

DETERMINAÇÃO DO KNOCKDOWN DOS GENES METILTRANSFERASE, DESACETILASE E PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO CREB DO *Schistosoma mansoni* NOS ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO PARA ANALISAR O SILENCIAMENTO DA EXPRESSÃO GÊNICA E A BUSCA DE NOVOS ALVOS TERAPÊUTICOS

Gabriela de Freitas Cruvinel, Dra. Fernanda Janku Cabral

Palavras-chave: Epigenética; alvos terapêuticos; *Schistosoma mansoni*.

OBJETIVOS: O objetivo do estudo é desenvolver o desenho dos primers para realizar a síntese de dsRNA, e após nocautear os genes selecionados através do método do RNAi. Com a finalidade de estudar os genes propostos: Smp_0255550, Smp_069380 e Smp_105910 do *S. mansoni*, para avaliarmos a importância desses genes na biologia do parasita.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho dos primers para a síntese do dsRNA: Os primers foram desenhados a partir do gene escolhido, que é uma parte da sequência DNA do *S. mansoni*. As sequências foram obtidas, através da busca no banco de dados *WormBase Parasite*,¹ onde obtivemos a sequência de codificação (CDS) em formato FASTA. Após obter os dados da sequência, utilizamos o *software* do Primer 3² para desenhar as sequências *forward* e a *reverse* do primer. Para isso, as sequências de DNA foram inseridas no campo indicado do site, e ajustamos as condições gerais para o desenho da sequência do primer e do tamanho do produto em número de bases. Ao definir o primer, o *software* forneceu os primers *left* e *right*, que compreendem o *reverse* e o *forward*, respectivamente. A temperatura de *melting*, também foi calculada neste processo. Para obter a sequência correta do reverso complementar, e checar o alinhamento correto da sequência de primer na sequência de DNA de estudo, foi necessário usar o *software Bioinformatics*,³ através da inserção da sequência do gene no campo, onde foi gerada a sequência complemento reverso. Ao obter todas as informações necessárias para o desenho do primer, é necessário realizar o alinhamento através do *Blast*,⁴ na categoria “Alinhamento Global”, para confirmar se as sequências do primer se alinham na sequência de interesse. Sendo a primeira para o alinhamento do *forward*, e o segundo para o alinhamento do *reverse*. É necessário preencher os campos com o primer obtido a partir do *Primer 3* e com a sequência de codificação do gene, no caso do *forward*. E para o *reverse*, preencher o campo com a sequência do complemento reverso, obtido no *Bioinformatics*.

Após realizar essas etapas, é necessário confirmar a sequência do gene que codifica o domínio da proteína. Isto é feito através da análise da sequência através do algoritmo *Blast*,⁴ na categoria “*blast x*”. É preciso completar os campos com as informações desejadas pelo site selecionando “*Ref seq protein*” para a base de dados e “*Schistosoma mansoni*” para o organismo.

Árvore filogenética: Todas as análises foram realizadas usando *bash scripts* baseados em arquivos GFF e *Gene Prediction Translations* (pep.fa) recuperados do banco de dados de dados de *Schistosoma Genomic Resource S. mansoni*.⁵ Essas análises foram feitas em colaboração com o grupo de bioinformática do Prof. Dr. Matheus de Souza Gomes da Universidade Federal de Uberlândia. Caracterização da proteína foi realizada baseada na posição e presença de domínios conservadores e amino ácidos com sítios ativos usando PFAM⁶ e *Conserved Domains Database* (CDD).⁷ O alinhamento compreende procedimentos de utilização de ClustalX 2.1⁸ para alinhar proteínas em diferentes classes de histonas modificadoras em *S. mansoni* e seus ortólogos de *S. haematobium* e *H. sapiens*. Parâmetros padrões foram mantidos para a múltipla sequência de alinhamento. Os domínios da sequência de proteínas foram visualizados pelo programa WebLogo 2.8.2.⁹ As análises filogenéticas foram realizadas usando a proteína putativa do *S. mansoni* e suas proteínas ortólogas no programa MEGAX com o método Neighbor-joining.^{10,11} A árvore de consenso foi obtida usando “2000 *bootstraps*”. A distância evolucionária foi calculada usando o modelo JTT.¹²

