UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

OBTENÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA RECOMBINANTE COMPONENTE DO COMPLEXO TELOMÉRICO LAGT1 DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

Bárbara Moraes Souza

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

OBTENÇÃO DE UMA NOVA PROTEÍNA RECOMBINANTE COMPONENTE DO COMPLEXO TELOMÉRICO LAGT1 DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

Bárbara Moraes Souza

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas, sob orientação da Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu IBB/UNESP.

Botucatu – SP

2013

Dedico este trabalho a todos que

contribuíram direta ou indiretamente à

minha formação acadêmica.

Agradeço a todos que contribuíram no decorrer desta jornada, em especial:

À Deus, a quem devo minha vida.

À minha família que sempre me apoiou nos estudos e decisões.

À orientadora Prof. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano que teve papel fundamental na concretização desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório pelo convívio e disponibilidade para me auxiliar em diversos momentos.

Aos meus amigos pelo apoio e companheirismo.

A FAPESP pelo apoio financeiro e institucional.

1. Resumo

Dentre as espécies do gênero *Leishmania* estão parasitas protozoários causadores das leishmanioses, doenças de importância médica com variável espectro clínico. O genoma nuclear destes protozoários apresenta 70Mb distribuídas de 34 a 36 cromossomos. A região telomérica de *Leishmania amazonensis*, o principal causador da leishmaniose tegumentar nas Américas, é composta pela repetição da sequência 5‟-TTAGGG-3‟ a qual, *in vitro* e *in vivo*, forma complexos proteína:DNA, denominados de LaGT1–3. As proteínas LaRbp38 e LaRPA-1 compõem, respectivamente, os complexos LaGT2 e LaGT3. Enquanto que o componente proteico que compõe LaGT1, de tamanho aproximado de 15kDa, não foi caracterizado e foi o alvo deste estudo.

Resultados anteriores mostraram que o componente do complexo LaGT1 é o mais abundante e específico para a simples-fita telomérica rica em G, permanecendo associado aos telômeros mesmo sob altas concentrações de sais e variações de temperatura. A purificação do componente proteico do complexo e subsequente análise do sequenciamento *de novo*, utilizando espectrometria de massa, resultou em uma sequência anotada como calmodulina putativa, cujo gene que a codifica apresenta-se em três cópias em *tandem* (*LmjF09.0910*, *LmjF09.0920* e *LmjF09.0930*) no genoma de *L. major.* A identidade de sequência do gene do parasito com outras calmodulinas ou proteínas ligantes de cálcio, portadoras do domínio conservado ligante de cálcio (do tipo EF-hand), indica que esta pode estar relacionada a alguma função em um cenário que envolva cálcio no contexto telomérico do parasito. Aqui ressalta-se que uma proteína portadora do domínio EF-hand, a KIP (proteína quinase dependente de DNA), foi descrita como parte do complexo telomérico humano por sua interação com a telomerase. Baseando-se nestas informações, o componente proteico de LaGT1 pode ser considerado uma nova proteína e exclusiva do parasito, podendo representar no futuro um alvo específico para drogas anti-parasitárias. Deste modo, esta proposta teve como principal objetivo a clonagem do gene que possivelmente codifica o componente de LaGT1, usando plasmídeo de expressão em sistema bacteriano. A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade e sua estrutura secundária investigada através de ensaio de dicroísmo circular. A localização subcelular de LaCALA2 no núcleo do parasito foi evidenciada através dos ensaios de Dot Blot e Imunofluorescência indireta utilizando-se soro imune específico anti-LaCALA2.

Palavras-chave: Leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, telômeros, proteína recombinante, calmodulina, interação proteína:DNA telomérico.

2. Abstact

Among the Leishmania genus are the causative agents of leishmaniasis, a medical important disease that presents a large spectrum of clinical presentations. The protozoa nuclear genome has 70Mb distributed in 34-36 chromosomes. Telomeres of *L. amazonensis*, one of the main ethiologic agents of cutaneous leishmaniais in the Americas, is composed by the conserved repetitive sequence 5'-TTAGGG-3', which presents *in vitro* and *in vivo* protein:DNA complexes, called LaGT1 - 3. The proteins LaRbp38 and LaRPA -1 compose respectively, LaGT2 and LaGT3 complexes. However, the protein component of LaGT1 (~15kDa) was not characterized and was the main goal of this study.

Previous results showed that the component of LaGT1 complex is the most abundant and specific for single-stranded telomeric G-rich, remained associated with telomeres even under high salt concentrations and temperature variations. The purification of the protein component of the complex and subsequent sequencing analysis *de novo* using mass spectrometry, resulted in a sequence annotated as putative calmodulin, which gene that encodes is in three *in tandem* copies (LmjF09.0910, LmjF09.0920 and LmjF09.0930) in the genome of *L. Major*. The identity sequence of the parasite gene with other calmodulins or calcium ligands proteins, carrying the conserved calcium binding domain (EF-hand), indicates that this may be related to some function in a scenario involving the parasite calcium telomeric context. Here we emphasize that a protein with EF-hand domain, the KIP (DNA-dependent protein kinase), was described as part of the human telomeric complex by its interaction with telomerase. Based on this information, the protein component of LaGT1 can be considered a new protein in the parasite, which may represent in the future a specific target for anti-parasitic drugs. Thus, this proposal was aimed at cloning the gene that encodes the possibly component of LaGT1 using expression plasmid bacterial system. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and its secondary structure was investigated using circular dichroism assay. The subcellular localization of LaCALA2 in the parasite nucleus was demonstrated by Dot blot and indirect immunofluorescence using a specific immune serum anti-LaCALA2.

Key Words: leishmaniasis, *Leishmania amazonensis*, telomeres, recombinant protein, calmodulin, protein:telomeric DNA interaction.

Sumário

1. Resumo 5
2. Abstact 6
3. Introdução e justificativas 9
3.1. *Leishmania* spp. e Leishmaniose 9
3.2. Biologia molecular de protozoários do gênero *Leishmania* 12
3.3. Características dos telômeros de *Leishmania spp* 13
4. Hipótese testada 16
5. Objetivos 20
6. Metodologias e forma de análise dos resultados 21
6.1. Cultivo de parasitas e extração de DNA genômico de *Leishmania amazonensis* 21
6.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) 22
6.3. Clonagem e subclonagem do gene LaCALA2 nos vetores de clonagem e de expressão 22
6.4. Transformação em bactéria 23
6.5. Mini-preparação de DNA plasmidial dos clones recombinantes 23
6.6. Sequenciamento 24
6.7. Expressão e purificação da proteína recombinante LaCALA2 em sistema bacteriano 25
6.8. Análise estrutural da proteína recombinante por espectroscopia de Dicroísmo Circular 25
6.9. Determinação da localização subcelular de LaCALA2 em formas promastigotas de *L. amazonensis.* 26
7. Resultados e Discussão 27
7.1. Amplificação por PCR do gene homólogo a LmjF09.0920 que codifica CALA2 em *L. amazonensis* 27
7.2. Clonagem no vetor de clonagem TOPO- pCR® 2.1 28
7.3. Subclonagem no vetor de expressão pET-28a(+) 33
7.4. Teste de mini-indução da proteína LaCALA2 em sistema bacteriano 37
7.5. Teste de solubilidade de LaCALA2 39
7.6. Purificação de LaCALA2 recombinante 39

7.7. Análise estrutural de LaCALA2 recombinante por espectroscopia de Dicroísmo Circular 40
7.8. Expressão de LaCALA2 em extratos de formas promastigotas: ensaio preliminar 41
7.9. LaCALA2 mostra predominante localização nuclear por Imunofluorescência indireta 42
8. Perspectivas 44
9. Referências 45

3. Introdução e justificativas

3.1. *Leishmania* spp. e Leishmaniose

Protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida, família Triponosomatidae e possuem como característica morfológica marcante uma organela fusiforme denominada cinetoplasto. Esta organela aloca alto número de cópias de DNA mitocondrial (ou DNA de cinetoplasto, kDNA) que se organiza sob a forma de maxi e minicírculos (Simpson 1987; Akopyants, Matlib et al. 2004). Dentre as espécies distintas que compõem este gênero, estão espécies patogênicas que causam as leishmanioses que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma das doenças negligenciadas causadas por protozoário de maior importância em saúde pública (Who 2002).

