UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

THOMÁS MICHELENA SANTOS

Estudo de componentes das vias de biossíntese e inserção de
selenocisteína em *Naegleria gruberi*: Selenofosfato Sintetase e
tRNA^{Sec}

São Carlos
2017

THOMÁS MICHELENA SANTOS

Estudo de componentes das vias de biossíntese e inserção de selenocisteína em *Naegleria gruberi*: Selenofosfato Sintetase e tRNA^{Sec}

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

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemman

Versão Original

São Carlos

2017

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

Santos, Thomás Michelena

Estudo de componentes das vias de biossíntese e inserção de selenocisteína em *Naegleria gruberi*: Selenofosfato Sintetase e tRNASec / Thomás Michelena Santos; orientador Otavio Henrique Thiemann -- São Carlos, 2017.
84 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. *Naegleria gruberi*. 2. Selenofosfato Sintetase. 3. tRNASec. I. Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thomás Michelena Santos

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 01/02/2018

Comissão Julgadora

Dr(a). Otavio Henrique Thiemann

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Regina Maria Barretto Cicarelli

Instituição: (UNESP/Araraquara)

Dr(a). Fernanda de Freitas Anibal

Instituição: (UFSCar/São Carlos)

RESUMO

SANTOS, T. M. **Estudo de componentes das vias de biossíntese e inserção de selenocisteína em *Naegleria gruberi***. Selenofosfato Sintetase e tRNA^{Sec}. 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

O vigésimo primeiro aminoácido, selenocisteína (Sec), representa a principal forma biológica disponível de selênio, micronutriente essencial. A Sec possui vias de síntese distintas para bactérias, arqueobactérias e eucariotos, justificando estudos que avaliem sua particular consequência evolutiva. *Naegleria gruberi*, alvo do presente estudo, é um organismo modelo bastante interessante para compreensão das vias de síntese e incorporação do aminoácido em um dos três domínios da vida, por tratar-se de um eucarioto basal. A presença da via de biossíntese e incorporação de selenocisteína em *N. gruberi* foi descrita. Dentre os genes identificados, destaca-se uma Selenofosfato Sintetase ou SPS. A SPS possui um papel central na via de biossíntese de Sec, estando envolvida na catálise da conversão de seleneto e adenosina 5'-trifosfato (ATP) em selenofosfato, forma orgânica de selênio. A SPS de *N. gruberi* apresenta dois domínios distintos: o domínio C-terminal, que possui identidade com SPSs de bactérias (SelD) e o domínio N-terminal, similar a metiltransferases de eucariotos. Além disso, foi identificado no protozoário um análogo ao gene SelC de procariotos, responsável pela expressão de tRNA^{Sec}. SelC promove a inserção da selenocisteína em selenoproteínas no códon UGA, que na maioria das vezes é interpretado como códon de parada de tradução em mRNAs. Além deste, dados experimentais apontam para a existência de outro tRNA traduzindo o códon UGA, sugerindo duas possíveis hipóteses: trata-se de um tRNA^{Sec} adicional para incorporação de Sec, ou de um tRNA carreador de outro aminoácido, com a capacidade de reconhecer o mesmo códon. Este estudo realizou a expressão e purificação do domínio N-terminal da proteína SPS de *Naegleria gruberi* e procurou realizar estudos imunoquímicos com a proteína a partir da produção de anticorpos policlonais. Além disso, foram realizados o isolamento e purificação das duas diferentes isoformas de tRNA^{Sec} identificadas no organismo a partir de ferramentas de bioinformática. Por último, foi dado início à uma investigação para determinar genes de referência para a realização de experimentos

de qPCR em *N. gruberi*. Estes resultados contribuem para o entendimento da via de biossíntese de Sec em eucariotos e sua importância para o metabolismo celular.

Palavras-chave: *Naegleria gruberi*. Selenofosfato Sintetase. tRNA^{Sec}.

ABSTRACT

SANTOS, T. M. **A study of components of the selenocysteine's biosynthesis and insertion pathways in *Naegleria gruberi***: Selenophosphate Synthetase and tRNA^{Sec}. 2017. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

The twenty-first amino acid, selenocysteine (Sec), represents the main biologically available form of selenium, an essential micronutrient, and shows different synthesis pathways for bacteria, archeobacteria and eukaryotes, justifying new studies to evaluate its particular evolutionary consequence. *Naegleria gruberi* is an extremely interesting model organism for the comprehension of the amino acid's synthesis and incorporation pathways in one of the three domains of life, due to its position in the evolutionary scale as a basal eukaryote. The presence of the selenocysteine's biosynthesis and insertion pathways in *N. gruberi* has been described. Amongst the identified genes, a Selenophosphate Synthetase or SPS has a central role. SPS acts on the biosynthesis of Sec, catalyzing the conversion of selenide and adenosine 5'-triphosphate (ATP) into selenophosphate, an organic form of selenium. *N. gruberi*'s SPS shows two distinct domains: a C-terminal domain having identity with bacterial SPSs (SelD) and a N-terminal domain, similar to eukaryotic methyltransferases. Besides that, an analogous to the SelC gene of prokaryotes was identified in the protozoan. SelC promotes the insertion of selenocysteine in selenoproteins on the UGA codon, a codon which is most of the time interpreted as a stop codon in mRNAs. Experimental data show evidence for the existence of yet another tRNA translating the UGA codon, suggesting two possible hypotheses: this tRNA is either the carrier of another amino acid with the capacity of recognizing the same codon, or an additional tRNA for Sec incorporation with different characteristics. The experiments performed for this study were able to heterologously express and purify the N-terminal domain of *Naegleria gruberi*'s SPS and pursued to characterize the protein through immunoassays using polyclonal antibodies. More experiments were run to isolate and purify the two different isoforms of tRNA identified in the organism using bioinformatics tools. Finally, an investigation was started aiming at determining reference genes for qPCR experiments with *N. gruberi*. These results contribute to a better understanding of the Sec's biosynthesis and insertion pathways in eukaryotes and their importance for the cellular metabolism.

Keywords: *Naegleria gruberi*. Selenofosfato Sintetase. tRNA^{Sec}.

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	Naegleria gruberi.....	11
1.2	O selênio e sua importância biológica: Selenocisteína	12
1.3	Biossíntese de Selenocisteína	14
1.3.1.	Biossíntese em Eubactérias.....	15
1.3.2.	Biossíntese em Eucaritos e Arqueobactérias	16
1.4	Biossíntese e inserção de selenocisteína em <i>N. Gruberi</i> : análise in silico.....	18
1.5.	Selenofostato sintetase / SPS2 / Seld	18
1.5.1.	Fusões de selenofostato sintetases.....	21
1.5.2.	Selenofostato sintetase de <i>N. gruberi</i>	22
1.6.	tRNA ^{Sec}	23
2	Objetivos	29
3	Materiais e métodos	31
3.1	Cultivo de Naegleria gruberi.....	31
3.1.1.	Cultivo de células	31
3.1.2	Obtenção de extratos proteicos.....	33
3.2	SPS2 – Biologia molecular	33
3.2.1	Amplificação da região de interesse e clonagem no vetor de clonagem	33
3.2.2	Subclonagem nos vetores de expressão	35
3.2.3	Testes de Expressão	37
3.2.4	Testes de solubilidade	38
3.2.5	Expressão e lise de NgSPS2-NTD	40
3.2.6	Purificação por cromatografia de afinidade.....	40
3.3	NgSPS2-NTD – Imunoensaios.....	41
3.3.1	Produção de anticorpos policlonais – antiSPS2.NTD	41
3.3.2	Western blot.....	42
3.3.3	Imunofluorescência.....	44
3.4	tRNAs	46
3.4.1	Extração de RNA total	46
3.4.2	Isolamento e purificação das moléculas de tRNA.....	47
3.5	qPCR (PCR quantitativo) – determinação de genes de referência para estudos em <i>Naegleria gruberi</i>	49

3.5.1 Escolha dos candidatos	49
3.5.2 Preparo das amostras para os experimentos de qPCR	51
3.5.3 Experimentos para determinação da eficiência dos primers.....	51
4 Resultados e Discussões	53
4.1 Cultivo de <i>Naegleria gruberi</i>	53
4.2 Experimentos com <i>NgSPS2</i> -NTD	54
4.2.1 Clonagem de <i>NgSPS2</i> -NTD em <i>E. Coli</i>	54
4.2.2. Testes de expressão de <i>NgSPS2</i> -NTD	56
4.2.3 Testes de solubilidade de <i>NgSPS2</i> -NTD.....	58
4.2.4 Purificação da proteína por cromatografia de afinidade	63
4.2.5 Preparação da amostra para produção dos anticorpos policlonais.....	64
4.2.6 Titulação dos anticorpos policlonais	65
4.2.7 Imunofluorescência.....	69
4.3 Experimentos com tRNAs	71
4.3.1 Isolamento e purificação	71
4.4 qPCR – PCR quantitativo.....	74
5 Conclusões.....	77
6 Perspectivas.....	79
Referências	81

1 Introdução

1.1 *Naegleria gruberi*

O organismo utilizado como base para este estudo foi o protozoário de vida livre *Naegleria gruberi*. Membros do gênero *Naegleria* são ameboflagelados de água doce presentes em todos os continentes sendo encontrados em amostras de lama, solo, água de rios, lagos e pântanos onde ocupam ambientes ricos em matéria orgânica. (1-2) Dentre os membros do gênero, o mais notório é a espécie termofílica *N. Fowleri*, por ser patogênica e infectar seres humanos causando uma doença conhecida como Meningoencefalite Amebiana Primária (PAM), fatal em até 95% dos casos. (1) Os casos de PAM estão relacionados à natação em águas contaminadas, onde o patógeno infecta o cérebro do hospedeiro através das vias aéreas (2), à inalação de cistos durante tempestades de poeira (3) e ainda à diversos outros fatores de risco aparentemente inócuos, tais como a irrigação nasal para alívio da congestão. (4) O estudo do metabolismo de *N. gruberi* mostra-se, então, muito interessante pela grande semelhança genética que a espécie apresenta com a *N. fowleri*, servindo como um modelo de estudo não patogênico.

N. gruberi pertence a um grupo de protistas chamado Heterolobosea, uma linhagem eucariótica que, juntamente às Euglenozoa (que incluem tripanossomatídeos parasíticos) e os flagelados de Jakobid, formam o antigo e ecologicamente diverso grupo dos Jakobid-Euglenozoa-Heterolobosea (JEH). (5) Sua forma predominante é a amebóide com cerca de 15µm de diâmetro e são capazes de se reproduzir a cada 1,6 horas, alimentando-se de bactérias. Além disso, a *N. gruberi* é também bastante conhecida por sua capacidade de assumir uma forma flagelada através de um processo rápido quando em condições de estresse, tais quais ambientes desfavoráveis ou pouca disponibilidade de nutrientes. O processo leva cerca de 1,5 horas e depende da reorganização de seus microtúbulos e do citoesqueleto. Ao assumir temporariamente a forma flagelada, sua maquinaria celular se redireciona e o protozoário deixa de se reproduzir e de se alimentar, concentrando-se na dispersão e na busca por ambientes mais favoráveis. (6) Além disso, em casos extremos, o protozoário pode assumir a forma de cistos e permanecer neste estado até que o ambiente volte a um estado favorável à sua

sobrevivência. (7) As três formas de vida assumidas pelo protozoário podem ser observadas na Figura 1.

A partir da finalização do sequenciamento do genoma da cepa NEG-M (ATCC 30224) de *N. gruberi* (8) foi possível dar início ao desenvolvimento de estudos mais aprofundados para melhor compreensão de seus processos metabólicos. Por se tratar de um eucarioto primitivo, o entendimento do funcionamento de vias metabólicas específicas neste organismo pode ser útil para levar a uma compreensão mais abrangente do funcionamento de tais vias em eucariotos superiores. (5) As vias de síntese de selenocisteína (Sec) e sua inserção em selenoproteínas são exemplos. O conjunto de enzimas e outros fatores que regulam os processos das vias metabólicas citadas em *N. gruberi* tem sido bem estudado e alguns de seus componentes já foram identificados e têm sido caracterizados. (9) Porém, os mecanismos de reação ainda não são inteiramente compreendidos e, portanto, fazem-se necessários estudos ulteriores que ajudem a elucidá-los.

Figura 1 - As três formas de vida assumidas pelo protozoário *N. gruberi*.
Fonte: Adaptada de FRITZ-LAYLIN et al. (8)

1.2 O selênio e sua importância biológica: Selenocisteína

O selênio (Se) é o elemento de número atômico 34, decoberto em 1817 pelo químico sueco Jacob Berzelius. É um micronutriente de fundamental importância para a saúde humana e um componente essencial de diversas vias metabólicas

principais incluindo o metabolismo de hormônios tireoidianos (T3 e T4) e o sistema de defesa antioxidante através da ação de selenoproteínas. (10) O ponto de entrada do selênio nos animais ocorre através dos vegetais, que absorvem o elemento do solo em sua forma inorgânica (selenito/selenato). Em uma escala global, a quantidade de selênio disponível nos solos varia de acordo com a região. Baixas quantidades de selênio são especialmente observadas em regiões vulcânicas e em regiões de “solo ácido”. (13-14) Os efeitos do selênio no organismo são diretamente dependentes da concentração, podendo o elemento exercer sua função característica de antioxidante quando em baixas concentrações (nM – μ M) ou tornar-se potencialmente prooxidante quando em concentrações acima das necessárias para a máxima síntese de selenoproteínas. (13) Existem indícios de que o consumo diário da quantidade recomendada de selênio pode ser benéfico na prevenção de algumas formas de câncer e pode ser inclusive utilizado como adjuvante no tratamento de infecções bacterianas (como a gripe, por exemplo). Seu consumo em excesso já foi relacionado também ao aumento de índices de diabetes tipo 2. (15-17) O consumo recomendado de selênio para adultos saudáveis gira em torno dos 55 μ g por dia pois, quando em quantidades muito maiores (equivalentes ao consumo de 400 μ g/dia), compostos de selênio podem acumular-se e realizar ciclos redox com tiois intracelulares, causando estresse oxidativo e danificando componentes celulares, tendo efeitos tóxicos para o organismo. (13)

Ao contrário de elementos metálicos, que interagem com proteínas na forma de cofatores, o selênio é incorporado em polipeptídeos durante o processo de tradução na forma do aminoácido selenocisteína. (15) Em sistemas biológicos, a selenocisteína, vista como uma análoga da cisteína, é provavelmente a forma mais biologicamente ativa de selênio. A diferença entre os dois aminoácidos é que, a pH fisiológico, o grupo selenol da selenocisteína existe em sua forma ionizada e mais reativa enquanto o grupo tiol da cisteína encontra-se protonado e menos reativo. (16) Acredita-se que esta diferença seja responsável pelo fato de os compostos de selênio serem antioxidantes mais potentes e serem agentes mais efetivos na prevenção de algumas formas de câncer do que seus análogos com enxofre. (20-21) Grande parte do papel fisiológico realizado pelo selênio é atribuído diretamente à sua presença em selenoproteínas.

