographica D**, v. 56, pt. 5, p. 559-566, 2000.

- 37 ITOU, H.; YAO, M.; FUJITA, I.; WATANABE, N.; SUZUKI, M.; NISHIHARA, J.; TANAKA, I. The crystal structure of human MRP14 (S100A9), a Ca(2+)-dependent regulator protein in inflammatory process. **Journal of Molecular Biology**, v. 15, p. 265-276, 2002. doi:10.1006/jmbi.2001.5340.
- 38 PASSY, R. J.; WILLIAMS, E.; LICHANSKA, A. M.; WELLS, C.; HU, S.; GECZY, C. L.; LITTLE, M. H.; HUME, D. A. A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2209–2216, 1999.
- 39 MANITZ, M. P.; HORST, B.; SEELIGER, S.; STREY, A.; SKRYABIN, B. V.; GUNZER, M.; FRINGS, W.; SCHONLAU, F.; ROTH, J.; SORG, C.; NACKEN, W. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 3, p. 1034–1043, 2003.
- 40 HOBBS, J. A.; MAY, R.; TANOUSIS, K.; MCNEILL, E.; MATHIES, M.; GEBHARDT, C.; HENDERSON, R.; ROBINSON, M. J.; HOGG, N. Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 7, p.2564–2576, 2003.
- 41 KESSELA, C.; HOLZINGERA, D.; FOELLA, D. Phagocyte-derived S100 proteins in autoinflammation: putative role in pathogenesis and usefulness as biomarkers. **Clinical Immunology**, v. 147, n. 3, p. 229–224, 2013.
- 42 TIRKOS, S.; NEWBIGGING, S.; NGUYEN, V.; KEET, M.; ACKERLEY, C.; KENT, G.; ROZMAHEL, R. F. Expression of S100A8 correlates with inflammatory lung disease in congenic mice deficient of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Respiratory Research**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2006.
- 43 SHENG, J. G.; MRAK, R. E.; GRIFFIN, W. S. S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. **Journal Neuroscience Research**, v. 39, n. 4, p. 398–404, 1994.
- 44 LOSER, K.; VOGL, T.; VOSKORT, M.; LUEKEN, A.; KUPAS, V.; NACKEN, W.; KLENNER, L.; KUHN, A.; FOELL, D.; SOROKIN, L.; LUGER, T. A.; ROTH, J.; BEISSERT, S. The toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of auto reactive CD8+ T cells. **Nature Medicine**, v.16, n. 6, p. 713-718, 2010.
- 45 BJORK, P.; BJORK, A.; VOGL, T.; STENSTROM, M.; LIBERG, D.; OLSSON, A.; ROTH, J.; IVARS, F.; LEANDERSON, T. Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. **PLoS Biology**, v. 7, n. 4, p. 800-811, 2009.
- 46 RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; HEROLD, K.; CLYNES, R.; SCHMIDT, A. M. Receptor for advanced glycation end products: fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Hepatology**, v. 58, n. 1, p. 363–373, 2013. doi: 10.1002/hep.26395.

- 47 HATO, T.; DAGHER, P. C. How the innate immune system senses trouble and causes trouble. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2014.
- 48 ALBERT, P. R.; LEMONDE, S. 5-HT1A receptors, gene repression, and depression: guilt by association. **Neuroscientist**, v. 10. n. 6, p. 575–593, 2004.
- 49 HADJIGHASEM, M.; LEMONDE, S.; ALBERT, P.R. **Freud-2: a novel repressor of the 5-HT1A receptor gene**. Canada: Canadian College of Neuropsychopharmacology. 2005.
- 50 WILLIAMSON, M. P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. **Biochemical Journal**, v. 297, pt. 2, p. 249–260, 1994.
- 51 BURKHARD, P.; STETEFELD, J.; STRELKOV, S. V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 82–88. 2001.
- 52 BASEL-VANAGAITE, L.; TAUB, E.; HALPERN, G. J.; DRASINOVER, V.; MAGAL, N.; DAVIDOV, B.; ZLOTOGORA, J.; SHOHAT, M. Genetic screening for autosomal recessive nonsyndromic mental retardation in an isolated population in Israel. **European Journal of Human Genetics**, v. 15. n. 2, p. 250–253, 2007.
- 53 OU, X. M.; LEMONDE, S.; JAFAR-NEJAD, H.; BOWN, C. D.; GOTO, A.; ROGAEVA, A.; ALBERT, P. R. Freud-1: a neuronal calcium-regulated repressor of the 5-HT1A receptor gene. **The Journal of Neuroscience**, v. 23 n. 19, p. 7415-7425, 2003.
- 54 MILAR, A. M.; SOUSLOVA, T.; ALBERT, P. R. The Freud-1/CC2D1A family: multifunctional regulators implicated in mental retardation. In: TAN, U. (Ed.). Latest findings in intellectual and developmental disabilities research. 2012. cap.13. p. 279-302.
- 55 CHANG, C. H.; LAI, L. C.; CHEING, H. C.; CHEN, K. R.; SYUE, Y. Z.; LU, H. C.; LIN, W. Y.; CHEN, S. H.; HUANG, H. S.; SHIAU, A. L.; LEI, H. Y.; QIN, J.; LING, P. TBK1-associated protein in endolysosomes (TAPE) is an innate immune regulator modulating the TLR3 and TLR4 signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 9, p. 7043-7051, 2011.
- 56 WILKINS, M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in Molecular Biology**, v. 112, p. 531-552, 1999. doi: 10.1385/1-59259-584-7:531.
- 57 LEES, J. G.; SMITH, B. R.; WIEN, F.; MILES, A. J.; WALLACE, B. A. CDtool - an integrated software package for circular dichroism spectroscopic data processing, analysis and archiving. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 285-289, 2004.
- 58 PEPPER, R. J.; HAMOUR, S.; CHAVELE, K. M.; TODD, S. K.; RASMUSSEN, N.; FLINT, S.; LYONS, P. A.; SMITH, K. G.; PUSEY, C. D.; COOK, H. T.; SALAMA, A. D. Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in

ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 83, p. 1150-8, 2013. doi:10.1038/ki.2013.2.