As leishmanioses são um conjunto heterogêneo de doenças infecciosas que apresentam manifestações clínicas que variam desde uma pequena úlcera na pele até o acometimento de vísceras, sendo classificadas sob quatro formas clínicas: leishmaniose cutânea (CL), leishmaniose cutaneomucosa (MCL), leishmaniose cutânea difusa (DCL) e leishmaniose visceral. A CL culmina exclusivamente em lesões cutâneas restritas, ulcerosas ou não. A MCL caracteriza-se por lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens, formando lesões extensas que acabam por destruir os tecidos atingidos, afetando principalmente a boca, faringe e nariz. Uma variação da leishmaniose cutânea é a leishmaniose cutânea difusa, forma clínica de difícil tratamento na qual há presença de lesões difusas não ulceradas, manifestando-se em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em pacientes que haviam sido tratados da forma visceral. Finalmente, a leishmaniose visceral ou também chamada de calazar, apresenta-se como a forma mais €€grave, com quadros de febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia, alterações dermatológicas e anemia. Os parasitas têm elevado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides (Rey 2002).

O ciclo de vida destes parasitos apresenta-se entre dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. No hospedeiro vertebrado estão os mamíferos, dentre os quais roedores, canídeos, tamanduás, marsupiais e primatas, incluindo o homem, que servem

de reservatório para o parasit o. Neste caso, a *Leishmania* spp. encontra-se na forma intracelular, aflagelada e replicativa denominada amastigota.

No hospedeiro invertebrado, a fêmea do mosquito flebótomo, a *Leishmania* spp. encontra-se no trato digestivo, na forma flagelada denominada promastigota. A infecção do hospedeiro vertebrado tem início durante o repasto sanguíneo quando o mosquito infectado injeta na pele formas promastigotas metacíclicas que são fagocitadas por macrófagos, onde se diferenciam em amastigotas. As formas amastigotas multiplicam-se por divisão binária até o rompimento da célula parasitada. Os parasitas liberados são novamente fagocitados por células do sistema fago-monocitário do hospedeiro. O ciclo se completa quando o vetor realiza seu repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingerindo formas amastigotas de *Leishmania spp.* presentes no sangue. Estas voltam a se diferenciar em promastigotas no intestino do inseto, se multiplicam e se diferenciam para as formas metacíclicas que migram para a porção anterior do sistema digestivo do inseto podendo, assim, ser inoculadas em outro hospedeiro vertebrado (Rey 2001; Neves 2005). A figura 1 apresenta uma ilustração simplificada do ciclo biológico de *Leishmania amazonensis.*

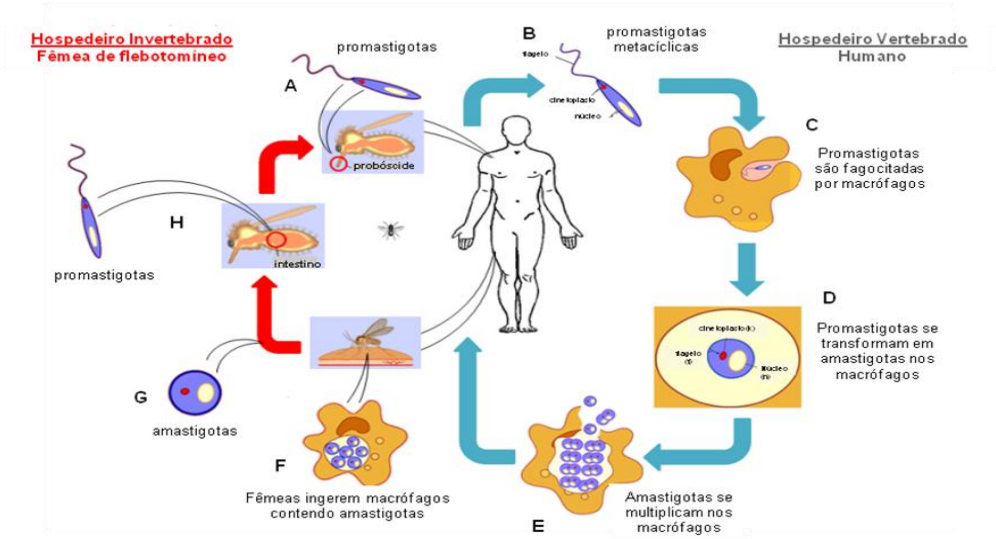


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. - (A) Fêmeas de flebotomíneos infectadas realizam o repasto sanguíneo e injetam (B) formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro. (C) As formas inoculadas são fagocitadas principalmente por macrófagos. (D) No interior do macrófago ocorre a fusão do fagossomo a lisossomos e as formas metacíclicas se diferenciam em amastigotas. (E) As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária até o rompimento da célula parasitada. (F) O vetor invertebrado realiza seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado e ingere macrófagos parasitados por (G) formas amastigotas. (H) No trajeto pelo trato digestivo do inseto vetor as formas amastigotas são liberadas e se diferenciam em formas promastigotas que se multiplicam ainda no sangue ingerido. Ocorre a diferenciação para formas metacíclicas que migram para o aparelho bucal do inseto, para serem inoculadas no próximo hospedeiro vertebrado (ilustração adaptada de da Silva et al., 2012).

A leishmaniose tem se disseminado pelo Brasil desde 1980, com predomínio nas regiões norte e nordeste. No mundo há incidência em todos os continentes excetuando-se apenas a Oceania e a região antártica. Segundo dados da OMS, as leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas e há outros 350 milhões de indivíduos em risco, com o surgimento de 2 milhões de novos casos e 70 milhões de mortes a cada ano nos 88 países que figuram como as regiões endêmicas desta zoonose. Destes países, 76 encontram-se em desenvolvimento, demonstrando a íntima relação entre esta parasitose e fatores socioeconômicos. Dentre os casos de leishmaniose visceral, aproximadamente 90% destes, ocorrem predominantemente em cinco países (Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão) e 90% dos casos da forma cutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Peru, Afeganistão, Irã, Arábia Saudita e Síria, demonstrando a importância de medidas de saúde pública (Who 2002).