Figura 2 - Aminoácidos análogos: cisteína e selenocisteína, com apenas um átomo de diferença na cadeia lateral e propriedades físico químicas bastante diversificadas.

Fonte: Adaptada de NELSON. (47)

1.3 Biosíntese de Selenocisteína

A síntese de selenocisteína e sua incorporação em proteínas é realizada de maneira bastante diversa a dos 20 aminoácidos canônicos. Um dos aspectos que mais chamam a atenção na incorporação de selenocisteína em proteínas é o compartilhamento do seu códon de inserção UGA com um dos códons responsáveis por sinalizar a finalização do processo de tradução (os outros dois sendo: UAA e UAG). (15) Essa degeneração do códon é identificada e tratada de maneira pertinente através da presença de elementos estruturais do mRNA conservados evolutivamente e fatores proteicos dedicados à decodificação do códon UGA como selenocisteína. (15) Além disso, não existem reservas de selenocisteína livre no organismo, visto que o aminoácido é sintetizado diretamente ligado ao seu tRNA. (19) Mais curioso ainda, não existe uma “selenocisteinil-tRNA sintetase” pois o tRNA^{Sec}, como é conhecido o tRNA responsável pela inserção da selenocisteína em cadeias crescentes de polipeptídeos, é primeiramente carregado com um resíduo de serina para que posteriormente uma outra enzima catalise a transformação de serina em selenocisteína. Ou seja, a reação se dá com o substrato ligado ao tRNA. (19) O processo todo ainda depende criticamente de uma sequência de aproximadamente 40 nucleotídeos presente no RNA mensageiro que cria uma estrutura secundária em forma de alça, denominada Selenocystein Insertion Sequence (sequência para inserção de selenocisteína ou SECIS da sigla em inglês). (20) Tal estrutura possibilita a interpretação do códon UGA como sinal de inserção de selenocisteína e não como códon de parada de tradução, além de contar com o auxílio de fatores de tradução acoplados à mesma e ao ribossomo. (20)

A síntese de selenoproteínas, em sua totalidade, é um processo conservado evolutivamente. Apesar disso, algumas diferenças são observadas nos mecanismos de síntese ao compararmos procariotos, eucariotos e arqueobactérias. (21) Os

elementos comuns a todos os organismos são os já citados: códon UGA, a presença de tRNAs específicos à incorporação de Sec, elementos SECIS em regiões específicas e alguns fatores proteicos próprios a cada via. (21)

Antes de discutir as peculiaridade inerentes aos processos de biossíntese de selenocisteína nos diferentes domínios da vida, convém salientar que, apesar dos processos serem bastante semelhantes, as diferentes nomenclaturas adotadas para os seus componentes podem causar certa confusão. Enquanto ao descrever o processo em eubactérias costuma-se referir-se aos componentes principais da via utilizando o nome do gene que o codifica (SelC, SelD...), quando descreve-se o processo para eucariotos ou arqueobactérias a literatura tem preferência por endereçar cada componente utilizando seu nome completo (tRNA^{Sec}, selenofosfato sintetase...).

1.3.1. Biossíntese em Eubactérias

A biossíntese de selenocisteína em eubactérias foi bem estudada e caracterizada em *Escherichia coli* (*E. coli*). O mecanismo de reação está descrito a seguir na Figura 3 para facilitar o entendimento. A via é inteiramente dependente do produto dos genes selA, selB, selC e selD. (22) (23) O processo se inicia através da ação da enzima **seril-tRNA sintetase** (SerRS), que carrega o tRNA^{Sec} (produto do gene selC) com uma serina. (21) Em seguida, a enzima **selenocisteína sintase** (produto do gene selA), que é dependente de piridoxal fosfato, interage com o seril-tRNA^{[Ser]Sec} formado, removendo o hidroxil do grupo seril e gerando um intermediário aminoacrilil. (21) Monoselenofosfato é sintetizado a partir de seleneto e ATP graças à enzima **selenofosfato sintetase** (SPS, produto do gene selD) e reage com o intermediário aminoacrilil com o auxílio da enzima **selenocisteína sintase** (produto do gene selA) formando o selenocisteil-tRNA^{Sec}, agora carregado com selenocisteína. (21) Outra enzima, conhecida como EFSec (produto do gene selB) liga-se ao elemento SECIS do mRNA e atua como um fator de alongação. (21) SelB permite que selenocisteil-tRNA^{Sec} seja posicionado no centro A do ribossomo pareando com o códon UGA e permite a incorporação de selenocisteína no polipeptídeo crescente. A relação entre o fator de alongação EFSec e o SECIS ainda

não é clara. Entretanto, foi identificado o intermediário entre SECIS e eEFSec como sendo a proteína SECIS Binding Protein 2, SBP2. Estudos *in vivo* revelaram, que a relação entre SBP2 e EFSec é favorecida pela ação da proteína Secp43. (27-28)

Figura 3 - Mecanismo de síntese e inserção de selenocisteína em eubactérias, explicitando os produtos dos genes SelA, B, C e D e apresentando os principais elementos que tornam única esta via, como o códon de reconhecimento (UGA) e o elemento SECIS.

Fonte: Adaptada de STOCK; ROTHER. (26)

1.3.2. Biossíntese em Eucaritos e Arqueobactérias

A biossíntese de selenocisteína em eucariotos e arqueobactérias procede de maneira bastante similar às eubactérias, exceto pelo surgimento de um intermediário não presente na reação descrita anteriormente. Todo o mecanismo de reação descrito a seguir está detalhado na Figura 4 para facilitar o entendimento. O processo tem início com a enzima **seril-tRNA sintetase** (SerRS) carregando o tRNA^{Sec} com um resíduo de serina. A partir daí, este resíduo de aminoácido é fosforilado, formando o intermediário em questão, **fosfoseril-tRNA^{Sec}** (Sep-tRNA^{Sec}), produzido pela ação da **fosfoseril-tRNA^{Sec} quinase** (PSTK) sobre o seril-tRNA^{Sec}.

Na sequência, a enzima **selenofosfato-tRNA^{Sec} sintetase** (SepSecS) catalisa a produção do selenocisteil-tRNA^{Sec} a partir do fosfoseril-tRNA^{Sec} e do monoselenofosfato (forma ativa do selênio) cuja obtenção é intermediada pela selenofosfato sintetase, isoforma 2 (SPS2, análoga à SelD de eubactérias) a partir de ATP e seleneto. (20) O processo continua da mesma maneira como foi anteriormente descrito para eubactérias com exceção da ausência de SBP2 na via de inserção de selenocisteína em arqueobactérias.

Outras diferenças marcantes nas vias de inserção se devem à estrutura dos tRNAs^{Sec} e à posição da SECIS nos respectivos mRNAs. O tRNA^{Sec} de eucariotos e arqueas apresenta algumas diferenças na estrutura secundária quando comparado ao presente em eubactérias, como a largura dos braços e a região do anticódon, e estas serão detalhadas mais adiante. No caso do SECIS, em eubactérias a sequência encontra-se localizada em posição adjacente ao códon UGA no mRNA, enquanto em eucariotos e arqueas a sequência encontra-se na região 3' não traduzida, no final do mRNA (3' UTR). (15)

Figura 4 - Esquema simplificado do mecanismo de síntese e inserção de selenocisteína em eucariotos mostrando o intermediário fosfoseril (Sep-tRNA^{Sec}) não observado na mesma via para eubactérias.

Fonte: Adaptada de SCHMIDT; SIMONOVIC. (20)

1.4 Biossíntese e inserção de selenocisteína em *N. Gruberi*: análise *in silico*

Toda a maquinaria proteica necessária para a biossíntese e inserção de selenocisteína foi identificada em *N. Gruberi* após a publicação de seu genoma completo. (9) Utilizando sequências já conhecidas das proteínas SBP, SepSecS, EFSec, SelD/SPS2, PSTK, sequências de selenoproteínas também conhecidas e o software tRNAscan-SE, análises computacionais foram capazes de reconhecê-las no genoma de *N. gruberi*, além de identificar uma provável selenoproteína homóloga a tioredoxina redutase 3 de procariotos. (9) Foi comprovado por RT-PCR e sequenciamento dos fragmentos amplificados que todos os genes identificados através das ferramentas de bioinformática são, de fato, transcritos, evidenciando a presença da via no eucarioto. (9)

Outra análise *in silico* fez a comparação das sequências das enzimas identificadas em *N. gruberi* com as de outros organismos e mostrou que sua conservação é bastante variável. (9) Como exemplo, a SepSecS e a SelB de *N. gruberi* exibem 45% e 36% de identidade nos aminoácidos com as mesmas proteínas de *Dictyostelium discoideum* (gi 45358158) e 38% e 36% de identidade com suas ortólogas humanas, respectivamente. (9)

1.5 Selenofostato sintetase / SPS2 / SelD

Como já mencionado anteriormente, a selenofostato sintetase (SPS) é a enzima responsável pela síntese do selenofostato a partir de seleneto e ATP. Selenofostato é o composto reativo doador de selênio na via de síntese da selenocisteína. (27) Animais, incluindo humanos, possuem duas SPS homólogas (SPS1 e SPS2). SPSs do tipo 2 são aquelas que contêm cisteína ou selenocisteína como resíduo catalítico, enquanto as SPSs 1 tiveram estes resíduos substituídos por outro aminoácido durante seu processo de evolução (geralmente substituídos por treonina ou arginina). Um fato bastante interessante é que algumas SPS de bactérias, todas as SPS de arqueas e as SPS2 de mamíferos são elas próprias

selenoproteínas, nas quais um importante resíduo catalítico de cisteína na região N-terminal foi substituído por selenocisteína. (28) Isso indica a possibilidade da SPS2 exercer um papel auto-regulador na síntese de selenoproteínas.

Até o momento foram determinadas as estruturas tridimensionais das proteínas SPS de *E. coli* (27), a SPS1 humana (29), selenofosfato sintetases de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* (30) e *Aquifex aeolicus*. (31) Estudos de atividade catalítica da Selenofosfato Sintetase já foram conduzidos em *Haemophilus influenzae* (32), *T. brucei*, *L. major* (33), *A. aeolicus* (31) e SPS1 humana. (29)

No geral, a estrutura comum das SPS consiste em um enovelamento misto α/β , típico dos membros da superfamília de proteínas PurM. Elas são formadas por dois domínios N e C terminal, ligados por uma cadeia peptídica simples. (31) Os dois domínios se associam para formar o sítio catalítico, que se esconde no interior de um canal longo e estreito que corre todo o comprimento da molécula e é flanqueado pela região N terminal da proteína, rica em glicina. (27) Duas unidades de SPS interagem entre si na unidade assimétrica através dos domínios N terminal para formar um dímero. Quatro fitas da folha β do domínio N terminal de uma unidade interagem com outras 4 fitas da outra unidade para formar um barril β , resultando na dimerização característica da superfamília PurM. (31)

Estudos de mutação sítio dirigida realizados em SPS de *E. coli* e de *A. aeolicus* conseguiram determinar a importância de certos resíduos em experimentos de consumo de ATP quando em presença de seleneto. Eles apontam para uma grande importância catalítica de 2 resíduos localizados na região N terminal da proteína (região de alta liberdade conformacional): um resíduo de cisteína e outro de lisina. (29,33)

Figura 5 - Estrutura dimérica de SPS de *A. aeolicus* (esquerda) e *E. coli* (direita).
 Fonte: Adaptada de NOINAJ et al.(27); MATSUMOTO et al. (31)

O sítio de ligação do ATP foi bem caracterizado na SPS de *A. aeolicus*. Quando a proteína foi cristalizada sem nenhum ligante (apo-SPS) as duas regiões de loop no sítio de ligação do ATP, na região N terminal flexível, não encontram-se de maneira ordenada e nenhum metal associado a enzima pode ser observado. Quando a SPS foi cristalizada em complexo com adenosina 5'-α,β-metileno trifosfato (AMPCPP), a estrutura revelou que quatro resíduos de aspartato e um de histidina formam os sítios de ligação para os grupos fosfato do ATP, onde quatro íons metálicos medeiam as interações (Mg^{2+} in vivo, e K^+ também no caso de *E. coli*). Estes resultados indicam que a ligação do ATP ao sítio, a ligação dos íons metálicos e a formação de seus sítios de ligação são processos interdependentes. Além disso, foi verificado que o loop N terminal, que inclui os resíduos cataliticamente ativos de cisteína e lisina, assume duas conformações diferentes entre as duas subunidades da SPS, uma “aberta” e outra “fechada.” (27) Estudos posteriores ainda indicam que somente a ligação dos cofatores metálicos não é suficiente para provocar a mudança de estado conformacional e que a ligação do substrato é a verdadeira responsável, mas que os cofatores contribuem para diminuir a flexibilidade e desordenação da região N terminal quando livre. (34)

Um mecanismo de reação foi proposto para a SPS de *E. coli*. (27) A partir da ligação do ATP, a região N-terminal sofre uma mudança conformacional que traz o resíduo catalítico de cisteína para mais perto do sítio catalítico. O seleneto se liga a cisteína através de uma ligação selênio-enxofre que, por sua vez, forma o

selenofosfato juntamente com o fosfato γ do ATP. (35) (29) Acredita-se que a ordem de ligação dos substratos comece pelo seleneto e que o ATP venha na sequência. Além disso, propõe-se que exista uma proteína que entregue o seleneto diretamente a SPS, visto que o valor de K_m para o seleneto é bem acima da concentração ótima requerida para o crescimento celular, chegando a assumir valores tóxicos. (36) Algumas proteínas do tipo NifS de *E. coli*, como CsdB, CSD, e IscS mostraram a capacidade de entregar selênio a SPS para a síntese de selenofosfato. (36) Além disso, Wang et al. propuseram que o selenofosfato permanece protegido no interior da cavidade do sítio ativo a hidrólise do ADP e que a energia provinda dessa hidrólise é utilizada para induzir a liberação dos produtos da reação: o selenofosfato, o ortofosfato e o AMP. (29)

Figura 6 - Mecanismo de reação proposto para a SPS de *E. coli*, evidenciando as duas conformações assumidas pela proteína: aberta e fechada.