RESULTADOS

Desenho dos primers para a síntese do dsRNA

Os alinhamentos corretos dos genes estão a seguir:

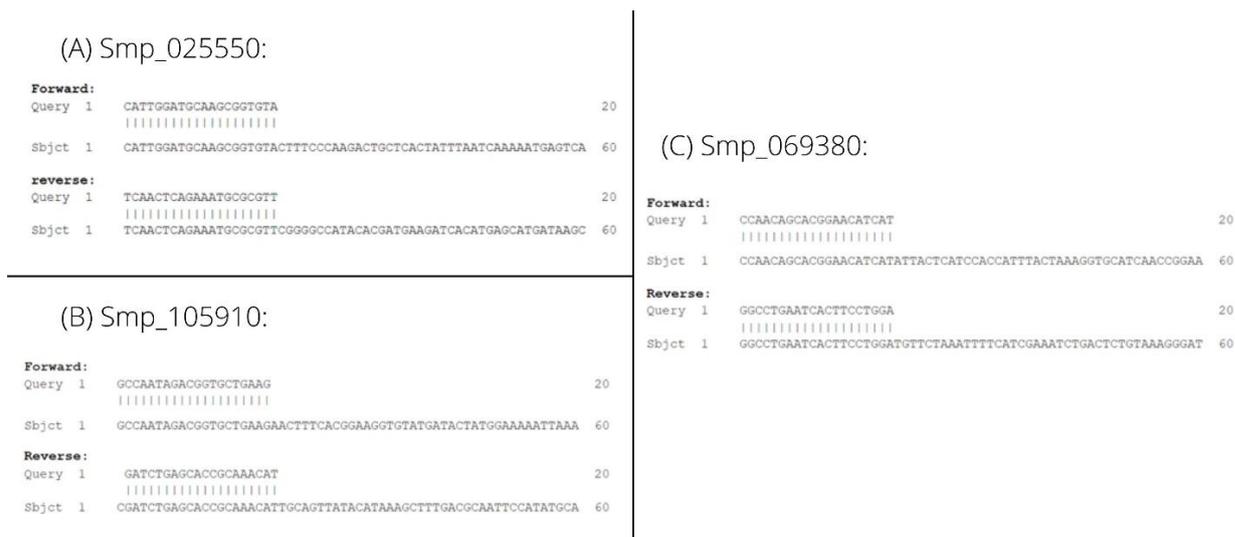


Figura 1 - Alinhamento dos primers *forward* e *reverse*. Gerado pelo Alinhamento Global do Blast.

As informações do gene, o primer com o T7 e os dados do primer mCherry, baseado no artigo do Stefanic et al,¹³ estão a seguir:

Nome	Gene ID	Primer 5'-3'	Nº pb	Tamanho do produto	TM (°C)
Protein arginine N-methyltransferase	Smp_025550	Forward T7: TAATACGACTCACTATAGGG CATTGGATGCAAGCGGTGTA	106	235	FORWARD: 58,91°C REVERSE: 58,77°C
		Reverse: TCAACTCAGAAATGCGCGTT			
		Forward: CATTGGATGCAAGCGGTGTA			
		Reverse T7: TAATACGACTCACTATAGGG TCAACTCAGAAATGCGCGTT			

Tabela 1 – Dados referentes ao gene e ao primer. Nome e identificação do gene para identificá-lo no banco de dados; sequência do primer *forward* e *reverse*, já com a sequência do T7¹³; Número de pares de bases e tamanho do produto gerado no Primer 3; Temperatura de Melting.