Nas duas últimas décadas foi observado um aumento de quase 100% sobre todas as formas da doença, parte desse aumento é devido a uma melhora no fluxo de informação, mas ainda se encontra em expansão, sendo considerada pela OMS com uma das doenças cuja incidência mais cresce na atualidade, juntamente com a dengue e malária.

Visando reduzir a transmissão e considerando-se que não há nenhuma vacina disponível, as medidas profiláticas restringem-se ao controle de vetores e de reservatórios, como cães infectados, além da melhoria na habitação e boas condições de higiene.

A principal forma de tratamento é através da utilização de antimoniais pentavalentes, apesar deste método apresentar toxicidade e efeitos colaterais consideráveis ao paciente como dores musculares e alterações cardíacas. Como tratamento alternativo, as drogas anfotericina B e miltefosina são utilizadas, porém, também apresentam desvantagens como a elevada toxicidade, uso prolongado e alto custo (Johnston 1999). Aliado a isto, o grau de insucesso do tratamento das leishmanioses tem grande influência da resposta imune do hospedeiro (Alexander J. 2005) e também pode estar relacionado a fatores mediados pelo parasito, o qual apresenta características marcantes no metabolismo de DNA como a amplificação gênica e controle de expressão gênica em nível pós-transcricional (Wilkinson, Taylor et al. 2008).

3.2. Biologia molecular de protozoários do gênero *Leishmania*

Tripanossomatídeos do gênero *Leishmania* são organismos diplóides e assexuados, cujo genoma nuclear apresenta 70 Mega bases (Mb) de tamanho distribuídas em 34 a 36 cromossomos que variam entre 0,35 e 3,0Mb (Wincker, Ravel et al. 1996; Johnston 1999; Ivens, Peacock et al. 2005). Via de regra, nestes parasitas os genes não detêm íntrons, apenas quatro genes foram identificados possuindo regiões intrônicas. A transcrição gênica é feita em grupos, gerando RNAs precursores policistrônicos e o processamento desses RNAs é por meio de *trans-splicing*, embora o *cis-splicing* já tenha sido demonstrado para alguns genes. O mecanismo de *trans-splicing* envolve o acréscimo de mini-éxons com cap 7-metilguanosina na extremidade 5‟ e a adição da cauda poli-A, gerando mRNAs maduros (Stiles, Hicock et al.1999).

Devido à ausência de promotores gênicos individuais típicos, a regulação gênica ocorre em nível pós-transcricional: sítios de transcrição policistrônicos, localizados próximos a histonas H3 acetiladas podem representar um tipo geral de regulação em *L. major* (Thomas, Green et al. 2009). Outro processo é a presença da maquinaria de RNAi, descrita para *L. braziliensis* (Lye, Owens et al.). Além desses mecanismos, a estrutura da cromatina também pode desempenhar um papel importante no controle da expressão gênica destes parasitos (Leprohon, Legare et al. 2009).

Recentemente foram sequenciados os genomas de *L. infantum* e *L. braziliensis* e estes apresentaram pouca diferença na composição genética quando comparados com *L. major* (Ivens, Peacock et al. 2005). Portanto, parece que poucos genes do parasita são importantes para determinar a forma clínica da leishmaniose, embora o genoma do infectado também possa interferir neste processo (Peacock, Seeger et al. 2007).

Uma peculiaridade desses parasitos é que podem apresentar material genético adicional, organizados em mini-cromossomos multicópias ou DNA circular quando em condições adversas como estresse nutricional, seleção por drogas ou tentativa de deleção de um gene. Além disso, durante o ciclo celular não é verificada condensação da cromatina, o que dificulta análises citogenéticas (Beverley 1991; Segovia 1994).

3.3. Características dos telômeros de *Leishmania spp*.

Telômeros são complexos formados por DNA e proteínas, localizados na extremidade dos cromossomos. A estabilidade deste complexo garante a proteção destes terminais, impedindo a fusão destas pontas e também sua degradação pela maquinaria de reparo, promovendo a estabilidade genômica. A estrutura telomérica é composta por sequências repetidas em *tandem* (5'-TTAGGG-3'), terminando em uma protrusão 3' simples fita, a 3' *overhang*, que funciona como substrato para a elongação dos terminais. Esta elongação é dependente da atividade enzimática da telomerase, responsável pela replicação dessas extremidades, juntamente com complexos proteicos que se associam ao DNA (Dmitriev, Petrov et al. 2003; Chan and Blackburn 2004). Em humanos, leveduras, protozoários ciliados e *Trypanosoma brucei* a região telomérica organiza-se em forma de laço, o *t-loop*, ou sob a forma de uma estrutura denominada *G- quadruplex, "G-quartet"* ou ainda G4 DNA, que se sugere que confira proteção ao telômero, evitando a ação da maquinaria de reparo (Munoz-Jordan 2001; Teixeira and Gilson 2005; Gilson and Geli 2007).

Diversas são as proteínas que se associam aos telômeros, apresentando-se de forma dinâmica, variando de acordo com o ciclo celular, idade da célula e estímulos externos. Essas proteínas apresentam uma gama de funções que parecem estar relacionadas à região telomérica com a qual interagem (Stewart and Weinberg 2002; Smogorzewska and de Lange 2004). Em mamíferos, o complexo multiproteico denominado de telossomo ou *shelterin*, responsável pela manutenção da estrutura *t-loop* e regulação do acesso da telomerase, é dependente do comprimento telomérico (Liu, O'Connor et al. 2004; De Lange
2005). Esse complexo envolve proteínas que se ligam à dupla-fita telomérica, tais como TTAGG *Repeat binding Factors 1 and 2* (TRF 1 e 2), e à simples-fita rica em G, com representantes como a *Protection of Telomeres 1* (POT1), além de proteínas que interligam ambos complexos como a TIN2, TRF1 *Interacting Factor 2*, TPP1 e POT1 *Interacting Factor* (de Lange 2005).

Complexos proteicos similares à *shelterin* também são encontrados em leveduras e plantas (Price, Boltz et al.; Wellinger 2009), sendo que nas primeiras um complexo ligante de DNA telomérico, conhecido como CST (CDC13/Stn1/Ten1), interage com a RPA e se

associa especificamente com DNA telomérico rico em G na forma de simples fita, controlando a replicação dos telômeros através do recrutamento da telomerase, além de proteger os terminais cromossômicos de degradação e fusão (Schramke, Luciano et al. 2004; Gao, Cervantes et al. 2007; Wellinger 2009). Complexos similares ao CST de levedura também são encontrados em eucariotos superiores (Wellinger 2009). Outras proteínas, como componentes da maquinaria de reparo de DNA (KU70/80, Mre11 e RAD50), também estão envolvidas no recrutamento de proteínas teloméricas para que a telomerase possa realizar a elongação da fita (Longhese 2008). Esses achados indicam que o conceito atual de como a telomerase tem acesso aos telômeros curtos tem evoluído para um equilíbrio entre os complexos multiproteicos que compartilham muitas semelhanças, como a resposta a danos no DNA, incluindo a participação de várias proteínas envolvidas em outras vias do metabolismo de DNA (Giraud-Panis, Teixeira et al.; Gilson and Geli 2007; Lydall 2009).