Fonte: Adaptada de NOINAJ et al. (27).

1.5.1. Fusões de selenofosfato sintetases

Um estudo realizado por Guigó R. et al (37) utilizou ferramentas de bioinformática (38) para analisar um grande conjunto de genomas (505 eucarióticos

e 8263 procarióticos) em busca de traços que indicassem a relação entre a existência de genes para tradução de SPS com a utilização de selenoproteínas pelo organismo em questão. Para eucariotos, a correlação entre a presença de SPS2 e a expressão de selenoproteínas é de 100%, enquanto para procariotos a percentagem é mais reduzida (93%) tendo em vista que alguns deles utilizam a selenofosfato sintetase na via de síntese de selenouridina. (37)

Um outro fato investigado pelo estudo foi o da existência de fusões de genes de SPS2 com outros genes. Alguns estudos prévios já haviam demonstrado a ocorrência de tais fusões em alguns organismos (39) (9) porém, ao submeter o grande conjunto de dados genômicos disponíveis ao software Selenoprofiles, os resultados foram surpreendentes. Verificou-se que, entre os procariotos, a maioria dos genes contendo tais fusões possuem domínios relacionados à NADH desidrogenase como extensão, enquanto dois casos possuem domínios relacionados à proteínas do tipo NiFS. Além disso, todos os casos de fusão/extensão ocorrem no domínio N terminal da proteína e encontram-se bem espalhados pela árvore evolutiva. No caso dos eucariotos, as fusões mais frequentes são também com domínios relacionados à NADH desidrogenase e proteínas do tipo NiFS. Porém neste caso, as fusões não se restringem somente ao domínio N terminal da proteína e não foi verificada a existência de nenhuma fusão convincente em eucariotos não-protistas. (37)

1.5.2. Selenofostato sintetase de *N. gruberi*

A estrutura da SPS de *N. gruberi* apresenta suas singularidades. Com 737 aminoácidos, ela é maior do que as sequências de SelD e SPS homólogas já identificadas previamente. O domínio C terminal (aminoácidos 390 – 737) apresenta identidade sequencial com domínios de SelD/SPS2 de bactérias e eucariotos, sendo mais proximamente relacionada com os homólogos bacterianos. O domínio N terminal apresenta identidade de sequência primária com metiltransferases eucarióticas, uma característica bastante diversa das outras SPSs estudadas até o momento. No estudo citado na seção 1.5.1, a SPS de *N. gruberi* foi a única a apresentar este tipo específico de fusão. Experimentos realizados com *E. coli*,

transformadas com vetores de expressão contendo somente o domínio metiltransferase revelaram que este domínio confere uma resistência parcial a altas concentrações de selênio no meio. (9) A função específica do domínio metiltransferase na região N terminal da SPS de *N. gruberi* ainda não é bem entendido, porém tais enzimas são conhecidas por sua capacidade de ligar-se à S-adenosilmetionina e por estarem envolvidas em processos de detoxificação celular. (40) É possível que os dois domínios da proteína atuem de maneira independente, sendo o domínio C terminal responsável pela síntese de selenofosfato e o domínio metiltransferase responsável pela detoxificação de selênio. A fusão destes dois domínios em uma única proteína, como observado na figura 7, sugere um efeito sinérgico que pode ser vantajoso para um organismo de vida livre, que encara ambientes adversos constantemente. (9)

Figura 7 - Dois domínios identificados na proteína SPS. O primeiro, em laranja, representa a conservação de um domínio característico de metiltransferases, enquanto que o segundo subdivide-se em outros dois que representam a família AIR (PurM), da qual SPS é integrante. Em rosa, a região de baixa complexidade estrutural existente entre os domínios.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.6. tRNA^{Sec}

tRNAs responsáveis pela inserção de selenocisteína possuem algumas características ímpares se comparados aos tRNAs de elongação responsáveis pela inserção dos aminoácidos canônicos. Em primeiro lugar, os primeiros são consideravelmente maiores que a maioria dos outros tRNAs, tendo em média 20pb a mais. Isto se deve, em grande parte, à presença de um braço variável e de uma haste aceptora mais longos em todos os tRNAs^{Sec} (41).

Figura 8 - Estrutura secundária geral de uma molécula de tRNA (A) e comparação das diferenças sutis nas estruturas de diferentes tipos de tRNA (B): os canônicos de classe I e II e os tRNAs^{Sec} responsáveis pela inserção de selenocisteína em selenoproteínas.

Fonte: Adaptada de COMMANS; BÖCK. (41).

A estrutura secundária dos tRNAs canônicos compreende uma haste aceptora (ou braço acceptor) de 7pb (pares de base), uma haste T com 5pb (estrutura conhecida como 7/5), uma haste D de 3 ou 4pb e a haste do anticódon com 5pb. Tanto o loop do anticódon quanto o loop da haste T possuem 7 nucleotídeos, enquanto o loop D normalmente tem entre 8 e 10 nucleotídeos. Finalmente, o comprimento das regiões variáveis distinguem duas famílias de tRNAs de elongação canônicos, os da classe I, com sequências variáveis de 4 ou 5 nucleotídeos apenas, e os da classe II, cuja região variável compreende de 10 a 24 nucleotídeos, como mostra a Figura 8. (41)

Em contraste com os tRNAs canônicos, a sequência primária dos tRNAs de inserção de selenocisteína de eubactérias já é bastante diferente, e nucleotídeos que são amplamente conservados nas estruturas daqueles, não são necessariamente conservados nestes. Porém, as maiores diferenças encontram-se na estrutura secundária, como pode ser observado na Figura 8. A haste aceptora possui 8pb (estrutura 8/5) e a haste D possui 6pb, o que reduz o loop D para somente 4 nucleotídeos. (41)

O sequenciamento de tRNAs de inserção de selenocisteína de eucariotos apontou para diferenças maiores ainda. A haste aceptora possui 2pb a mais que a estrutura canônica, somando 9pb. Em decorrência disso, a haste T é reduzida para

somente 4pb (estrutura 9/4, Figura 9). Assim como para as eubactérias, a haste D possui 6pb e é arrematada pelo loop D de apenas 4pb. (42)

Figura 9 – Árvore filogenética demonstrando a evolução da estrutura secundária dos tRNAsSec e comparando as estruturas adotadas pelos três domínios de seres vivos.

Fonte: Adaptada de HUBERT et al. (42)

O tRNA^{Sec} de *N. gruberi* se assemelha bastante à estrutura geral descrita para os tRNAs de inserção de selenocisteína de eucariotos. Ele possui aproximadamente 90 nucleotídeos contendo 9 pares de base (pb) no braço acceptor e 4 pb no braço T (estrutura 9/4), além de uma diferença na região do anticódon, onde se encontra presente o nucleotídeo modificado 5-metilaminometil-2-selenouridina. (43) Recentemente, foi identificado um segundo candidato a tRNA^{Sec} em *N. gruberi* ao submeter seu genoma a análises computacionais utilizando o software tRNA-scanSE. Este tRNA também possui o anticódon UCA porém é um pouco mais curto, apenas 71pb e, ao ter sua estrutura secundária simulada ele se apresenta em formato 7/5, condizente com a estrutura dos tRNAs de inserção de aminoácidos canônicos.

Estudos recentes (46-47) sobre a degenerescência do código genético mostram que a maioria destes eventos tende a ocorrer relacionado aos códons de parada de tradução passando a traduzir algum aminoácido. Nas eubactérias, foram identificados diversos casos do códon de parada de tradução UGA sendo utilizado como códon de tradução para triptofano e alguns poucos casos onde este códon

traduz para glicina, como mostra a Figura 10. Já entre os eucariotos, foram identificados ciliados que utilizam o códon UGA para tradução de cisteína ou triptofano e, mais próximos evolutivamente aos membros da espécie *Naegleria*, foram identificados membros da classe Kinetoplastida também utilizando o códon UGA para tradução de triptofano.

Figura 10 - Árvore filogenética mostrando as variações conhecidas no código genético nos três domínios da vida.

Fonte: Adaptada de KEELING. (44)

Os resultados experimentais aliados às outras informações disponíveis na literatura aqui citados possibilita levantar as seguintes hipóteses para a utilização do segundo tRNA de anticódon UGA identificado em *N. gruberi*: existe realmente um segundo tRNA responsável pela inserção de selenocisteína em *N. gruberi*, com características estruturais diversas àquelas já identificados em eucariotos, ou ele carrega um outro aminoácido que também é inserido em uma cadeia polipeptídica através do reconhecimento do códon UGA, normalmente atuante como códon de parada ou códon de inserção de Sec.

Figura 11 - Estruturas secundárias dos dois tRNAs tradutores do códon UGA em *N. gruberi* e a sequência do gene que os expressa.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2 Objetivos

O presente estudo tomou três frentes distintas e teve objetivos diferentes para cada uma de suas partes. A primeira parte diz respeito aos objetivos específicos relacionados ao estudo do domínio N-terminal da proteína selenofosfato sintetase de *Naegleria gruberi* (NgSPS2-NTD) e são eles:

- Expressão heteróloga do NgSPS2-NTD de *Naegleria gruberi* em *E. coli*;
- Purificação da proteína recombinante;
- Produção de anticorpos policlonais a partir da proteína recombinante purificada;
- Realização de ensaios imunoquímicos para identificação da proteína *in vivo*:
 - Imunofluorescência;
 - Western-blots comparativos para verificar a expressão dos diferentes domínios da proteína.

A segunda parte diz respeito aos objetivos estabelecidos para o estudo das diferentes moléculas de tRNA identificadas em *Naegleria gruberi*, e são eles:

- Isolamento e purificação de ambas as moléculas a partir do cultivo da ameba;
- Análise do aminoácido carregado por cada uma das isoformas;
- Determinação da taxa relativa de expressão entre as duas isoformas.

A terceira parte aborda a tentativa de determinação de genes de referência para o estudo de variações de expressão gênica em *Naegleria gruberi* através de experimentos de qPCR. Os objetivos foram os seguintes:

- Análise da literatura e determinação de candidatos a genes de referência em *N. gruberi*;
- Determinação da eficiência de amplificação dos pares de primers sintetizados para os experimentos
- Determinação de possíveis genes de referência para experimentos de qPCR *N. gruberi* a partir dos candidatos escolhidos.

3 Materiais e métodos

3.1 Cultivo de *Naegleria gruberi*

3.1.1. Cultivo de células

A cepa de *Naegleria gruberi* Schardinger foi obtida durante o projeto de pós doutorado do Dr. Marco Túlio Alves da Silva. As células foram mantidas a 26°C para crescimento ideal em garrafas de 25cm² (para experimentos relacionados à NgSPS2-NTD) ou 75cm² (para experimentos relacionados aos tRNAs). As células cultivadas nas garrafas menores foram mantidas em 10ml de meio de cultura enquanto as cultivadas em garrafas maiores foram mantidas em 50ml. A diferença no tamanho das garrafas de cultivo se justificou pelo fato de quantidades diferentes de células serem necessárias para diferentes tipos de experimento, sendo que as necessidades para os experimentos relacionados aos tRNAs foram sempre maiores. O meio de cultivo utilizado foi o ATCC 1034, cuja composição está explicitada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de 1L do meio de cultura ATCC 1034

ATCC 1034 (1L)	
Substrato	Quantidade
Peptona	10g
Extrato de levedura	10g
DNA de espermatozóide de salmão	1g
Ácido fólico	15mg
Água destilada	880ml
Esterelizado em autoclave (120°C 20min)	
Tampão fosfato(*)	20ml
Hemina	1mg/ml
Filtração por membrana de acetato de celulose (0,22µm)	
Soro fetal bovino inativo	10%
Penicilina-Streptomicina	10ml
Ajustar para pH 6,5	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um experimento para o estabelecimento do padrão de crescimento das amebas foi feito realizando contagens de células a cada 12h e estabelecendo uma curva de crescimento para as células.

Após a determinação do padrão de crescimento das células, elas foram sempre mantidas em cultivo até atingirem o final da fase log (ou exponencial) de crescimento, quando então foram coletadas para realização dos experimentos. O monitoramento do crescimento celular foi feito através da contagem de células utilizando a câmara de Neubauer que possibilita a aferição da concentração de células na garrafa (N em cél/ml) sabendo-se o fator de diluição da gota medida na câmara (F_D), o fator de correção da câmara de Neubauer (F_C) e a contagem média de células nos quatro quadrantes externos da câmara (C), utilizando a seguinte fórmula:

$$N = F_C * F_D * C$$

3.1.2 Obtenção de extratos proteicos

Tabela 2 - composição da solução estoque do tampão de lise RIPA

RIPA 2x (Solução Estoque)
40mM Tris-HCl pH 7,5
300mM NaCl
2% NP40
0,2% SDS
Solução de uso (1X)
1X RIPA
1X cOmplete, livre de EDTA (ROCHE)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os extratos proteicos de *Naegleria gruberi* foram obtidos utilizando o tampão de lise RIPA, cuja composição esta explicitada na Tabela 2. As células foram desaderidas do fundo das garrafas de cultura e, com o auxílio da câmara de Neubauer para determinação da concentração, 1×10^6 células foram transferidas para um tubo falcon de 15ml. As células foram centrifugadas (1500 g, 10min, 26°C) e o pellet foi lavado duas vezes com 10ml de PBS (137mM NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 3mM KH₂PO₄, 3mM KCl, pH 7,4). Cada lavagem consistiu de um passo de ressuspensão do pellet seguido de centrifugação (1500 g, 5min, 26°C). Ao final, 1ml de RIPA foi acrescentado ao pellet para ressuspensão, resultando no extrato proteico final.

3.2 SPS2 – Biologia molecular

3.2.1 Amplificação da região de interesse e clonagem no vetor de clonagem

O processo de clonagem teve início a partir da amplificação da região de interesse do gene responsável pela expressão de SPS em *Naegleria gruberi*, por meio de uma PCR (Polymerase Chain Reaction). O DNA genômico da ameba foi extraído utilizando o kit comercial Dneasy Plant Mini Kit (QIAGEN), e um par de oligodesoxirribonucleotídeos (doravante chamados de primers) que flanqueiam a região de interesse foi utilizado para a realização da PCR. Os primers utilizados, bem como a região de interesse amplificada e os detalhes da PCR estão ilustrados na Figura 12.