Nome	Gene ID	Primer 5'-3'	Nº pb	Tamanho do produto	TM (°C)
CREB-binding protein 1 (SmCBP1)	Smp_105910	Forward T7: TAATACGACTCACTATAGGG GCCAATAGACGGTGCTGAAG	404	316	Forward: 58,99° C Reverse: 58,91° C
		Reverse: GATCTGAGCACCGCAAACAT			
		Forward: GCCAATAGACGGTGCTGAAG			
		Reverse T7: TAATACGACTCACTATAGGG GATCTGAGCACCGCAAACAT			

Tabela 2 – Dados referentes ao gene e ao primer. Nome e identificação do gene para identificá-lo no banco de dados; sequência do primer *forward* e *reverse*, já com a sequência do T7¹³; Número de pares de bases e tamanho do produto gerado no Primer 3; (TM) Temperatura de Melting.

Nome	Gene ID	Primer 5'-3'	Nº pb	Tamanho do produto	TM (°C)
------	---------	--------------	-------	--------------------	---------

Putative histone deacetylase 4, 5	Smp_069380	Forward T7: TAATACGACTCACTATAGGG CCAACAGCACGGAACATCAT	3770	174	Forward: 58,83° C Reverse: 59,38° C
		Reverse: GGCCTGAATCACTTCCTGGA			
		Forward: CCAACAGCACGGAACATCAT			
		Reverse T7: TAATACGACTCACTATAGGG GGCCTGAATCACTTCCTGGA			

Tabela 3 – Dados referentes ao gene e ao primer. Nome e identificação do gene para identificá-lo no banco de dados; sequência do primer *forward* e *reverse*, já com a sequência do T7¹³; Número de pares de bases e tamanho do produto gerado no Primer 3; (TM) Temperatura de Melting.

Nome	Gene ID		Primer 5'-3'
mCherry control	AY678264	Cherry-T7-forward	TAATACGACTCACTATAGGG ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
		Cherry-reverse	TTACTTGTACAGCTCGTCC
		Cherry-forward	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
		Cherry-T7-reverse	TAATACGACTCACTATAGGG TTACTTGTACAGCTCGTCC

Tabela 4 – Sequência do primer mCherry, *forward* e *reverse*. Controle dos primers. Baseado no artigo do Stefanic et al.¹³

Os Domínios dos genes estão representados a seguir

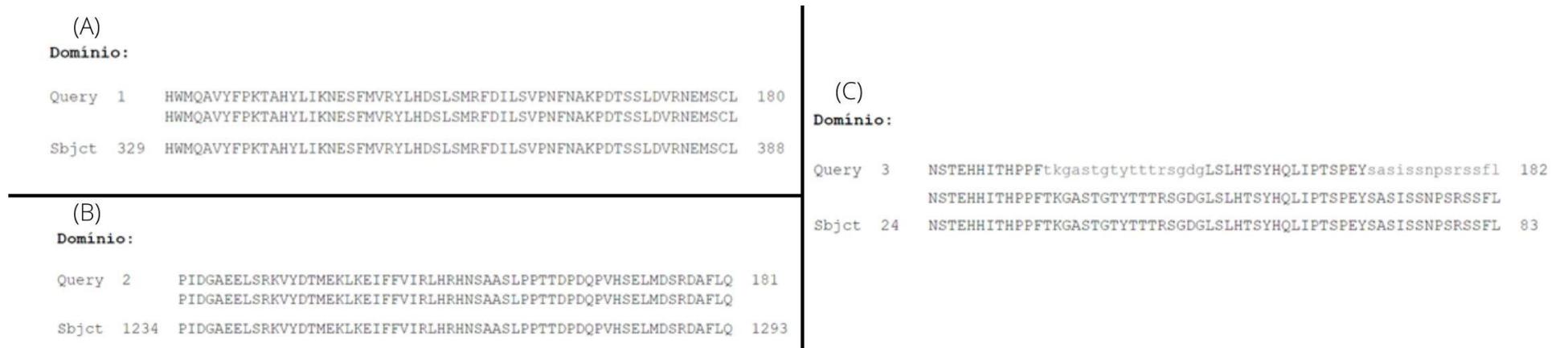


Figura 2 – Imagens geradas utilizando o algoritmo blastx. **(A)** Domínio da proteína Metiltransferase codificado pelo gene proteína Arginina N-metiltransferase. **(B)** Domínio da proteína Acetiltransferase codificado pelo gene proteína 1 de ligação ao CREB (SmCBP1). **(C)** Domínio da proteína Desacetilase codificada pelo gene Histona putativa desacetilase 4,5.