Em *Leishmania* a estrutura das regiões teloméricas é similar a de outros eucariotos. Nas regiões adjacentes à estas extremidades localiza-se a região subtelomérica denominada LCTAS (*Leishmania conserved telomere associated sequence)* onde estão contidos blocos de sequências conservadas (CSB1 e CSB2), que são considerados sítios de ligação para proteínas teloméricas. Além destes, outros elementos subteloméricos não conservados também ocorrem nesses protozoários (Fu, Perona-Wright et al. 1998; Conte and Cano 2005).

Os telômeros dos tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania spp*. apresentam repetições em *tandem* de sequências de 6pb do tipo 5‟-TTAGGG-3‟ (Blackburn and Challoner 1984; Cano, 2001), que são mantidas pela telomerase e são idênticas a sequência dos telômeros de cromossomos humanos (Moyzis, Buckingham et al. 1988). Embora apresente semelhanças com outros eucariotos, pouco se conhece a respeito da função dos telômeros em cromossomos de *Leishmania* (Cano, 2001; Lira, Giardini et al. 2007).

Poucas proteínas teloméricas têm sido descritas para os tripanossomatídeos. Atualmente, o complexo telomérico mais bem descrito é o de *L. amazonensis*, sua telomerase foi parcialmente purificada através de cromatografia de afinidade pela sequência telomérica rica em G (Cano, Dungan et al. 1999; Munoz and Collins 2004; Giardini, Fernandez et al. 2011). Também foram identificados, através de métodos bioquímicos, complexos proteicos que se associam *in vitro e in vivo* ao DNA telomérico na

forma de dupla fita e simples fita (Lira et al. 2007a). Dentre estes estão duas proteínas que compõe dois desses complexos: LaRPA-1 (*Leishmania amazonensis Replication Protein A-1*) e a LaRbp38 (*Leishmania amazonensis RNA binding protein 38*) (Fernandez, Castellari et al. 2004; Lira, Siqueira Neto et al. 2007b; Siqueira-Neto, Lira et al. 2007) que interagem com a telomerase e co-localizam nos telômeros do parasita. Estas proteínas possivelmente são homólogos funcionais das proteínas CDC13 de levedura e POT1 de vertebrados e mamíferos, pois nenhuma sequência homóloga a elas foi encontrada no genoma destes parasitos após uma análise *in silico* em larga escala (Vasconcelos & Cano, dados não publicados).

Proteínas que interagem com a dupla-fita telomérica, *in vitro* ou *in vivo,* também foram descritas, dentre elas estão LaTBP1 (*Leishmania amazonensis Telomere Binding Protein 1*), LaTRF (*Leishmania amazonensis TTAGGG Repeat Binding Factor*), que compartilha similaridades com as TRF1/TRF2 de mamíferos, e LaRbp38 que também interage com a fita simples (Lira, Siqueira Neto et al. 2007b; Lira et al. 2007c; da Silva, Perez et al. 2010). Conforme descrito acima, a região telomérica dos cromossomos de humanos e de levedura já é bem caracterizada, ao contrário do que ocorre com os telômeros de *Leishmania*, que apesar de ser um eucarioto e compartilhar semelhanças não está totalmente elucidado. Deste modo, a identificação de novas proteínas teloméricas é fundamental para a maior compreensão da biologia destes parasitos.

4. Hipótese testada

Visando caracterizar proteínas que compõem telômeros de *L. amazonensis*, Fernandez et al. (2004) identificaram, através de ensaios de interação proteína:DNA, três complexos denominados *Leishmania amazonensis* G-strand telomeric proteins 1, 2 e 3 (LaGT1-3). Estes complexos foram identificados por interagirem *in vitro* com a sequência telomérica conservada 5‟-TTAGGG-3‟, sendo que os componentes proteicos dos complexos LaGT2 e 3 foram identificados por espectrometria de massa, respectivamente, como as proteínas LaRbp38 e LaRPA-1 (Fernandez, Castellari et al. 2004). Posteriormente, ambas as proteínas mostraram atividade de interação *in vivo* com o DNA telomérico (Lira et al., 2007b; Siqueira Neto et al. 2007). O componente proteico que compõe LaGT1, de tamanho aproximado de 15kDa, ainda não foi caracterizado e é alvo deste estudo.

Em ensaios preliminares, o componente do complexo LaGT1 apresentou-se como o mais abundante e altamente específico para a região telomérica rica em G, permanecendo associado aos telômeros mesmo sob altas concentrações de sais e na presença de competidores variados (Fernandez, Castellari et al. 2004). No intuito de se tentar purificar o componente proteico do complexo LaGT1, extratos nucleares de formas promastigotas de *L. amazonensis* foram fracionados em coluna de afinidade à sequência telomérica rica em G (Lira & Cano dados não publicados). As proteínas foram eluídas da coluna com diferentes concentração de sal (acetato de sódio, NaOAc) e a atividade de LaGT1 foi analisada por EMSA (ensaio de mobilidade eletroforética) (Fig. 2A, raias 3-6). As frações que continham atividade de LaGT1 foram reunidas e fracionadas em gel 15% SDS-PAGE (Fig. 2B, raia 3). É possível verificar a presença de três bandas proteicas de tamanhos entre 10 e 15kDa (Fig. 2B, raia 3). A identificação dessas proteínas foi realizada por espectrometria de massa.

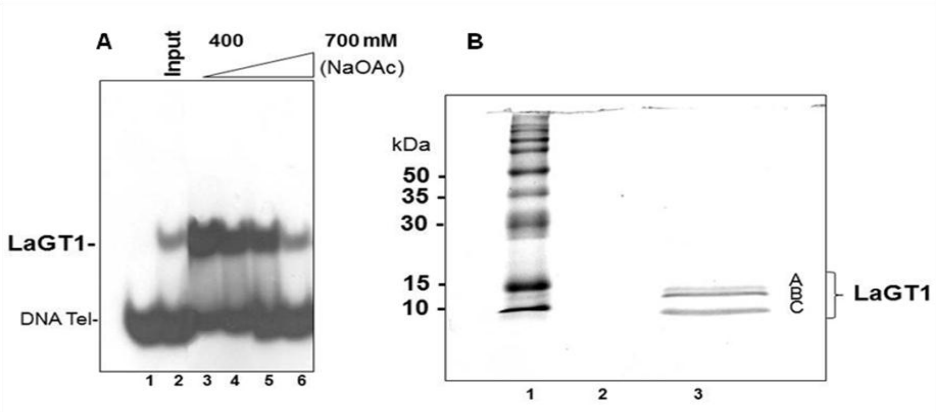
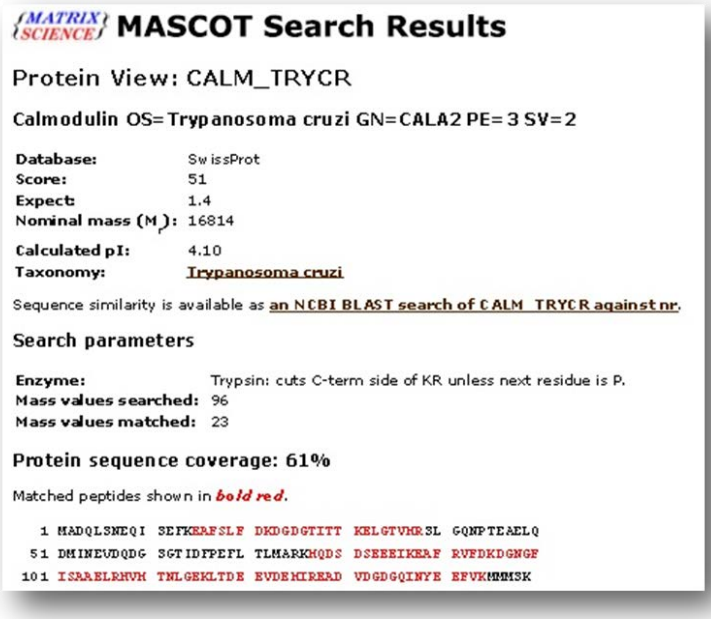