Primers	Sequência
Sense	5' GCCATGGCAATGAATATTCCTCCACTGGGATTG 3'
Antisense	5' GAATTCTCATTAAAGCTCCTCCACCACATGG 3'

Temperatura	Tempo
95°C	5min
35 ciclos de:	
95°C	30s
59°C	30s
72°C	1,5min
72°C	10min
4°C	∞

Figura 12 - Sequência dos primers utilizados para amplificação da região N-terminal do gene responsável pela codificação da proteína SPS em *Naegleria gruberi*, juntamente com a ciclagem utilizada na PCR de amplificação e uma ilustração da região amplificada do gene.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A enzima utilizada para a PCR foi a Platinum Taq DNA Polimerase High Fidelity (Thermo Fisher Scientific) que fornece à sequência amplificada o chamado T-overhang: um nucleotídeo extra de timidina que é adicionado ao final de cada fita de DNA amplificado. O resultado da PCR foi aplicado em um gel de agarose 1%, a altura da banda do inserto foi verificada para confirmar que correspondia ao número de pares de base desejados, e a banda foi excisada do gel. O DNA foi extraído do gel de agarose utilizando o kit comercial Agarose Gel DNA Extraction Kit (Sigma-Aldrich).

O DNA purificado do gel foi então ligado ao vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy (Promega), criado especialmente para ligar insertos contendo o T-overhang. Para a ligação, utilizou-se a enzima T4 DNA ligase em uma reação de 10µl totais

contendo 5µl do tampão (2X Rapid Ligation Buffer, 1µl (50ng) do vetor, 150ng do inserto (razão 1:3 de vetor para inserto) e água para completar o volume da reação, que foi deixada por 1h a temperatura ambiente. Os 10µl de reação resultantes foram utilizados diretamente na reação de transformação em bactérias *E. Coli* da linhagem DH5α. Uma alíquota de 50µl de bactérias competentes foi retirada do freezer a -80°C e deixada descongelar gradativamente em um recipiente com gelo. Após descongelada a alíquota, o conteúdo da reação de ligação foi misturado à mesma e deixado no gelo por 10min. Foi dado um choque de temperatura na reação mergulhando o eppendorf em um banho maria a 42°C por 45s e voltando a reação ao gelo por mais 2min. Ao final deste processo, 1ml de meio LB foi adicionado à reação e as bactérias foram colocadas a 37°C por 45min para crescer. O eppendorf foi então centrifugado em uma centrífuga de eppendorf por 1min com rotação máxima (16000rpm) e o pellet foi ressuspensão em um volume menor de meio (150µl) dos quais 50µl foram utilizados para o plaqueamento. Às placas de petri com ágar sólido foram adicionado anteriormente 100µg/ml de ampicilina, 40µl de solução de X-Gal 20mg/ml (Thermo Fisher Scientific) e 40µl de solução de IPTG 100mM (Thermo Fisher Scientific). As placas de petri foram colocadas em uma estufa a 37°C onde as bactérias cresceram overnight e no dia seguinte foi possível realizar a seleção de colônias transformadas através da identificação azul/branco.

As colônias brancas selecionadas foram inoculadas em pré inóculos contendo 5ml de meio de cultura LB e deixadas crescer novamente overnight. No dia seguinte, 500µl de pré inóculo foram misturados à 500µl de glicerol 50% para criar o estoque glicerinado da bactéria que foi mantido a -80°C e utilizado para o restante dos experimentos.

3.2.2 Subclonagem nos vetores de expressão

Foram escolhidos dois vetores de expressão para testes iniciais: pET-28a e pET-32a. Pré inóculos de bactérias contendo ambos os plasmídeos além das bactérias contendo os plasmídeos clonados com o inserto de NgSPS2-NTD foram feitos em 5ml de meio de cultura LB. Os pré inóculos foram submetidos a reações de miniprep utilizando o kit comercial PureYield™ Plasmid Miniprep Kit (Promega) para

purificação do DNA plasmidial: 3 reações foram realizadas, uma para cada plasmídeo diferente. Os plasmídeos purificados foram então digeridos utilizando as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Thermo Scientific). O inserto foi separado do vetor de clonagem utilizando o mesmo princípio descrito na seção 3.2.1 para a purificação do produto da PCR: eletroforese em gel de agarose 1% seguido de excisão da banda de interesse e purificação do produto utilizando o kit comercial de purificação do gel.

Os passos seguintes também se assemelham muito aos descritos na seção 3.2.1. O inserto foi ligado aos vetores de expressão utilizando a mesma reação descrita na etapa anterior e os plasmídeos foram transformados em *E. Coli* de outras linhagens (BL21(DE3), BL21-CodonPlus, RosettaGami B(DE3)) também através da reação de transformação descrita anteriormente. As bactérias foram plaqueadas em meio contendo diferentes antibióticos específicos para cada linhagem de bactéria e para cada vetor de expressão, conforme mostra a Tabela 3. Os vetores de expressão não possuem o operon LacZ não permitindo portanto a seleção branco/azul de colônias transformadas. A seleção é feita então a partir de um screening básico de um determinado número de colônias utilizando um dentre os dois seguintes métodos: realizando PCRs diretamente no material proveniente da colônia com primers que amplificam o sítio múltiplo de clonagem do vetor de expressão e analisando o tamanho da sequência amplificada; ou fazendo miniprep para extração dos vetores de expressão das bactérias e realizando reações de digestão com enzimas de restrição específicas para ver se a banda com o tamanho esperado se separa do restante do plasmídeo, confirmando o resultado em um gel de agarose. As colônias que apresentaram resultado positivo em algum dos testes acima foram utilizadas para a criação de estoques glicerizados para serem utilizadas nos experimentos seguintes. Além disto, estes plasmídeos foram sequenciados para se ter certeza que conteúdo clonado em suas ORFs correspondia ao desejado.

Tabela 3 – Resistência à antibióticos apresentada por diferentes vetores de expressão e cepas de *E. coli*.

Vetores	Resistência
pET-28a	Kanamicina
pET-32a	Ampicilina
Cepas de <i>E. coli</i>	
BL21(DE3)	-
BL21-CodonPlus	Cloranfenicol
Rosetta-Gami B	Kanamicina, Cloranfenicol

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Biofísica do Insitituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo.

3.2.3 Testes de Expressão

Os testes de expressão foram realizados utilizando inóculos de 5ml de meio LB, foram conduzidos em duas diferentes temperaturas (20°C e 37°C) e com 4 concentrações diferentes de IPTG (0mM, 0,1mM, 0,5mM e 1mM). Foram inoculados 500µl de um pré inóculo crescido overnight em cada um dos tubos para o experimento e estes foram deixados em agitação constante a 37°C até que atingissem a D.O. (densidade óptica) de 0,6. A partir daí os tubos foram separados nas diferentes temperaturas e o IPTG foi adicionado a cada tubo na quantidade determinada. Uma alíquota inicial de 500µl foi retirada de cada tubo pré indução e alíquotas posteriores foram retiradas de duas em duas horas após a indução até atingir 8h. Foi coletada uma amostra extra após 16h de indução.

As amostras extraídas a cada etapa foram centrifugadas (16000 g, 1min), o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 50µl de tampão de amostra de gel SDS-PAGE 2X (65,5mM Tris/HCl, pH 6,8 com 10% glicerol, 5% (v/v) B-mercaptoetanol, 2% SDS e 0,001% de azul de bromofenol). As amostras foram fervidas em banho maria por 5min e foram aplicadas em um gel de SDS-PAGE 10%.

3.2.4 Testes de solubilidade

Os testes de solubilidade foram realizados seguindo as recomendações do EMBL (European Molecular Biology Laboratory). Ao total foram testados 18 condições de lise variando principalmente pH, concentração de sal e a presença de detergentes. A composição dos tampões de lise está explicitada na tabela 4.

Os testes consistiram em expressar a proteína em condições ideais e recolher alíquotas suficientes de 1ml quando a D.O. atingisse 1. As células foram então centrifugadas em uma centrífuga de eppendorfs (6000rpm, 5min), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 100µl de cada tampão de lise. O conteúdo foi agitado e submetido a um processo de congelamento/descongelamento para romper as células: quatro ciclos de 1min em N₂ líquido seguidos de 2min em banho maria a 42°C seguidos de agitação. A seguir os tubos foram centrifugados novamente (16000rpm, 5min) e o sobrenadante foi separado do pellet e colocado em outro tubo eppendorf. Aos tubos contendo os pellets, foram adicionados 25µl de tampão de amostra de gel SDS-PAGE 2X (composição descrita em 3.2.3), as amostras foram ressuspensas e fervidas em banho maria por 5min. A cada tubo contendo sobrenadante, foi adicionado 1ml de acetona, o tubo foi agitado e deixado em gelo por 15min. Em seguida, os tubos foram centrifugados novamente (16000rpm, 5min) e a acetona foi removida cuidadosamente para não perturbar os pellets, que foram colocados em uma estufa a 37°C para secar. Aos pellets tratados com acetona foram adicionados 15µl de tampão de amostra de SDS-PAGE 2X, as amostras foram ressuspensas e fervidas em banho maria por 5min. Todas as amostras foram corridas em gel de SDS-PAGE 10%.

Por vezes foi necessária a realização de experimentos de Western Blot para comprovar a existência ou não de proteína recombinante na fração solúvel. Esse experimento está descrito em detalhes no item 3.3.2.

Tabela 4 - Composição dos diferentes tampões de lise testados durante os testes de solubilidade da proteína heteróloga.

pH	
Código	Composição
5N	50 mM Na Acetato pH 5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
6N	50 mM MES pH 6, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
7N	50 mM Tris pH 7, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
7,5N	50 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
8N	50 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
9N	50 mM Tris pH 9, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
Concentração de sal	
Código	Composição
0,1S	50 mM Tris pH 7.5, 0.1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1mg/ml lisozima, inibidor de proteases
0,5S	50 mM Tris pH 7.5, 0.5 M NaCl, 5 mM EDTA, 1mg/ml lisozima, inibidor de proteases
1S	50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1mg/ml lisozima, inibidor de proteases
2S	50 mM Tris pH 7.5, 2 M NaCl, 5 mM EDTA, 1mg/ml lisozima, inibidor de proteases
0,1KS	50 mM Tris pH 7.5, 0.1 M KCl, 5 mM EDTA, 1mg/ml lisozima, inibidor de proteases
1KS	50 mM Tris pH 7.5, 1 M KCl, 5 mM EDTA, 1mg/ml lisozima, inibidor de proteases
Estabilizadores, detergentes, desnaturantes	
Código	Composição
D	20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2% NP 40, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
X	20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2% triton X-100, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
T	20mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.2% Tween-20, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
10G	20mM Tris HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 10% glycerol, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
50G	20mM Tris HCl pH7.5, 50 mM NaCl, 50% glycerol, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases
U	50 mM Tris pH 7.5, 1 M Urea, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.5 Expressão e lise de *NgSPS2-NTD*

Determinadas as condições ideais de expressão e solubilidade da proteína recombinante, o processo foi escalonado para obter maiores rendimentos. 10ml de pré inóculo de RosettaGami B(DE3) contendo o plasmídeo pET-32a com o gene de interesse clonado foram crescidos overnight e adicionados a 1L de meio de cultura LB. O meio foi mantido em agitação constante a 37°C até a D.O. aproximar-se de 0,6, momento a partir do qual a temperatura do shaker foi ajustada para 20°C e contou-se 4h de expressão. O conteúdo do erlenmeyer foi vertido em um tubo de centrífuga de 1L e centrifugado (4500rpm, 45min). O sobrenadante foi descartado e o pellet de bactérias foi recolhido e congelado para uso posterior, ou deu-se prosseguimento ao processo de lise.

O processo de lise iniciou-se com a adição do tampão de lise ao pellet de bactérias: 50ml para cada 1L de expressão. A composição do tampão de lise escolhido foi a seguinte: 50 mM Tris pH 7, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mg/ml lisozima, inibidor de proteases, 6M Ureia e 10mM de β -mercaptoetanol. Utilizou-se ciclos de sonicação de 30s ON, 30s OFF, num total de 10min, para lisar as células de maneira eficiente. As células foram mantidas em gelo durante os ciclos de sonicação para evitar o superaquecimento da amostra. O lisado foi então centrifugado (13000 g, 45min) para separar o sobrenadante (solúvel) do pellet (insolúvel).

3.2.6 Purificação por cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade foi a técnica escolhida para purificar a proteína recombinante, tendo em vista que o vetor pET-32a adiciona uma cauda de histidina (His-Tag) ao final da proteína recombinante que facilita sua purificação utilizando resinas de níquel ou cobalto. Neste caso, a resina escolhida foi a de níquel (His-Trap – GE Healthcare) de 5ml. A resina foi primeiramente lavada com 10 volumes de água miliQ e em seguida foi equilibrada através da aplicação de 10 volumes de tampão A, cuja composição está indicada na Tabela 5. Ambas as etapas foram realizadas a um fluxo de 1ml/min e a pressão máxima foi definida em 0,3MPa.

Tabela 5 - Composição dos tampões A e B utilizados nos experimentos de cromatografia de afinidade

Tampão A	Tampão B
50mM Tris pH 7	Tampão A + 200mM Imidazol
50mM NaCl	
5mM EDTA	
1mg/ml lisozima	
Inibidor de proteases	
6M Ureia	
10mM β -mercaptoetanol	

Fonte: Elaborada pelo autor.

O sobrenadante provindo da etapa de lise descrita no item 3.2.5 foi clarificado utilizando uma seringa e um filtro de 0,45 μ m e aplicado à coluna. Monitorando a leitura do cromatógrafo, a coluna foi lavada com tampão A para eluir proteínas com interações inespecíficas com a resina e, quando a leitura voltou a se estabilizar, foi iniciado o processo de eluição. Foi realizado um gradiente de tampão B de 0% a 100% em 45min. O tampão B continha imidazol em sua composição que compete com a His-Tag pela ligação ao níquel fazendo com que a proteína de interesse seja eluída da resina. As frações eluídas foram coletadas separadamente a cada 1ml e foram analisadas em gel de SDS-PAGE 10%.