➤ **Árvore filogenética**

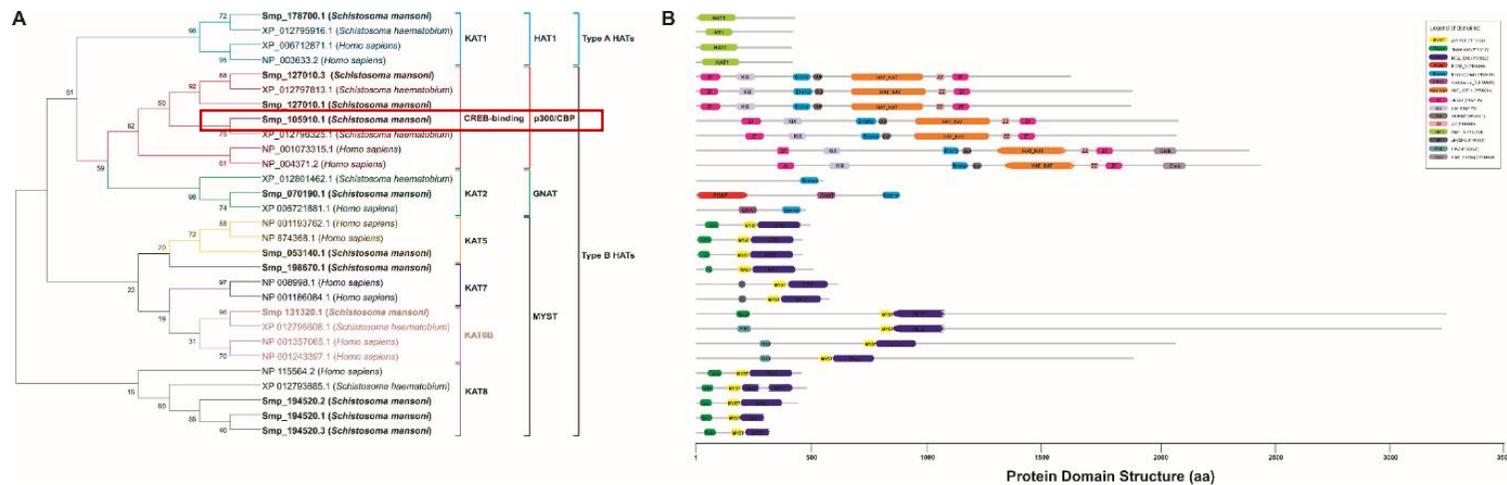


Figura 3 - **(A)** Árvore filogenética de proteínas Acetiltransferase geradas pelo programa MEGAX com proteínas do *S. mansoni* e proteínas ortólogas de *S. haematobium* e *H. sapiens*. **(B)** Distribuição de domínios conservados entre proteínas Acetiltransferase putativa de *S. mansoni* e suas proteínas ortólogas de *S. mansoni*.