Figura 2. Isolamento e purificação do componente proteico de LaGT1. (A) Ensaio de EMSA de frações proteicas eluídas da coluna de afinidade com sequência telomérica rica em G, os quais foram obtidos por eluição das proteínas com diferentes concentrações de acetato de sódio (NaOAc, 400-700mM)(raias 3-6). A reação na raia 1 foi realizada sem extrato. Extrato de núcleo dos parasitas, input, na raia 2. (B) Gel 15% SDS-PAGE corado com azul de Coomassie, contendo os componentes purificados do complexo LaGT1, obtidos das frações com atividade mostradas em A . A purificação foi feita por afinidade em coluna de Neutravidin (Pierce) contendo o oligonucletídeo telomérico simples fita rico em G (DNA tel) biotinilado, que resultou em três bandas, com tamanhos entre 10 e 15kDa (A, B e C) na raia 3. A resina da coluna de afinidade utilizada na purificação, na ausência da fração proteica, foi aplicada na raia 2. Marcador de peso molecular broad-range (Bio-Rad), raia 1.

Na figura 3 está apresentado o resultado do sequenciamento por espectrometria de massa (Maldi Tof) dos peptídeos tripsinizados gerados das digestões *in gel* das três bandas individualizadas. As análises dos picos monoisotópicos dos peptídeos de cada uma das três bandas encontradas compondo LaGT1, foram feitas por meio do programa *Mascot Peptide Mass*.


MASCOT Search Results

Protein View: CALM_TRYCR

Calmodulin OS=Trypanosoma cruzi GN=CALA2 PE=3 SV=2

Database: SwissProt
Score: 51
Expect: 1.4
Nominal mass (Mr): 16814
Calculated pI: 4.10
Taxonomy: Trypanosoma cruzi

Sequence similarity is available as an NCBI BLAST search of CALM_TRYCR against nr.

Search parameters

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Mass values searched: 96
Mass values matched: 23

Protein sequence coverage: 61%

Matched peptides shown in bold red.

1 MADQLSNEQI SEFKEAFSLF DKDGDGTITT KELGTVMRSL GQNPTEAELQ
51 DMINEVDQDG SGTIDFPEFL TLMARKMQDS DSEEEIKEAF RVFDKDGNGF
101 ISAAELRHVM TNLGEKLTDE EVDEMIREAD VDGDGQINYE EFVKMMMSK

Figura 3. Resultado da análise dos picos monoisotópicos dos peptídeos de cada uma das três bandas encontradas compondo LaGT1 utilizando o programa *Mascot Peptide Mass.*

O resultado destas análises mostrou que os peptídeos obtidos nas três bandas correspondem à mesma proteína, identificada como CALA2 de *T. cruzi* ou calmodulina-like. O sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa alcançou uma cobertura de 61%, o que nos faz crer que realmente a(s) proteína(s) que compõem LaGT1 são da família da calmodulina. Para confirmar este achado, a sequência predita de *T cruzi,* CALA2, foi comparada ao banco de dados de proteínas de *L. major* (*L. major* GeneDB, http://www.genedb.org/Homepage/Lmajor), o que resultou em três sequências que apresentaram 100% de identidade com CALA2: LmjF09.0910, LmjF09.0920 e LmjF09.0930, cujos genes estão organizados em *tandem* no cromossomo 9 do genoma do parasito. Curiosamente, as proteínas codificadas por estes genes aparecem como três bandas co-migrantes no gel mostrado na Fig. 2B, o que sugere que estas proteínas embora idênticas, devem sofrer alguma modificação pós-traducional, o que explica a migração das mesmas com pesos moleculares diferentes.

A calmodulina é uma proteína intracelular receptora de cálcio, utilizada extensivamente por células eucariotas para mediar sinais responsivos a cálcio. O cálcio atua como um segundo mensageiro e tem papel central em células que são amplamente dependentes de mediadores, chamados de proteínas ligantes de cálcio (*calcium binding proteins,* CBP). As CBPs compartilham um domínio estrutural conservado denominado *EF-hand* e contribuem para o controle da concentração de cálcio no citosol, além de participarem de diversas funções celulares atuando como transportadores de cálcio através da membrana ou como sensores/moduladores de cálcio, por exemplo, decodificando os sinais de Ca^{2+} (Yanez, Gil-Longo et al. 2012). Em humanos, foi descrita uma proteína quinase dependente de DNA (*DNA-PKcs-interacting protein)* denominada KIP, que se associa à porção proteica da telomerase e que apresenta significante homologia à calcineurina B e à calmodulina (Lee, Yu et al. 2004). Uma busca no banco de dados de *L. major* para sequências similares à KIP humana resultou em vários *hits,* na ordem de identidade e similaridade: calcineurina B (LmjF21.1630), centrina (LmjF34.2390) e as putativas calmodulina-like, CALA2 de *L. major* (LmjF09.0910, LmjF09.0920 e LmjF09.0930), identificadas como componentes de LaGT1 por espectrometria de massa.

Baseado nos resultados preliminares e nestas informações, propusemos isolar um dos três genes que codifica a CALA2-like em *Leishmania* (*LmjF09.0920*) e cloná-lo em

vetor de expressão bacteriano para obtenção da proteína recombinante. Aqui vale lembrar que as condições ideais (i) de temperatura, (ii) de concentração de indutor (IPTG) e (iii) de tempo de indução, para a expressão do produto do gene de interesse foram respeitadas para essa proteína recombinante.

Para verificar se a proteína recombinante purificada apresentava-se enovelada, essa foi analisada por espectroscopia de Dicroísmo Circular (DC), uma técnica utilizada para estimar a estrutura secundária através da análise dos sinais característicos nos espectros de proteínas (Fasman 1996; Rodger 1997).

A hipótese que norteia esta proposta é de que o componente do complexo proteico LaGT1 possa ser uma nova proteína e exclusiva do parasito, podendo representar, no futuro, um alvo específico para drogas anti-leishmania.

5. Objetivos

Este projeto teve como objetivo principal caracterizar a sequência do gene que codifica o componente proteico de LaGT1, utilizando ferramentas de expressão e purificação de proteína recombinante em bactéria.

Os objetivos específicos desta proposta foram:

1. Amplificar por PCR e clonar o gene homólogo a *LmjF09.0920* que codifica CALA2 em *L. amazonensis* (LaCALA2) utilizando-se o vetor de clonagem TOPO- pCR® 2.1 e subclonagem no vetor de expressão pET-28a(+).
2. Expressar o produto da construção pET-28a(+) - LaCALA2 em sistema bacteriano.
3. Purificar a LaCALA2 recombinante por cromatografia de afinidade.
4. Analisar a estrutura secundária da proteína recombinante por espectroscopia de dicroísmo circular.