3.3 NgSPS2-NTD – Imunoensaios

3.3.1 Produção de anticorpos policlonais – *anti*SPS2.NTD

As amostras providas da purificação por cromatografia de afinidade – procedimento descrito na seção 3.2.6 – foram preparadas para serem utilizadas na produção de anticorpos policlonais. As frações eluídas que se apresentavam mais puras após a análise em gel de poliacrilamida foram unidas em uma só fração e

concentradas através de um processo de diálise utilizando uma membrana *Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane* e tampão PBS pH 7. A amostra precipitou dentro da membrana de diálise e foi diluída em tampão de amostra para SDS-PAGE para ser aplicada ao gel. Três géis de poço único foram utilizados para a corrida e as bandas foram cortadas e congeladas para serem enviadas ao laboratório responsável pela produção dos anticorpos.

Para a realização desta pesquisa, os anticorpos policlonais foram produzidos pelo Laboratório de Imunologia no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), a partir da imunização em coelhos. Inicialmente a proteína recombinante *NgSPS2-NTD* purificada foi aplicada em um gel de SDS-PAGE 10% de uma única banda contendo 1,5mg total de proteína. A banda de interesse foi excisada do gel seguindo as especificações do Laboratório de Imunologia e foi enviada ao mesmo para finalização do processo.

3.3.2 Western blot

A técnica de Western Blot consiste na identificação de proteínas em uma amostra utilizando anticorpos que se ligam especificamente às proteínas de interesse. Neste trabalho, a técnica foi utilizada para detectar a presença de *NgSPS2-NTD* em extratos proteicos totais de *N. gruberi* utilizando os anticorpos monoclonais produzidos contra o domínio N-terminal da proteína.

Os experimentos de western blot iniciaram com a realização de uma de uma eletroferese comum, monodimensional, em gel de poliacrilamida 10% utilizando o aparato Mini Protean Tetra Cell (BioRad). Frações do extrato proteico total foram adicionadas ao tampão de amostra de gel SDS-PAGE (composição descrita em 3.2.3) em proporção 2:1 e fervidas por 5 minutos. 60ug total de proteína foram aplicados a cada poço de um gel SDS-PAGE 10% e o tampão externo de corrida da cuba foi composto por 125mM de Tris, 960mM de glicina e 0,5% SDS, pH 8,3. A concentração das amostras de proteína total foi aferida utilizando o kit comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce). A eletroforese foi conduzida a 140V por aproximadamente 1,5h e o marcador molecular utilizado para experimentos de

western blot foi o Spectra^{MT} Multicolor Broad Range Protein Ladder (Life Technologies).

O sistema Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell (BioRad) foi utilizado para transferir as proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) utilizando tampão de transferência Tris-Glicina (200mM tris base, 2M glicina) frio. A transferência se deu a 100V durante o período de 1h. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau 0,2% para verificar a eficiência do processo. Para experimentos de titulação de anticorpos ou análises comparativas, onde cada amostra corrida no gel deveria ser tratada com concentrações diferentes de anticorpos ou até mesmo com anticorpos diferentes, a membrana foi cortada e separada ao longo da borda de cada poço. A prevenção de ligações inespecíficas dos anticorpos a proteínas presentes na membrana foi garantida através do bloqueio da membrana, que foi deixada por 1h em solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico) dissolvido em PBS com adição de 0,1% do detergente Tween-20 (PBST).

Na sequência, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (*anti*-SPS2.NTD) diluído em PBST de acordo com a titulação desejada. A membrana foi deixada em um homogeneizador com agitação por 16h a 4°C. Em seguida, foram feitas 3 lavagens da membrana em PBST. A membrana foi então incubada com o anticorpo secundário *anti*-IgG de coelho (Sigma-Aldrich), na diluição de 1:5000, sob agitação branda, durante 80 minutos a temperatura ambiente. Foram realizadas novas lavagens com PBST para eliminar o excesso de anticorpo secundário, e a membrana foi então revelada utilizando um método quimioluminescente. A solução reveladora continha 1,1% luminol, 0,48% ácido P-cumárico e 11,1% Tris 1M pH 8,5 e a reação para emissão da quimioluminescência iniciou-se com a adição do agente oxidante peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na proporção 1:300 (v/v).

As membranas foram reveladas com o scanner C-Digit Blot (LI-COR Biosciences UK Ltd) e as imagens foram adquiridas pelo software Image StudioTM (LI-COR Biosciences UK Ltd).

3.3.3 Imunofluorescência

Foram realizados experimentos de imunofluorescência para identificação e localização da proteína NgSPS2-NTD no organismo em estudo. Para tal, foi necessário o estabelecimento das concentrações corretas de reagentes a serem utilizados em cada etapa do experimento. As etapas do experimento se resumem em: fixação das células, permeabilização, bloqueio, lavagens, incubação com anticorpo primário (anti NgSPS2-NTD), incubação com anticorpo secundário (Alexa Fluor 594, Thermo Scientific) e com DAPI (fluoróforo que se liga especificamente ao núcleo celular), selagem da lâmina para conservação do experimento e a revelação do resultado no microscópio de fluorescência.

As lâminas utilizadas para o experimento foram preparadas previamente aplicando 10µl de Poli-L-Lisina a cada poço e deixando secar na estufa, para facilitar a aderência das células ao vidro da lâmina. As células foram preparadas para o experimento através de três lavagens com PBS (centrifugação em 800 g, 5min, 26°C) e ressuspensão no mesmo tampão para uma concentração final de 2×10^6 células/ml. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em tampão PBS contendo 2% de paraformaldeído que auxiliou na fixação das células. Gotas de 10µl foram então aplicadas a cada poço da lâmina de vidro. Após 5min de fixação, os poços foram lavados 3 vezes com PBS para retirada do excesso do agente fixador.

A próxima etapa do processo foi a aplicação da solução de permeabilização, descrita na Tabela 6, aos poços. Foram aplicados 20µl da solução a cada poço, deixou-se reagir por 10min, e realizaram-se lavagens com PBS 1X para retirada do excesso da solução. Seguido da permeabilização veio a etapa de bloqueio. 20µl da solução de bloqueio, cuja composição também encontra-se descrita na Tabela 6, foram aplicados a cada poço, e mantidos por 1h a temperatura ambiente em uma câmara úmida. Novamente foram realizadas lavagens com PBS 1X para retirada do excesso dos reagentes.

Tabela 6 - Composição das soluções utilizadas no experimento de imunofluorescência

Solução	Composição (em PBS pH 7)
Permeabilização	0,2% Triton X-100, 1% BSA
Bloqueio	1% BSA, 5% soro de cabra, 0,1% gelatina de peixe
Anticorpos	3% BSA, 0,1% gelatina de peixe, titulação teste anticorpo primário/secundário/DAPI

Fonte: Elaborada pelo autor.

Seguiram-se as incubações com anticorpo primário e secundário + DAPI. Cada um destes passos de incubação durou 1h a temperatura ambiente e em câmara úmida. As soluções utilizadas no processo estão descritas na Tabela 6. Após cada período de incubação foram realizadas, novamente, lavagens com PBS 1X para retirada do excesso de reagentes dos poços. Foram testadas algumas concentrações e combinações diferentes de DAPI, anticopros primários e anticorpos secundários para determinação das melhores condições experimentais a serem repetidas. Todas as condições foram testadas comparando a aplicação dos anticorpos secundários tanto em amostras incubadas com o soro pré imune quanto com o soro imune como anticorpos primários, para realizar uma comparação e livrar os experimentos do viés de interações inespecíficas do anticorpo primário com outras estruturas celulares fora do escopo dessa análise. As diferentes condições experimentais testadas estão descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições experimentais testadas durante os experimentos de imunofluorescência, variando a concentração dos diferentes anticorpos.

Anticorpo	Titulações testadas
DAPI	1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000
Primário (anti <i>NgSPS2</i> -NTD)	1:200, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000
Secundário (Alexa Fluor)	1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:10000

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para finalizar o procedimento experimental, foram aplicados 12µl de Vecta Shield em cada poço. Este reagente permite a conservação do experimento por um período de tempo mais longo, auxiliando na manutenção da fluorescência dos reagentes. Após a aplicação do Vecta Shield, a lâmina foi coberta com uma lâminula de vidro e os resultados do experimento foram analisados em microscópio de fluorescência.

3.4 tRNAs

3.4.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol (ThermoFischer Scientific). O Trizol é uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite a separação de ácidos nucleicos e proteínas a partir de amostras de células e tecidos.

Cada extração foi iniciada com um volume de 1×10^7 células centrifugadas e lavadas 2 vezes com PBS (como descrito na seção 3.1.2 para a preparação de células para os extratos proteicos). Adicionou-se 750µl de Trizol ao eppendorf contendo o pellet de células, que foi ressuspensão pipetando diversas vezes. O material foi deixado em repouso por 5 minutos para facilitar a dissociação dos complexos de nucleoproteínas. 200µl de clorofórmio (Merck) foram adicionados à mistura e esta foi novamente deixada em repouso por mais 3 minutos. O eppendorf foi então centrifugado (12000 g, 15min, 4°C) e ao final seu conteúdo apresentava três fases diferentes: uma superior transparente contendo o RNA, uma fase intermediária branca e opaca contendo DNA, e uma fase inferior de cor rosa contendo as proteínas. A fase superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo eppendorf ao qual foram adicionados também 500µl de isopropanol e que foi deixado em repouso por mais 10 minutos. Seguiu-se então um novo passo de centrifugação (12000g, 10min, 4°C) após o qual o RNA encontrava-se precipitado em forma de pellet no fundo do tubo. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi

lavado utilizando etanol 75% e vortexando a amostra brevemente. Mais um passo de centrifugação foi necessário (7500 g, 5min, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o pellet final foi seco com a ajuda de uma mangueira de ar comprimido. 30µl de água tratada com DEPC foi utilizada para ressuspender o pellet de RNA ao final do processo.

3.4.2 Isolamento e purificação das moléculas de tRNA

Os procedimentos de isolamento e purificação dos tRNAs seguiram em linhas gerais o protocolo em. (45) O processo é dividido em três partes principais: enriquecimento da fração de RNAs pequenos da amostra de RNA total; purificação dos tRNAs de interesse utilizando oligonucleotídeos biotinilados específicos para cada espécie de tRNA de interesse e resina de agarose conjugadas com estreptavidina; e análise da purificação utilizando gel desnaturante de poliacrilamida/ureia.

A primeira parte do procedimento de purificação de tRNAs tem por objetivo enriquecer a fração de RNAs pequenos contidos no RNA total, livrando-se dos RNAs maiores que não são de interesse nesse momento. Para iniciar o experimento, foi extraído RNA total de 1×10^8 amebas como descrito no item 3.4.1. Uma coluna Qiagen-Tip 2500 (Qiagen) foi equilibrada com 100ml do seguinte tampão: 50mM MOPS pH 7, 15% isopropanol, 1% Triton X-100. Ao RNA total extraído foi adicionado MOPS 1M pH 7 até uma concentração final de 0,1M e a amostra foi aplicada à coluna. O flow-through foi recolhido e reaplicado à coluna mais 3 vezes. A coluna foi então lavada com 200ml de um tampão de lavagem com a seguinte composição: 50mM MOPS pH 7, 0,2M NaCl. Em seguida, lavou-se a coluna com mais 10ml de outro tampão, o de eluição, de composição: 50mM MOPS pH 7, 0,75M NaCl, 15% etanol. Mais 20ml do tampão de eluição foram então aplicados a coluna e, dessa vez, o flow-through foi recolhido, pois a fração de RNAs pequenos está contida ali. O RNA eluído foi então precipitado utilizando mais 20ml de isopropanol gelado e foi mantido a -20°C por 30 minutos. O volume total foi dividido em diversos eppendorfs que foram centrifugados (16000 g, 30min), o sobrenadante foi decantado

e o pellet foi lavado com etanol 70%. Os pellets de RNA foram finalmente ressuspensos em um volume mínimo de água DEPC (~30µl).

A segunda etapa do processo, a purificação em si, iniciou-se com a lavagem da resina de estreptavidina agarose (Pierce). 250µl de resina foi lavado utilizando 1,75ml de SSC 6X (SSC 20X: 3M NaCl, 0,3M citrato de sódio, pH 7), centrifugando-as (16000g, 15min) e tirando o sobrenadante cuidadosamente. O processo de lavagem foi repetido 3 vezes e ao final a resina foi novamente ressuspensa em 0,75ml de SSC 6X. Oligonucleotídeos biotinilados em sua extremidade 5' foram sintetizados especialmente para este experimento. 20µg destes oligonucleotídeos biotinilados foram aquecidos a 70°C por 5 minutos e misturados à resina lavada. A reação foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e centrifugada em seguida (16000 g, 15min). A resina conjugada aos oligonucleotídeos biotinilados foi então lavada por mais 2 vezes com SSC 6X para remoção dos oligonucleotídeos não ligados à mesma.

O RNA enriquecido na primeira etapa do processo foi aquecido a 85°C por 10 minutos seguido de uma diminuição na temperatura para 70°C. Uma solução de SSC 20X foi utilizada para fazer uma solução SSC 6X com a amostra contendo o RNA. Essa solução foi então misturada à solução das beads de estreptavidina hibridizadas aos oligonucleotídeos biotinilados e deixada a 70°C por mais 10 minutos. Toda a reação foi então levada a um banho maria a 37°C onde foi permitido que sua temperatura se ajustasse gradualmente, durante um período de 2 horas. Após este período, o RNA não hibridizado aos oligonucleotídeos foi removido através de 3 lavagens utilizando uma solução de SSC 3X. Os tRNAs purificados desta maneira foram então eluídos das beads utilizando 500µl de um outro tampão de eluição (0,1X SSC, 0,1% SDS), aquecendo a amostra a 80°C por 5 minutos, centrifugando o tubo (16000 g, 1 min) e recolhendo o sobrenadante. Esse passo de eluição foi repetido 10 vezes, gerando 10 alíquotas de 500µl. O RNA foi finalmente precipitado adicionando 1,5ml de etanol, 50µl de acetato de sódio 3M e 2µl de glicogênio a cada tubo e centrifugando-os (16000 g, 30 min). Os pellets foram ressuspensos em 10µl de água DEPC aos quais foram adicionados 10µl de tampão de amostra desnaturante contendo ureia (7M de ureia em tampão TE (10mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM EDTA)) e as amostras foram fervidas por 5 minutos.