DISCUSSÃO

Ao longo do último semestre, foi realizada a elaboração e montagem do experimento RNAi, abordando a escolha de estratégias para realizar o mesmo, e o Kit escolhido foi o T7 Ribomax da Promega. As decisões foram tomadas com base em artigos científicos e nos protocolos dos reagentes. Os primers foram aqui desenhados e alinhados, já estão sintetizados, para o início dos experimentos presenciais. Também dispomos dos RNAs extraídos e armazenado em freezer -80°C para a síntese do dsRNA através do Kit T7 Ribomax, que também já se encontra disponível no laboratório. As figuras e tabelas mostradas em “Resultados”, mostram o desenho dos primers, com as suas respectivas temperaturas de *melting*, tamanho dos transcritos e a presença da sequência do promotor T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), para a síntese do dsRNA. A árvore filogenética mostra a evolução dos três genes *smp_105910*, proteína de ligação ao CREB; *smp_069380*, histona putativa desacetilase 4,5; e *smp_025550*, enzima arginina N-metiltransferase. Sendo estes, então, comparados com *S. haematobium* e *H. sapiens*. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença dos domínios conservados e compará-los entre o *S. mansoni* e as outras espécies animais descritas, para através da análise RNAi, demonstrarmos a importância dessas proteínas com domínios das enzimas modificadoras de histonas na biologia do parasita e estudarmos como novos alvos terapêuticos. A presença conservada desses domínios também foi essencial para a construção dos oligonucleotídeos que serão utilizados para a síntese do dsRNA. A proteína de ligação ao CREB está equivalente ao XP_012796325.1 (*S. haematobium*), em relação à estrutura do domínio, e são compreendidos pelos domínios Zf-TAZ, KIX, Bromodomínio, DUF902, HAT_KAT11 e ZZ. A histona putativa deacetilase 4,5 é compreendida pelo domínio HDAC. E a enzima arginina N-metiltransferase é compreendida pelo domínio Metiltransferase, portanto são os domínios importantes para a função biológica dessas proteínas no parasita *S. mansoni*. Conforme o calendário proposto no último relatório, assim que for permitida a liberação para realizar os experimentos no laboratório, iniciaremos os estudos a partir da síntese do dsRNA, pois como foi dito acima, já possuímos o RNA extraído, não sendo necessário refazer a coleta de material biológico. A partir da síntese será realizado a incubação da fita de dsRNA nas culturas do parasita nos cinco estágios de desenvolvimento, para isso, é necessário cultivar as culturas referentes aos estágios do ciclo do parasita e testar o primer para verificar se o gene foi silenciado, através do RT-PCR, utilizando os primers para PCR em tempo real utilizados anteriormente no contexto do projeto FAPESP 2017/07364-9. A respeito controle do experimento, será realizado com o mCherry, descrito pelo Stefanic et al.¹⁸, que é um gene sintético. Durante a permanência remoto, iniciaremos a escrita do artigo, com os resultados de qRT-PCR e as análises *in silico* dos domínios mostradas acima. A efetiva publicação ocorrerá depois de obtidos os experimentos de silenciamento, aqui propostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- < <https://parasite.wormbase.org/index.html> >
- 2- < <https://primer3.ut.ee/> >
- 3- < http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html >
- 4- < <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >
- 5- < <http://schistodb.net> >
- 6- EL-GEBALI, Sara, et al. **The Pfam protein families database in 2019**. Nucleic Acids Research, 2019.
- 7- MARCHLER-BAUER et al. **CDD: NCBI’s conserved domain database**. Nucleic Acids Research, 2015.
- 8- LARKIN, M A, et al. **Clustal W and Clustal X version 2.0**. Bioinformatics, 2007.
- 9- CROOKS, G E, et al. **WebLogo: a sequence logo generator**. Genome Research, 2004.
- 10- KUMAR, S, et al. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms**. Molecular Biology and Evolution, 2018.
- 11- SAITOU; NEI. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. Molecular Biology and Evolution, 1987.
- 12- JONES; TAYLOR; THORNTON. **The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences**. Computer applications in the biosciences, 1992.
- 13- STEFANIC S, Dvořák J, Horn M, Braschi S, Sojka D, Ruelas DS, Suzuki B, Lim KC, Hopkins SD, McKerrow JH, Caffrey CR. **RNA interference in Schistosoma mansoni schistosomula: selectivity, sensitivity and operation for larger-scale screening**. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Oct 19;4(10):e850. doi: 10.1371/journal.pntd.0000850. PMID: 20976050; PMCID: PMC2957409.