6. Metodologias e forma de análise dos resultados

6.1. Cultivo de parasitas e extração de DNA genômico de *Leishmania amazonensis*

Formas promastigotas selvagens de *L. amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269, foram cultivadas em fase exponencial a 27ºC em meio de cultivo M199 1X (Earle) (Cultilab), pH 7,4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e solução de antibióticos (penicilina/estreptomicina com antimicótico (Cultilab)). As culturas do parasito foram mantidas em crescimento exponencial e monitoradas por contagem em Câmera de Neubauer.

O DNA genômico foi extraído de promastigotas originadas de culturas em fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram separados do meio de cultura por centrifugação, lavados em tampão PBS ("Phosphate Buffer Saline" NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4) contendo 2% de glicose e sedimentados por centrifugação a 10.000rpm por 30 segundos. Para proceder com a lise celular, os sedimentos foram suspensos em solução contendo 10mM Tris-HCl pH 7,5, 5mM EDTA pH 8,0, 100mM de cloreto de lítio e 0,1%Triton X-100. A mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente com agitação suave, seguida de 2-3 extrações com fenol:clorofórmio (vol/vol), fenol:clorofórmio:álcool iso-amílico (25:24:1) e precipitação com etanol absoluto na presença de 0,3M de acetato de sódio pH 5,2. Os ácidos nucleicos precipitados foram solubilizados em TE (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8,0), tratados com 10µg/mL de RNase A por 15 minutos a 37°C, seguido de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, precipitação do DNA com 0,3M de acetato de sódio pH 5,2 e etanol absoluto, com centrifugação a 10.000rpm por 30 minutos. Os sedimentos foram lavados com 75% etanol gelado e suspensos em tampão TE. A qualidade da extração e a concentração de DNA foram estimadas utilizando-se corrida eletroforética em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5µg/mL) em 0,5X TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA), por dosagem da DO_{260nm} em espectofotômetro com luz UV e a razão das leituras de absorbância em DO_{260} e DO_{280nm}.

6.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki, Gelfand et al. 1988) utilizamos DNA genômico *de L. amazonensis* como molde e iniciadores específicos que foram desenhados com base na sequência do gene *LmjF09.0920* que codifica CALA2 de *L. major*, contendo sítios de restrição para permitir a clonagem direcionada do gene no vetor de expressão bacteriano pET-28a(+). A reação de amplificação foi realizada nas condições que permitiram a amplificação do fragmento de DNA genômico contendo o gene de *L. amazonensis* homólogo a LmCALA2. As amostras obtidas foram estocadas a -20ºC para subsequentes análises de restrição, sequenciamento automático e clonagem em vetor de clonagem.

6.3. Clonagem e subclonagem do gene LaCALA2 nos vetores de clonagem e de expressão

Os produtos amplificados segundo item 6.2, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e submetidos à purificação e reação de ligação em vetor de clonagem TOPO (pCR® 2.1 – TOPO, Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante.

Estes recombinantes foram usados para transformar bactérias DH5-alfa, e analisados quanto à expressão de beta-galactosidade em placas de meio LB contendo ampicilina, IPTG e X-Gal. As colônias que apresentaram cor branca (recombinantes) foram isoladas e, em seguida, o sucesso desta clonagem foi confirmado por PCR de colônia usando os mesmos iniciadores utilizados para clonagem. Os produtos destas amplificações foram analisados em gel de agarose e os clones positivos foram escolhidos para extração de DNA plasmidial por mini-preparação (item 6.5) e sequenciamento automático (item 6.6). Os insertos contendo o gene foram subclonados no vetor de expressão em sistema bacteriano pET-28a(+) (Novagen), utilizando-se digestão com enzimas de restrição presentes em posição 5´ e 3´, flanqueando o gene, as quais também estão presentes no sítio de policlonagem do vetor pET-28a(+) (Figura 4). As reações de ligação foram realizadas na presença de T4 DNA ligase (Invitrogen), de forma que o gene fosse clonado direcionalmente e a proteína recombinante fosse expressa em fusão com o 6xHis-*tag* no N-terminal.

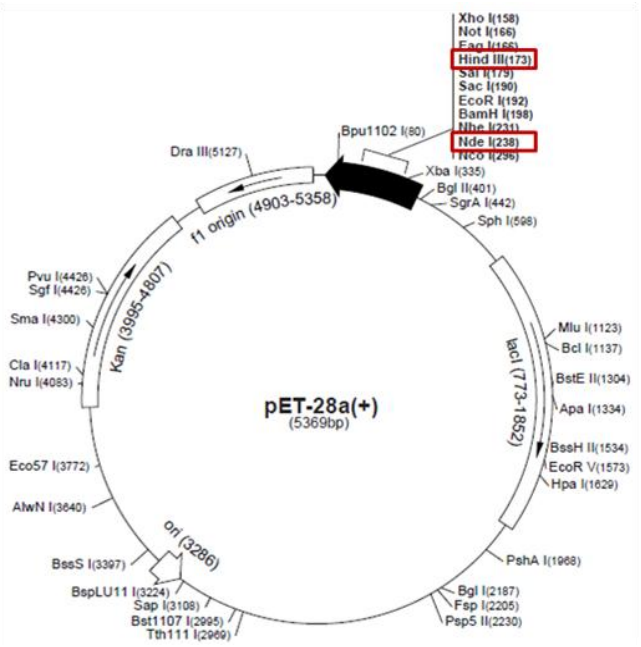


Figura 4. Mapa do vetor de expressão pET-28a(+). Este vetor apresenta as seguintes características: promotor T7, 6xHis-tag no N-terminal, sítios de múltiplas clonagens com sítio para as enzimas *Hind*III e *Nde*I, utilizadas nessa estratégia de clonagem, gene de resistência à Kanamicina, gene repressor do lac I, origem de replicação bacteriana.

6.4. Transformação em bactéria

Para transformação de bactérias, 100ng de DNA foram adicionados a 40µL de bactérias DH5-alfa termocompetentes e em seguida submetidas ao choque térmico pela a incubação de 1 minuto a 42°C, seguido imediatamente da incubação de 2 minutos no gelo.

As células foram recuperadas em 1mL de meio LB líquido e incubadas sob agitação constante de 300rpm a 37ºC por 1 hora. A seleção de transformantes foi feita em placas com meio LB semi-sólido Agar 1,5% contendo 100mg/mL de ampicilina, necessária para a seleção dos clones recombinantes. As placas foram mantidas de 14-18 horas a 37ºC.