As amostras foram, aplicadas em um gel de poliacrilamida 15% contendo 8M de ureia. O tampão utilizado na cuba para corrida do gel foi o TBE 1X (0,9M Tris, 0,9M ácido bórico, 20mM EDTA, pH 8). O gel foi corrido a 250V até a frente de corrida do azul de bromofenol estar próximo a sair do gel e posteriormente foi corado utilizando brometo de etídio 0,5ug/ml em água por 20 minutos. O resultado da eletroforese foi visualizado utilizando um transluminador UV.

3.5 qPCR (PCR quantitativo) – determinação de genes de referência para estudos em *Naegleria gruberi*

3.5.1 Escolha dos candidatos

Os experimentos de PCR quantitativo (qPCR) são capazes de fornecer informações muito importantes sobre o perfil de expressão de diferentes genes de uma célula quando disposta à diversas condições diferentes. A determinação dos genes de referência para cada tipo diferente de célula é um passo muito importante na realização destes experimentos, tendo em vista que estes genes servirão como base para avaliar a variação de outros – os genes de interesse para a análise.

Tabela 8 - Genes escolhidos como candidatos a genes de referência para experimentos em *Naegleria gruberi*.

Gene	Localização	Função
BN46/51	Nucléolo e corpo basal do flagelo	Associação em corpo basal para diferenciação (flagelar)
Espectrina	Ligação à membrana	Estrutural, liga a membrana plasmática ao citoesqueleto
5.8S rRNA	Plasmídeo circular no nucléolo	Estrutural, composição do ribossomo
18S rRNA	Plasmídeo circular no nucléolo	Estrutural, composição do ribossomo
GAPDH	Citoplasma	Glicólise
Actina	Citoplasma	Motilidade ameboide
MRE11	Núcleo	Recombinação homóloga, manutenção comprimento de telômerose reparo de DNA
Épsilon tubulina	Fuso mitótico	Estrutural, constituição de microtúbulos e divisão celular
Proteína de ligação a GTP	Citoplasma	Cascata de sinalização intracelular
Histona H2B	Núcleo	Estrutural, ligação ao DNA
HSP70	Citosol e retículo endoplasmático	Proteção celular contra stress, modificações pós-traducionais
Epimerase dependente de NAD	Citosol	Catalisa inversões esteroquímicas
Carbamoiil/carboxil transferase	Citosol	Catalisa a transferência de grupos carboxila ou carbamoiil

Fonte: Elaborada pelo autor

A primeira etapa na realização destes experimentos foi a escolha dos candidatos a genes de referência para serem avaliados. Neste passo, três frentes foram exploradas, todas baseadas na literatura existente sobre o tópico: a primeira levou em conta os genes de referência que geralmente são utilizados para este tipo de experimento na literatura em geral; a segunda tentou se aproximar mais aos organismos evolutivamente próximos ao de interesse e analisar a literatura existente para experimentos de qPCR realizados com os mesmos; e a terceira se baseou em um estudo de microarranjo realizado em *N. gruberi* que identificava as diferentes taxas de expressão de diversas proteínas durante uma diferenciação de fases do organismo (de ameboide para flagelar). Para esta terceira abordagem, foram analisados os tempos inicial e final e um teste t foi utilizado para determinar quais

genes tinham tido uma variação de expressão menos significativa ao longo do processo de mudança de fase. Este valor serviu como indicador para a escolha de genes que indicassem uma maior constância em suas taxas de expressão.

Analizados estes dados, foi proposta uma lista com 13 genes candidatos a genes de referência, como pode ser visto na Tabela 8. Para cada um destes genes, duas regiões de anelamento foram determinadas para a síntese de primers. As regiões foram escolhidas com o auxílio do software Primer Quest Tool (IDT – Integrated DNA Technologies) que leva em conta o T_m ideal dos primers, além de sua extensão e localização no gene de interesse.

3.5.2 Preparo das amostras para os experimentos de qPCR

O RNA total de *N. gruberi* foi extraído utilizando o kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel) e submetido à um processo de RT-PCR para criação de um pool de cDNA a partir do RNA total extraído do organismo. A enzima utilizada para a reação de RT-PCR foi a Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific), e foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante. O cDNA assim obtido foi utilizado nas etapas seguintes dos experimentos.

3.5.3 Experimentos para determinação da eficiência dos primers

A técnica de qPCR é bastante sensível, sendo capaz de identificar quantidades ínfimas de ácidos nucleicos em amostra. Para que a quantificação seja isenta de falhas, porém, é esperado que todos os passos da reação de PCR ocorram de maneira precisa. Para tal, é necessário realizar uma aferição da eficiência dos pares de primers produzidos para o experimento, com o intuito de garantir que a quantidade de DNA presente em amostra está sendo realmente duplicada a cada ciclo de PCR realizado. Este fator se mostra bastante importante pois o modelo estatístico utilizado para a avaliação da variação na expressão gênica leva em conta este resultado. Este modelo estatístico foi desenvolvido por Pfaffl (46) e é denominado $\Delta\Delta Ct$.

Para realizar a aferição da taxa de replicação do DNA a cada ciclo, realiza-se um experimento comum de qPCR variando as quantidades iniciais de cDNA por poço em fatores de 10, e medindo a diferença na quantidade de DNA amplificado após o fim do experimento. A determinação da taxa de amplificação é medida através da fluorescência emitida por um fluoróforo contido no mix da reação de PCR, que se intercala em fitas duplas de ácidos nucleicos emitindo sua fluorescência. As quantidades de DNA amplificado são determinadas medindo o Ct: uma unidade que indica a partir de qual ciclo de replicação a amostra começa a apresentar fluorescência acima do background gerado pelas amostras inicialmente. Uma diferença de aproximadamente 3,32 Cts entre uma amostra e outra (diluição de 10 vezes = $2^{3,32}$) indica uma boa eficiência para o par de primer sendo testado.

As medições foram realizadas utilizando um termociclador BioRad CFX96 e o kit Sso Fast EvaGreen, também da BioRad, que fornece os reagentes necessários para a reação de PCR.

4 Resultados e Discussões

4.1 Cultivo de *Naegleria gruberi*

O cultivo de *Naegleria gruberi* foi analisado através da realização de uma curva de crescimento como descrito na seção 3.1.1. A curva de crescimento está apresentada na figura 13.

Figura 13 - Curva de crescimento de *Naegleria gruberi* em meio de cultivo ATCC 1034. O ponto de 72h, que evidencia o final da fase exponencial de crescimento foi determinado como melhor ponto para coleta de células para realização de experimentos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O padrão de crescimento mostra o final da fase log de crescimento sendo atingido ao redor do terceiro dia de cultivo (~72h) sendo este o momento escolhido para a coleta das células para realização dos experimentos posteriores. Ao continuar

a observação do crescimento celular, percebeu-se que, avançando esta janela de 72h, as amebas começavam a diferenciar-se em células flagelares e em cistos, deixando evidente a escassez de nutrientes no meio de cultivo. Ao final do período de 9 dias de monitoramento, observou-se somente cistos presentes em meio de cultivo.

4.2 Experimentos com *NgSPS2-NTD*

4.2.1 Clonagem de *NgSPS2-NTD* em *E. Coli*

O procedimento completo de clonagem do gene de *NgSPS2-NTD* em *E. coli* está detalhado na seção 3.2.1. Deu-se início ao processo através da PCR para amplificação da região de interesse do gene. A Figura 14 mostra o gel de agarose 1% com o resultado do processo.

Figura 14 - Gel de agarose 1% mostrando o resultado da reação de PCR realizada para amplificar a região de interesse (domínio N-terminal) da proteína SPS de *Naegleria gruberi*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma banda de DNA na altura de pouco mais de 1000 pares de base foi obtida no processo, condizente com o valor de 1060 pares de base presentes na região de interesse para amplificação. Deu-se prosseguimento ao processo ligando o inserto obtido ao vetor de clonagem pGEM-T Easy. O vetor de clonagem com o inserto foi transformado em *E. coli* da linhagem DH5a e plaqueado em placas de petri para

seleção das colunas transformadas através da seleção branco/azul. A transformação foi confirmada utilizando o método de digestão do plasmídeo, discutido com mais detalhes na seção 3.2.1. O resultado desta digestão está apresentado na Figura 15.

Figura 15 - Gel de agarose 1% mostrando o resultado da digestão de plasmídeos purificados a partir de colônias transformadas com o inserto em vetor pGEM –T Easy. É possível ver claramente as bandas do inserto e do plasmídeo separadas e nas alturas esperadas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O gel mostra a confirmação da ligação do inserto ao plasmídeo em 4 colônias diferentes. Percebe-se uma banda na altura de 1000 pares de base correspondente ao inserto e uma outra na altura de aproximadamente 3000 pares de base, correspondente ao vetor linearizado, resultado que corrobora com o sucesso do processo de clonagem no vetor de clonagem.

O passo seguinte foi o de subclonagem do inserto digerido em vetores de expressão pET-28a e pET-32a. Ambos os vetores de expressão, assim como o vetor de clonagem, foram digeridos utilizando as mesmas enzimas de restrição, como detalhado na seção 3.2.2. O inserto digerido foi ligado aos vetores de expressão e transformado inicialmente em *E. coli* da linhagem BL21(DE3) e posteriormente nas linhagens BL21-CodonPlus e RosettaGami B(DE3). O sucesso do processo de subclonagem foi avaliado desta vez utilizando o procedimento de PCR utilizando primers para as regiões T7 promotor e T7 terminator presentes no vetor de expressão. As amostras amplificadas referentes ao plasmídeo pET-32a apresentaram resultados positivos, mostrados na Figura 16, com uma banda bastante intensa ao redor de 1800 pares de base, representando o inserto (1060pb) mais regiões extras do vetor de expressão contidas na região entre os primers T7

(740pb), tais quais a região da cauda de histidina a ser expressa em conjunto com a proteína recombinante e o sítio múltiplo de clonagem. As amostras amplificadas a partir dos vetores pET-28a purificados não apresentaram resultados positivos, mostrando banda única no gel concentrada em uma altura ao redor de 5000 pares de base, condizente com o tamanho do plasmídeo sozinho (exatamente 5369 pares de base). A partir do sucesso da subclonagem em pET-32a, os trabalhos com pET-28a foram deixados de lado.

Figura 16 - Gel de agarose 1% mostrando os resultados da reação de PCR realizada para amplificar o inserto clonado em vetor de expressão (pET-32a). O inserto, que possui 1060 pares de base, foi identificado utilizando primers para amplificação da região entre o T7 promoter e T7 terminator, acrescentando aproximadamente 750 pares de base à região amplificada.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2. Testes de expressão de NgSPS2-NTD

Os testes de expressão da proteína recombinante NgSPS2-NTD em *E. coli* foram realizados como descrito detalhadamente na seção 3.2.4. A Figura 17 mostra os resultados das melhores condições encontradas no teste de expressão utilizando o clone no plasmídeo pET-32a transformado em *E. coli* da linhagem BL21(DE3).

As condições adotadas para a expressão da proteína recombinante foram 8h de indução a temperatura de 20°C com 0,1mM de IPTG. É nítida a diferença entre os tempos 0h e 2h após a indução, assim como também fica bem claro como a banda de expressão vai aumentando no decorrer do tempo. A proteína

recombinante tem por volta de 56kDa o que se mostra bastante condizente com a banda de expressão identificada entre as bandas do marcador de massa molecular de 48kDa e 65kDa.

Foram também realizados testes de expressão para o clone no plasmídeo pET-32a transformado em *E. coli* da linhagem Rosetta-Gami B. Os resultados podem ser observados na Figura 18.

Figura 17 - Gel de SDS-PAGE 10% mostrando o resultado do teste de expressão de NgSPS2-NTD em *E. coli* BL21(DE3) a 20°C, com adição de 0,1mM de IPTG. O tempo de expressão utilizado para os experimentos seguintes foi o de 8h.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 - Géis de SDS-PAGE 10% mostrando o resultado dos testes de expressão de *NgSPS2-NTD* em *E. coli* Rosetta-Gami B. Foram testados diferentes concentrações de IPTG para indução bem como diferentes tempos de indução. O último exemplo, marcado com o asterisco (*) representa o vazamento da expressão após 16h sem indução com IPTG.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados para este teste de expressão foram bastante interessantes. Em primeiro lugar, a amostra controle (sem adição de IPTG) apresentou uma banda clara de expressão da proteína recombinante. Além disso, nos testes com diferentes concentrações de IPTG, foi possível observar um perfil no qual a banda de expressão começava a diminuir no decorrer do tempo, indicando uma possível degradação da proteína expressa. As melhores condições de expressão foram escolhidas já com vista na otimização da solubilidade da proteína recombinante, como descrito na seção 4.2.3. As condições levadas para posteriores testes de solubilidade foram a expressão após 2h com 0,1mM de IPTG a 20°C e a expressão após 24h sem IPTG e a 20°C.

Os testes de expressão com o clone em plasmídeo pET-32a transformado em BL21-CodonPlus não apresentou resultados positivos. Essa cepa foi então descartada no prosseguimento dos experimentos.

4.2.3 Testes de solubilidade de *NgSPS2-NTD*

Os testes de solubilidade da proteína recombinante *NgSPS2-NTD* foram realizados de acordo com os procedimentos descritos detalhadamente na seção

3.2.4. Os mesmos testes foram realizados tanto para o clone em BL21(DE3) quanto para o clone em Rosetta-Gami B. Os resultados foram bastante similares para ambos os casos e estão exemplificados na Figura 19, que mostra o teste de solubilidade para o clone em Rosetta-Gami B.

É possível observar que a maior parte da banda de expressão da proteína recombinante se concentra na fração insolúvel do extrato proteico, para todos os tampões de lise testados. Tal fato nos leva a crer que a proteína está sendo expressa em corpos de inclusão que impossibilitam sua dissolução em solução aquosa. Este fato inclusive guiou as escolhas das condições de otimização da etapa de expressão da proteína, tendo em vista que baixas temperaturas e baixas concentrações de IPTG na fase de indução favorecem o enovelamento correto da proteína. Para ter certeza de que nem um pouco de proteína recombinante estava sendo expressa no sobrenadante, foi realizado um experimento de western blot com as frações solúveis obtidas durante os testes de solubilidade. Neste experimento, foi utilizado o anticorpo *anti*-His, que detecta a presença da cauda de histidina contida na proteína recombinante. O resultado pode ser observado na Figura 19.

Figura 19 - Géis SDS-Page 15% mostrando os resultados dos testes de solubilidade realizados com a proteína NgSPS2-NTD expressa em *E. coli* Rosetta-Gami B utilizando diferentes tampões de lise. A composição de cada um dos tampões de lise está detalhada na seção 3.2.4. Cada dois poços correspondem a um tampão diferente, sendo o primeiro poço correspondente a amostra retirada do pellet e o seguinte retirado do sobrenadante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 - Western blot mostrando o resultado dos experimentos com anti-His para detecção de proteína recombinante nas amostras retiradas do sobrenadante submetido a diferentes tampões de lise. A amostra marcada como C é um controle contendo a proteína recombinante. Percebe-se claramente a ausência de proteína recombinante nos demais poços.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nenhuma das condições apresentou resultados promissores, como pode ser observado na figura 20. A partir disso, decidiu-se testar a possibilidade de solubilização da fração contida no pellet para extração dos corpos de inclusão contidos ali. Para isso, foram testadas diferentes concentrações de ureia adicionadas ao tampão de lise para que as proteínas se desagregassem e se tornassem solúveis. O resultado deste teste está apresentado na Figura 21.

Figura 21 - Gel de SDS-PAGE 15% mostrando o resultado do teste de solubilização com diferentes concentrações de ureia no tampão de lise. Cada concentração está representada em dois poços do gel, o primeiro sendo a amostra retirada a partir do pellet e a segunda do sobrenadante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gel de poliacrilamida não evidencia muito a quantidade de proteína presente em cada fração purificada (sobrenadante e pellet) portanto, novamente, recorreu-se à reação de western blot para comprovar a solubilização da proteína recombinante. O resultado do blot pode ser visto também na Figura 22. A concentração de 6M de ureia, quando adicionada ao tampão de lise, possibilitou a desnaturação da proteína, fazendo com que a mesma passasse a fazer parte do sobrenadante durante o processo do teste de solubilidade. A proteína recombinante solubilizada com a ajuda de ureia avançou para a etapa de purificação.

Figura 22 - Western blot evidenciando a presença de proteína na fração do sobrenadante quando a amostra foi tratada com 6M de ureia. Apesar da quantidade considerável de proteína ainda no pellet, este sobrenadante foi utilizado para tentativas de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.4 Purificação da proteína por cromatografia de afinidade

A proteína recombinante desnaturada foi purificada através do processo de cromatografia de afinidade, descrito detalhadamente na seção 3.2.6. O cromatograma da purificação bem como o gel de poliacrilamida das amostras de proteína recombinante purificadas podem ser observados na Figura 23.

O gel evidencia a presença de proteína recombinante ainda no pellet, porém mostra boa parte do material de interesse também no sobrenadante. As amostras recolhidas do pico principal de purificação possuem predominantemente a proteína recombinante, demonstrando o sucesso desta etapa do processo de purificação. O pico principal foi eluído com uma concentração de imidazol correspondente a 30%-45% de tampão B contendo 200mM de imidazol em sua composição o que resulta em uma concentração de 60mM a 90mM de imidazol.

Figura 23 - (esq) cromatograma de purificação por afinidade em coluna de níquel mostrando o pico de eluição da proteína recombinante; (dir) gel de SDS-PAGE 15% mostrando diferentes frações eluídas de proteína pura, bem como amostras controle.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.5 Preparação da amostra para produção dos anticorpos policlonais

As frações de proteína recombinante purificadas foram reunidas e dialisadas em PBS para retirada do excesso de ureia presente na amostra. Durante o processo de diálise, boa parte da proteína recombinante precipitou, porém sem grandes efeitos negativos para o decorrer dos experimentos, tendo em vista que as próximas etapas do processo expunham a amostra a um ambiente desnaturante. Foram necessários dois geis como o demonstrado na Figura 24 para obter a quantidade necessária de proteína para ser enviada ao Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para a produção de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante.

Figura 23 - Gel de SDS-PAGE 15% de poço único mostrando o preparo da amostra de proteína recombinante para produção de anticorpos policlonais.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.6 Titulação dos anticorpos policlonais

Com os anticorpos em mãos, o primeiro experimento realizado foi o de titulação dos anticorpos policlonais utilizando a técnica de western blot. O resultado do primeiro experimento de titulação dos anticorpos realizados pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 - Western blot mostrando o primeiro teste de titulação dos anticorpos anti NgSPS2-NTD. São identificados diferentes titulações dos anticorpos, testados tanto com o soro imune (l.) quanto com o soro pré-imune (p.l.). Um dos poços do gel foi utilizado com um controle da proteína recombinante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O resultado deste experimento mostrou-se bastante promissor. Inclusive, com base nele, foram realizados outros experimentos em sequência, como o de imunofluorescência e de imunoprecipitação, descritos nas próximas seções. É possível observar pelo western blot que, à medida que a concentração de anticorpo vai diminuindo (o título aumentando) a banda visualizada nos poços identificados como imune se torna mais fraca, como esperado. Além disso, em todos os títulos testados o anticorpo produzido aparenta especificidade bastante alta de ligação com uma proteína contendo entre 40kDa e 50kDa, condizente com um valor estimado de aproximadamente 46kDa para o domínio N-terminal de SPS2 sozinho. A banda em questão também não pode ser visualizada nos poços incubados com o soro pré-imune, o que aumenta ainda mais as expectativas da banda visualizada tratar-se realmente da proteína esperada *in vivo*, tendo em vista que o soro contendo os

anticorpos do coelho somente reconhece a proteína em sua versão coletada após a imunização realizada com a proteína recombinante.

Este resultado, porém, demonstrou-se impossível de reproduzir em repetições seguintes do mesmo experimento. A Figura 26 mostra o resultado obtido utilizando a mesma técnica com o mesmo procedimento experimental, porém com resultados drasticamente diferentes.

Figura 26 - Western blots repetindo o experimento de titulação anterior, porém com resultados bastante diversos. A especificidade aferida a partir dos primeiros experimentos mostrou-se irreprodutível, tornando difícil o restante dos experimentos com os anticorpos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Muitas bandas inespecíficas começaram a surgir tanto nas amostras tratadas com o soro pré-imune quanto nas tratadas com o soro pós imunização. Algumas hipóteses foram levantadas para tentar explicar este comportamento inesperado dos anticorpos produzidos e elas serão discutidas a seguir.

Em primeiro lugar, é preciso considerar a possibilidade de degradação dos anticorpos, devido principalmente a fatores relacionados com sua estocagem e manutenção. Se mantidos a temperaturas muito elevadas, os anticorpos podem perder sua conformação original, da qual depende todo o processo de reconhecimento anticopro-antígeno.

Em segundo lugar, foi considerada a possibilidade de que a origem dos diferentes resultados obtidos tivesse relação com os extratos proteicos ao invés de estar relacionada diretamente aos anticorpos. É possível que as células apresentem perfis proteicos diferentes caso a extração de proteínas total seja realizada durante a fase log de crescimento ou durante a fase estaconária, por exemplo. Para esta hipótese, foi realizado um experimento utilizando extratos proteicos de culturas de *Naelgeria* repicadas pela ultima vez há 48h e há 96h, diferente do típico período de 72h existente entre cada repique. O resultado pode ser observado na Figura 27 e mostra que o perfil de expressão proteica capturado pelo ensaio imunoquímico não variou significativamente entre as duas amostras.

Figura 27 - western blot mostrando perfil proteico utilizando anti *NgSPS2*-NTD em culturas coletadas em diferentes dias. O perfil parece não variar consideravelmente de um período para o outro.

Fonte: Elaborada pelo autor

Em terceiro e último lugar, existe o fato de que, por conta das dificuldades encontradas durante o processo de solubilização da proteína recombinante NgSPS2-NTD, ela precisou ser desnaturada com ureia para ser posteriormente purificada, como detalhado nas seções 3.2.4 e 4.2.3. Com a proteína desnaturada, foi impossível realizar a clivagem da tioredoxina expressa juntamente à ela devido à construção do gene para expressão em vetor pET-32. Neste caso, é possível supor que o processo de imunização no coelho tenha gerado anticorpos específicos para tioredoxinas de *Naegleria* que estariam sendo reconhecidas nestes experimentos de Western Blot, ao invés do alvo real que almejava-se detectar.

Para avaliar a esta possibilidade, a sequência primária da Tiorredoxina presente no pET-32 foi utilizada no software BLAST e comparada com o genôma completo de *N. gruberi* a procura de sequências similares. Somente duas proteínas foram identificadas nesta busca, uma já previamente anotada como tioredoxina (XM_002680830.1) e outra como uma proteína hipotética (XM_002681533.1). Ambas possuíam baixa cobertura de alinhamento (10% e 11% respectivamente) com identidade entre as sequências alinhadas de 80% e 78% respectivamente. A molécula previamente anotada como Tiorredoxina teve seu peso molecular predito em aproximadamente 11kDa quando submetida à análise do software ExPASy, e a proteína hipotética apresentou peso molecular predito de aproximadamente 36kDa. Apesar de ainda não explicar a discrepância observada entre as repetições dos experimentos de titulação, a existência de uma tioredoxina com peso molecular semelhante ao da proteína estudada (~36kDa vs ~40kDa) faz com que sejam necessários estudos mais aprofundados para verificação da identidade das proteínas detectadas pelo Western Blot. Experimentos de espectrometria de massas seriam necessários para sanar esta dúvida.

4.2.7 Imunofluorescência

Seguindo o sucesso inicial apresentado pelos experimentos de titulação dos anticorpos policlonais, descrito na seção 4.2.6, iniciou-se a determinação das condições experimentais ideais para a realização do experimento de imunofluorescência. Após o teste das diferentes titulações de anticorpos, descrito na

seção experimental 3.3.3, determinou-se as diluições corretas para dar prosseguimento aos experimentos. A titulação de DAPI utilizada foi de 1:10000, a de anticorpo primário (NgSPS2-NTD) foi 1:2000 e a de Alexa Fluor (anticorpo secundário) foi de 1:4000. A Figura 28 mostra a comparação de dois poços, um tratado com soro imune e outro tratado com soro pré-imune, quando expostos a filtros de fluorescência diferentes. É possível perceber que, nessa diluição de anticorpos determinada experimentalmente, o poço do pré-imune não apresenta quase fluorescência quando comparado ao poço incubado com o soro imune. Esse resultado serve de garantia para mostrar que as interações que conseguimos visualizar através da fluorescência do Alexa Fluor são de fato provenientes da

interação dos anticorpos anti NgSPS2-NTD com estruturas celulares de *N. gruberi*.

Figura 28 - Experimento de imunofluorescência mostrando as células incubadas com soro imune e pré imune primeiro no campo claro, depois incubadas com DAPI para coloração do núcleo celular e posteriormente com anticorpo anti NgSPS2-NTD. O fato de visualizarmos a coloração no imune e não no pré-imune é uma garantia de que a fluorescência provém das interações do anticorpo policlonal com estruturas celulares de *N. gruberi*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Um fator a ser levantado, porém, é que este resultado não fornece provas concretas de que o anticorpo produzido esteja realmente ligado a proteína de interesse. Comprova-se somente que o que é possível identificar em vermelho na Figura 28 são realmente interações dos anticorpos produzidos com alguma estrutura

celular de *N. gruberi*. Como discutido na seção 4.2.6, o problema encontrado no que diz respeito à determinação da especificidade dos anticorpos policlonais torna-se impeditivo para a formulação de conclusões mais assertivas sobre os resultados desse experimento, tal qual a determinação da localização celular do domínio N-terminal da SPS2 no organismo. Os experimentos futuros, que previam a imunolocalização da proteína em diferentes fases de vida da célula, bem como a comparação da localização celular dos domínios N e C terminal da proteína SPS2 como indício de um possível evento pós traducional de clivagem, tiveram de ser suspensos até que a averiguação da questão levantada sobre a especificidade dos anticorpos policlonais produzidos possa ser investigada mais a fundo.

4.3 Experimentos com tRNAs

4.3.1 Isolamento e purificação

Os procedimentos de isolamento e purificação de ambas as espécies de tRNA^{Sec} identificados em *N. Gruberi* podem ser consultados em detalhe na seção 3.4. A Figura 29 mostra o gel de poliacrilamida ureia resultante de uma extração de RNA total.

Figura 29 - Extração de RNA total de *Naegleria gruberi*. O gel é de SDS-PAGE com ureia, portanto um gel desnaturante. Este gel mostra três amostras diferentes de RNA de *N. gruberi* evidenciando as bandas fortes do RNA ribossomal.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O perfil de bandas observados no gel desnaturante onde a amostra de RNA total foi corrida evidencia os RNAs ribossomais de *Naegleria*: 28S, 18S e 5,8S rRNAs, como indicado na figura 29. A amostra não apresenta sinais de degradação que são facilmente identificáveis neste contexto, quando observa-se um rastro deixado pela amostra ao correr pelo gel. A razão A260/A280 medida para a amostra de RNA total extraída teve resultado 1,99, dentro dos limites de 1,8 a 2,0 determinados para a asserção da ausência de contaminação.

O resultado completo do experimento de purificação dos tRNAs está exposto na Figura 30. Em primeiro lugar, é possível analisar a efetividade da primeira parte do processo de purificação, que diz respeito ao enriquecimento da fração de RNAs pequenos na amostra, olhando para o poço 3. Percebe-se que a maior parte dos RNAs presentes na parte superior do gel no poço do RNA total acaba sendo excluído da amostra de interesse, livrando-a de possíveis interferentes para a próxima etapa experimental, de hibridização do RNA aos oligos biotinilados. Os poços seguintes mostram 4 diferentes eluições de cada uma das espécies de tRNA, deixando em evidência os tRNAs purificados e os oligos biotinilados que também são eluídos das beads em quantidades moderadas. Os tamanhos das moléculas

condizem com o esperado: 87 pares de base para o denominado tRNA^{Sec} 1 e 71 pares de base para o tRNA^{Sec} 2.

A eluição destas amostras do gel de poliacrilamida ureia para dar prosseguimento às demais etapas experimentais mostrou-se um desafio maior do que o esperado. Principalmente no que diz respeito ao rendimento do processo como um todo, chegando ao final de todo o processo de purificação com quantidades ínfimas de RNA para levar adiante. Este processo ainda deve ser otimizado, e partes do processo como um todo precisam ser melhoradas para obtenção de melhores rendimentos. Para comprovar que o material tinha sido eluído do gel ainda que em quantidades pequenas, foi realizada uma reação de RT-PCR para cada uma das diferentes amostras de tRNA, e o resultado pode ser observado na Figura 31. A reação de RT-PCR comprova que as moléculas corretas foram purificadas do pool de RNA total.