6.5. Mini-preparação de DNA plasmidial dos clones recombinantes

Para extração de DNA plasmidial, os clones selecionados foram inoculados em 2mL de meio LB contendo a droga de seleção e incubados sob agitação constante de 300rpm a 37ºC por 18 horas. O volume total da cultura foi utilizado para a extração de DNA

plasmidial (mini-preparação) através do método de lise alcalina (Medina-Acosta and Cross 1993). A partir de uma cultura de 2mL de bactérias crescidas *overnight*, 1,5mL dessa cultura foram transferidos para um tubo de microcentrífuga e centrifugado a 13.200rpm por 30 segundos para baixar as células. O *pellet* de bactérias foi solubilizado em 100µL da solução I (glicose 60mM, Tris-Cl 25mM, EDTA 10mM). Depois de solubilizados, foram adicionados para lise celular 200µL da solução II (NaOH 0,2N, SDS 1%). Em seguida, para neutralizar a reação, foram adicionados 150µL da solução III (acetato de Potássio 5M, ácido acético 11,5%). A amostra foi centrifugada a 13.200rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, separando os *debris* celulares e DNA genômico do DNA plasmidial. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi submetido à extração de proteínas, adicionando 400µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após nova centrifugação nas mesmas condições, o DNA plasmidial presente no sobrenadante foi precipitado com etanol 100% e lavado com etanol 70%. Ao final, o DNA plasmidial foi ressuspendido na solução Tris:EDTA 10:1 contendo RNase 50µg/mL e estocado a –20°C.

6.6. Sequenciamento

Os DNAs recombinantes foram sequenciados utilizando-se o *kit BigDye* (Perkin Elmer – Applied Biosystems) e sequenciador automático *ABI prism 3100*. Foram utilizados iniciadores adequados aos sequenciamentos para os plasmídeos usados no estudo (Tabela 1 e Figura 5). Através dos serviços remotos dos programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) BLASTX e BLASTN as sequências foram comparadas aos bancos de dados que contem sequências de peptídeos ou DNA (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR e de sequenciamento automático.

Vetor	Iniciadores
pET-28a(+)	**T7 Senso:** 5'TAATACGACTCACTATAGGG3"
	T7 Antisenso: 5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3„
pCR 2.1-TOPO	**M13 Fw:** 5„GTAAAACGACGGCCAG3„
	M13 Rv: 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'

6.7. Expressão e purificação da proteína recombinante LaCALA2 em sistema bacteriano

Bactérias *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) contendo a construção pET-28a(+) - LaCALA2 foram submetidas ao teste de mini-indução inicial de forma a se obter a melhor condição de expressão da proteína recombinante e verificação de sua solubilidade.

As condições ótimas de expressão foram obtidas com 0,5mM de IPTG a 37ºC com o tempo de indução de 2 horas. Assim que se obteve as condições ótimas de expressão da proteína utilizando-se ensaios em pequena escala, a mesma foi obtida em larga escala. Extratos bacterianos foram obtidos por sonicação na presença de DNAse I e RNase A e a purificação da proteína foi realizada em coluna de afinidade ao 6xHis-tag, do tipo HisTrap HP (GE Healthcare) utilizando-se o cromatógrafo AKTAprime plus (Ge Healthcare).

As frações eluídas da coluna foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie e posteriormente as que continham a proteína foram reunidas para análise da concentração proteica pelo método de Bradford, que avaliou o grau de contaminação com DNA bacteriano utilizando-se a razão das leituras de absorbância em DO_{260} e DO_{280nm}. Utilizamos espectroscopia de dicroísmo circular para analisar o grau de enovelamento da mesma (Fasman 1996; Rodger 1997).

6.8. Análise estrutural da proteína recombinante por espectroscopia de Dicroísmo Circular

Para verificar se a proteína purificada está realmente enovelada, essa foi analisada por Dicroísmo Circular (DC), técnica utilizada para estimar a quantidade de estrutura secundária através da análise dos sinais característicos nos espectros de proteínas (Fasman 1996; Rodger 1997).

As medidas de DC de LaCALA2 recombinante foram realizadas no equipamento Jasco J-815 utilizando cubeta de quartzo de 0,5mm e os seguintes parâmetros: scanning speed 100 nm/min; band width 2nm; step resolution 0,5nm, temperatura 20°C. O espectro final corresponde a média de 20 acumulações, já subtraído da medida do tampão (branco) e transformado para a unidade elipcidade residual média [θ] (*degrees* $cm^2 dmol^{-1} residue^{-1}$). Todos os espectros foram coletados no intervalo de 195-260nm. A amostra foi medida na

presença de fluxo de N_2 para que O_2 presente no ar não interferisse na leitura dos dados dentro do equipamento. A concentração de proteína utilizada foi de 450µg.mL^{-1}. A proteína estava diluída em 50mM NaCl e 50mM fosfato de sódio. Esse experimento foi realizado em colaboração com o Prof. Marcos Fontes do departamento de Física e Biofísica da Unesp – Botucatu.

6.9. Determinação da localização subcelular de LaCALA2 em formas promastigotas de *L. amazonensis.*

Para este ensaio utilizou-se modificações do protocolo descrito em da Silva et al. (2010). Para os ensaios de imunofluorescência, as lâminas foram previamente lavadas e tratadas com 0,1% de poli-lisina (Poly-L-lysine hydrobromide - Sigma). 1x10^6 parasitas na forma promastigota (*L. amazonensis*) foram centrifugados a 5.000rpm, durante 5 minutos e lavados 2 vezes com 1mL de PBS 1X. Logo após, os parasitas foram fixados em 200µL de fomaldeído 1% durante 5 minutos e lavados novamente com PBS 1X. Em seguida, foram permeabilizados durante 5min à temperatura ambiente na presença de 10µL de 0,1% Triton X-100 (Calbiochem) e lavados com PBS 1X. Logo após, os parasitas foram incubados com o soro anti-LaCALA2 diluído na proporção 1:1.000 em solução BSA 4%, durante 4 horas a 4°C. Após a incubação, os parasitas foram lavados cuidadosamente com PBS 1X e então incubados por 2 horas a 4°C na ausência de luz, com o anticorpo secundário anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555 diluído 1:3.000 em solução 4% BSA. Em seguida, os parasitas foram lavados com PBS 1X, fixados em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina e selados utilizando-se 3µL de DAPI-Vectashield (Vector) e lamínula de vidro. As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements Ar 3.0. Esse experimento foi realizado em colaboração com o doutorando Marcelo Santos da Silva.

7. Resultados e Discussão

7.1. Amplificação por PCR do gene homólogo a LmjF09.0920 que codifica CALA2 em *L. amazonensis*

Formas promastigotas selvagens de *L. amazonensis* foram cultivadas e o DNA genômico dos parasitos foi extraído de cultura em fase exponencial de crescimento, conforme descrito no item 6.1.

Para a realização da PCR (item 6.2), a partir do DNA genômico extraído, iniciadores senso e antisenso foram desenhados visando amplificar a região genômica contendo o gene LaCALA2 do parasito. Estes iniciadores apresentam sítios para as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III, também presentes no sítio de policlonagem do vetor de expressão pET-28a(+) (Figura 4). Esta estratégia permitiu a ligação direcional do gene no vetor de expressão na mesma fase de leitura e em fusão à 6xHis-tag no N-terminal do vetor, para posterior purificação da proteína em coluna de cromatografia por afinidade. A sequência dos iniciadores está representada na figura 5. A figura 6 (linha 4) mostra o êxito da amplificação por PCR do gene que codifica LaCALA2, a partir do DNA genômico, com padrão de banda esperado correspondente a 450pb. As linhas 2 e 3 correspondem ao controle negativo da reação, com ausência do DNA molde.