Figura 30 - Gel de SDS-PAGE com ureia mostrando as bandas de purificação dos tRNAs. O primeiro poço contém a amostra de RNA total após enriquecimento da fração de RNAs pequenos. Seguem-se 4 poços de eluição do tRNA^{Sec} 1 e 4 poços de eluição do tRNA^{Sec} 2. As bandas de purificação são bem sutis, enquanto as bandas mais fortes visualizadas mais abaixo no gel correspondem aos oligonucleotídeos biotinilados eluídos juntamente com as amostras.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 31 - Gel de agarose 1% mostrando o resultado da RT-PCR para as duas diferentes moléculas de tRNA. Os dois primeiros poços correspondem a RT-PCR de amostras eluídas do tRNA^{Sec} 1 enquanto os outros 2 poços correspondem à amostras eluídas do tRNA^{Sec} 2.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 qPCR – PCR quantitativo

Como descrito na seção 3.5, foram sintetizados 26 pares de primers para os candidatos a genes de referência, além dos pares de primers sintetizados para a realização dos experimentos de determinação da variação de expressão em si. Os experimentos para determinação da eficiência dos pares de primers foram os primeiros a serem realizados.

Aplicando as diluições necessárias e avaliando os Cts das amostras amplificadas foi possível determinar a eficiência de maneira satisfatória para 7 pares de primers diferentes até o momento. Considera-se satisfatória um valor de eficiência que varie entre 90% e 110%. Na Figura 32 é possível observar os experimentos de determinação da eficiência dos pares de primers sintetizados para os dois tipos diferentes de tRNA identificados em *N. gruberi*, aqui utilizados como exemplo.

Figura 32 - Resultados dos experimentos de determinação de eficiência dos pares de primers para os genes de $tRNA^{Sec}$ 1 e 2 (SEC1 e SEC2 respectivamente). As primeiras imagens (esq.) mostram as curvas de amplificação, evidenciando os valores de Ct utilizados para a plotagem do gráfico; as imagens seguintes (centro) mostram as curvas padrão desenhadas a partir dos valores de Ct obtidos, que fornecem o valor da eficiência em porcentagem; as últimas imagens (dir.) mostram a curva de melting, utilizada para provar que todo o DNA amplificado nesta amostra corresponde à mesma região.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Faz-se necessária agora a comprovação dos genes escolhidos como genes de referência. Isso somente será possível através de uma segunda etapa experimental, onde os pares de primers cuja eficiência já foi confirmada serão utilizados para amplificar amostras de cDNA provenientes de diferentes condições experimentais. A manutenção da taxa de expressão desses genes em cenários diferentes será suficiente para determiná-los genes de referência para um certo tipo de experimento, e esses poderão então ser utilizados como base para análises mais profundas de variação de expressão gênica.

5 Conclusões

Este trabalho acabou assumindo três frentes diferentes ao longo de sua realização com diferentes objetivos e, conseqüentemente, conclusões para cada uma delas.

Em primeiro lugar, os estudos com o domínio N-terminal da proteína SPS2 de *Naegleria gruberi* cumpriram seus objetivos na parte de expressão heteróloga e purificação da molécula, bem como na produção de anticorpos policlonais e a realização de ensaios imunoquímicos iniciais para determinação de características básicas da proteína. Problemas sérios de solubilidade da molécula, porém, acabaram por levar o projeto para um caminho diferente. A análise dos anticorpos policlonais levou a crer que sua especificidade não seja suficiente para realização de experimentos mais delicados, como é o caso da imunofluorescência, cujos resultados acabaram por mostrar-se inconclusivos. São necessários experimentos ulteriores, como uma espectrometria de massas, por exemplo, para determinar a especificidade dos anticorpos e identificar à quais moléculas o mesmo se liga com maior afinidade.

Os estudos referentes aos tRNAs identificados em *N. gruberi* também apresentaram sucesso em seus objetivos iniciais de isolamento e purificação das moléculas. Experimentos de RT-PCR comprovaram a purificação das moléculas corretas e o sucesso do ambicioso esquema de purificação proposto. Os objetivos restantes, de identificação do aminoácido carregado pelas moléculas de tRNA, bem como da mensuração da expressão relativa entre eles não foram concluídos devido à dificuldades experimentais. O primeiro caso, por conta da quantidade muito pequena de RNA recuperado utilizando o método de purificação proposto, que impossibilitava a continuação dos experimentos. Já o segundo, devido a atrasos na terceira parte do projeto, de determinação dos genes de referência para experimentos em *N. gruberi*, resultado necessário para a realização correta da quantificação relativa de expressão entre as moléculas.

A determinação dos genes de referência para experimentos de qPCR acabou tornando-se um experimento maior e consumindo mais recursos do que previamente esperado. A escolha de 13 candidatos a genes de referência, que conduziu à

síntese de 26 pares de primers cujas eficiências deveriam ser determinadas para dar prosseguimento ao restante dos experimentos acabou sendo um fator limitante para o término dos experimentos propostos com êxito. Ainda assim, 7 genes tiveram a eficiência de seus pares de primers determinadas de maneira satisfatória e os experimentos tendem a continuar para a realização do objetivo final.

6 Perspectivas

Seguindo o exemplo da seção anterior, as perspectivas aqui também serão apresentadas analisando as três frentes do trabalho realizado separadamente.

Para o prosseguimento dos estudos com a NgSPS2-NTD é necessário primeiramente determinar a especificidade dos anticorpos corretamente para que seja possível utilizados em outros contextos com a confiança necessária. Como já comentado anteriormente, análises de espectrometria de massas poderiam provêr um indício inicial da presença da proteína recombinante entre as moléculas reconhecidas pelos anticorpos. Além disso, no caso de partir para uma caracterização biofísica mais precisa da proteína, seria interessante estudar a utilização de novas construções deste domínio N-terminal, na tentativa de obtenção de proteínas heterólogas mais solúveis, que possibilitem a utilização de uma gama maior de técnicas experimentais. Até para a produção de anticorpos policlonais, seria mais interessante a proteína solúvel e em sua conformação nativa, para poder realizar a clivagem da Tiorredoxina com a qual ela é expressa fusionada e acabar com um dos viéses de dúvida na especificidade dos mesmos levantados pelo presente estudo.

Quanto aos experimentos com as moléculas de tRNA, os próximos passos se darão em direção à tentativa de novos aumentos na escala dos experimentos, com o intuito de chegar à etapa final de purificação das moléculas com uma amostra mais concentrada que possibilite a realização do restante dos experimentos propostos, tal qual a identificação dos aminoácidos carregados por cada uma das moléculas.

Os experimentos de determinação dos genes de referência para realização de experimentos de qPCR em *N. gruberi* são os que se encontram mais estruturados no momento. É necessária a determinação da eficiência dos pares de primers restantes e a realização de experimentos em condições reais com aqueles pares de primers cujas eficiências já foram determinadas para então poder afirmar se algum dos candidatos realmente apresenta as características necessárias para ser utilizado nos experimentos de qPCR que deseja-se realizar.

Referências

- 1 JONCKHEERE, J.F. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection. Genetics and Evolution*, v. 11, n. 7, p. 1520–1528, 2011
- 2 JONCKHEERE, J.F. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica*, v. 41, n. 4, p. 309–342, 2002.
- 3 DAFT, B.M. et al. Seasonal meningoencephalitis in Holstein cattle caused by *Naegleria fowleri*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, n. 6, p. 605–609, 2005.
- 4 SIDDIQUI, R.; KHAN, N.A. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 8, p. e3017, 2014.
- 5 RODRÍGUEZ-EZPELETA, N. et al. Toward resolving the eukaryotic tree: the phylogenetic positions of jakobids and cercozoans. *Current Biology*, v. 17, n. 16, p. 1420–1425, 2007.
- 6 HEUSER, M.; RAZAVI, L. Amebo-flagellates as research partners: the laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. *Methods in Cell Biology*, v. 4, p. 341–476, 1970. doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61759-8.
- 7 OPPERDOES, F.R. et al. *Naegleria gruberi* metabolism. *International Journal for Parasitology*, v. 41, n. 9, p. 915–924, 2011
- 8 FRITZ-LAYLIN, L.K. et al. The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early **Eukaryotic versatility**. *Cell*, v. 140, n. 5, p. 631–642, 2010.
- 9 SILVA, M.T.A. et al. Selenocysteine biosynthesis and insertion machinery in *Naegleria gruberi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 188, n. 2, p. 87–90, 2013..
- 10 BROWN, K.; ARTHUR, J. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition*, v. 4, n. 2b, p. 593–599, 2001.
- 11 MUSHAK, P. Potential impact of acid precipitation on arsenic and selenium. *Environmental Health Perspectives*, v. 63, p. 105–113, 1985..
- 12 SURAI, P.F. **Selenium in nutrition and health**. Nottingham: Nottingham University Press, 2007.
- 13 ROCOURT, C.R.B.; CHENG, W.H. Selenium supranutrition: are the potential benefits of chemoprevention outweighed by the promotion of diabetes and insulin resistance? *Nutrients*, v. 5, n. 4, p. 1349–1365, 2013.
- 14 VINCENTI, M. et al. Selenium for preventing cancer. **Cochrane Database System Review**, v. 3, 2015. doi: 10.1002/14651858.
- 15 PAPP, L.V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775–806, 2007.

- 16 Stadtman, T. C. Selenocysteine. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 65, p. 83-100, 1996.
- 17 BJÖRNSTEDT, M.; FERNANDES, A. P. Selenium in the prevention of human cancers. **EPMA Journal**, v. 1, n. 3, p. 389–395, 2010..
- 18 IP, C.; GANTHER, H. E. Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. **Carcinogenesis**, v. 13, n. 7, p. 1167–1170, 1992.
- 19 LABUNSKYY, V.M. et al. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 3, p. 739–777, 2014.
- 20 SCHMIDT, R. L.; SIMONOVIĆ, M. Synthesis and decoding of selenocysteine and human health. **Croatian Medical Journal**, v. 53, n. 6, p. 535–550, 2012.
- 21 TURANOV, A. A. et al. Biosynthesis of selenocysteine, the 21st Amino acid in the genetic code, and a novel pathway for cysteine biosynthesis. **Advances in Nutrition: an international review journal**, v. 2, n. 2, p. 122–128, 2011
- 22 FORCHHAMMER, K. Selenocysteine synthase. **RCSB Protein Data Bank**, v. 17, n. 15–16, p. 403, 1990.
- 23 FORCHHAMMER, K.; BÖCK, A. Selenocysteine synthase from Escherichia coli. Analysis of the reaction sequence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 10, p. 6324–8, 1991.
- 24 ALLMANG, C. et al. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: More molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta - general subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1415–1423, 2009.
- 25 COPELAND, P.R. et al. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. **EMBO Journal**, v. 19, n. 2, p. 306–14, 2000.
- 26 STOCK, T.; ROTHER, M. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta - general subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1520–1532, 2009.
- 27 NOINAJ, N. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of Escherichia coli selenophosphate synthetase. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 499–508, 2012.
- 28 LOW, S.C. et al. Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 37, p. 21659–21664, 1995.
- 29 WANG, K.T. et al. Crystal Structures of Catalytic Intermediates of Human Selenophosphate Synthetase 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, n. 4, p. 747–759, 2009.
- 30 FAIM, L. M. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of selenophosphate synthetases from Trypanosoma brucei and Leishmania major. **Acta Crystallographica F: structural biology and crystallization communications**, v. 69, n. 8, p. 864–867, 2013.

- 31 MATSUMOTO, E. et al. Structure of an N-terminally truncated selenophosphate synthetase from *Aquifex aeolicus*. **Acta Crystallographica F: structural biology and crystallization communications**, v. 64, n. 6, p. 453–458, 2008.
- 32 LACOURCIERE, G.M.; STADTMAN, T.C. Utilization of selenocysteine as a source of selenium for selenophosphate biosynthesis. **BioFactors**, v. 14, n. 1–4, p. 69–74, 2001.
- 33 SCULACCIO, S. A. et al. Selenocysteine incorporation in Kinetoplastid: Selenophosphate synthetase (SELD) from *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 162, n. 2, p. 165–171, 2008.
- 34 ITOH, Y. et al. Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 5, p. 1456–1469, 2009.
- 35 LACOURCIERE, G. M. Biosynthesis of selenophosphate. **BioFactors**, v. 10, n. 2–3, p. 237–244, 1999.
- 36 LACOURCIERE, G. M. et al. *Escherichia coli* NifS-like proteins provide selenium in the pathway for the biosynthesis of selenophosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23769–23773, 2000.
- 37 MARIOTTI, M. et al. Evolution of selenophosphate synthetases: Emergence and relocation of function through independent duplications and recurrent subfunctionalization. **Genome Research**, v. 25, n. 9, p. 1256–1267, 2015.
- 38 MARIOTTI, M.; GUIGÓ, R. Selenoprofiles: profile-based scanning of eukaryotic genome sequences for selenoprotein genes. **Bioinformatics**, v. 26, n. 21, p. 2656–2663, 2010.
- 39 ZHANG, Y.; GLADYSHEV, V.N. Trends in selenium utilization in marine microbial world revealed through the analysis of the global ocean sampling (GOS) project. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 6, 2008. doi.org/10.1371/journal.pgen.1000095.
- 40 GEISLER, A.; BATES, F. The nutritional biochemistry of Selenium. Annual Review of Nutrition, v. 4, p. 478–489, 1984. doi: 10.1146/annurev.nu.04.070184.001353.
- 41 COMMANS, S.; BÖCK, A. Selenocysteine inserting tRNAs: An overview. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 335–351, 1999.
- 42 HUBERT, N. et al. The 9/4 secondary structure of eukaryotic selenocysteine tRNA: more pieces of evidence. **RNA**, v. 4, n. 9, p. 1029–1033, 1998.
- 43 STOCK, T. et al. In vivo requirement of selenophosphate for selenoprotein synthesis in archaea. **Molecular Microbiology**, v. 75, n. 1, p. 149–160, 2010.
- 44 KEELING, P.J. Genomics: evolution of the genetic code. **Current Biology**, v. 26, n. 18, p. R851–R853, 2016.
- 45 Meusburger, M. et al. RNA and DNA Editing. **Methods**, v. 718, n. 1, p. 259–270, 2011.

46 PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45, 2001.

47 NELSON, D. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.