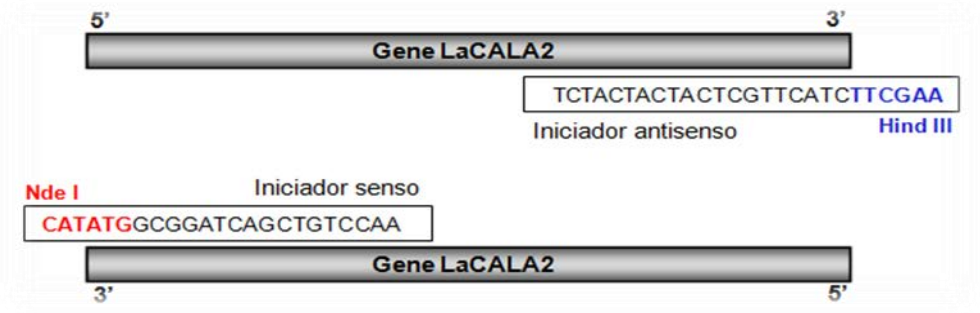


Figura 5. Mapa mostrando a hibridização no DNA genômico dos iniciadores senso e antisenso utilizados na amplificação do gene LaCALA2. Iniciador antisenso complementar à sequência 5‟3‟ do gene LaCALA2 contendo sítio para a enzima de restrição *Hind*III, em azul. Iniciador senso complementar à sequência 3‟5‟ com sítio de restrição da enzima *Nde*I, em vermelho.

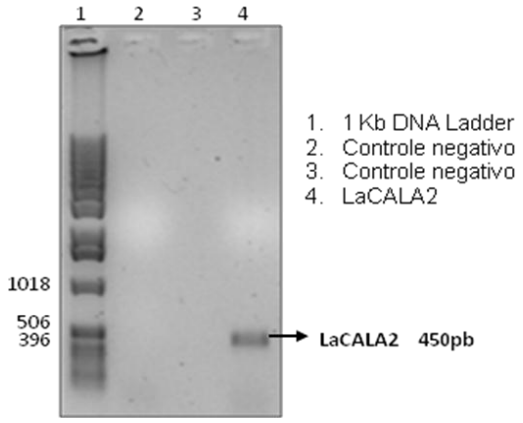


Figura 6. Amplificação do gene LaCALA2 por PCR. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo 1kb DNA Ladder (Invitrogen) na linha 1. Linhas 2 e 3 correspondentes ao controle negativo da reação, com ausência do DNA molde. LaCALA2 amplificado na linha 4 com 450pb.

7.2. Clonagem no vetor de clonagem TOPO- pCR® 2.1

O produto de LaCALA2, amplificado por meio da PCR, foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e submetido à purificação da banda de 450pb e subsequente reação de ligação no vetor de clonagem TOPO (pCR® 2.1 – TOPO, Invitrogen™). A reação de ligação foi transformada na bactéria DH5-alfa e colônias recombinantes foram submetidas à PCR de colônia (Figura 7, linhas 3-6) utilizando os mesmos iniciadores usados para a clonagem (Figura 5), como forma de verificar o êxito da ligação do inserto que contém o gene LaCALA2 no vetor TOPO. A linha 2 corresponde ao controle negativo da reação, com ausência do DNA molde.

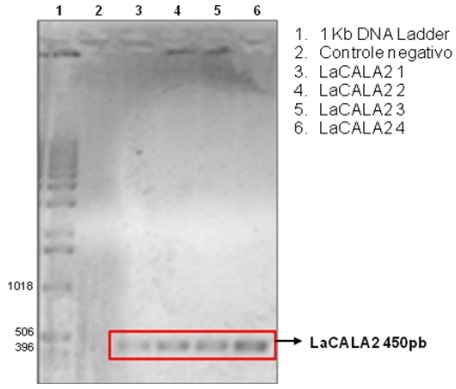


Figura 7. PCR das colônias provenientes da ligação LaCALA2-TOPO. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo 1kb DNA Ladder (Invitrogen) na linha 1. Controle negativo com ausência do DNA molde na linha 2. Linhas 3, 4, 5 e 6 correspondentes aos produtos do PCR de diferentes colônias provenientes da transformação da ligação LaCALA2-TOPO, com padrão de banda esperado de 450pb.

A partir dos quatro clones positivos prosseguiu-se com a cultura dessas bactérias, de maneira isolada, em meio LB contendo ampicilina, e posterior extração dos DNAs plasmidiais por mini -preparação (item 6.5). Para confirmação da presença de LaCALA2 no vetor de clonagem os DNAs plasmidiais foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI, que flanqueia o inserto no vetor TOPO (Figura 8). O clone denominado LaCALA2 - 4 obteve resultados positivos no PCR de colônia e padrão de bandas esperado após digestão com a enzima de restrição *EcoR*I, sendo o fragmento de 3908pb correspondente ao vetor TOPO linearizado e o fragmento de 450pb correspondente ao inserto contendo o gene LaCALA2 (Figura 9, linha 5). Os demais clones (Figura 9, linhas 2-4) não apresentaram o padrão de bandas esperado e aparentemente não contém o inserto com o gene LaCALA2.

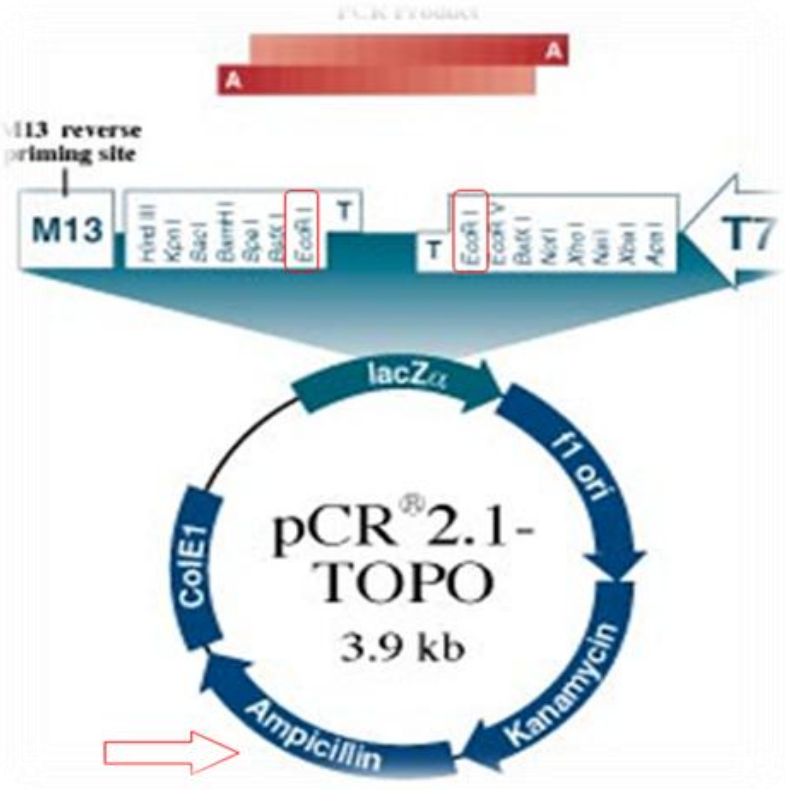


Figura 8. Mapa do vetor de clonagem pCR 2.1-TOPO. Em destaque os sítios para a enzima de restrição *Eco*RI, que flanqueiam o produto da PCR ligado, e o gene de resistência a ampicilina.

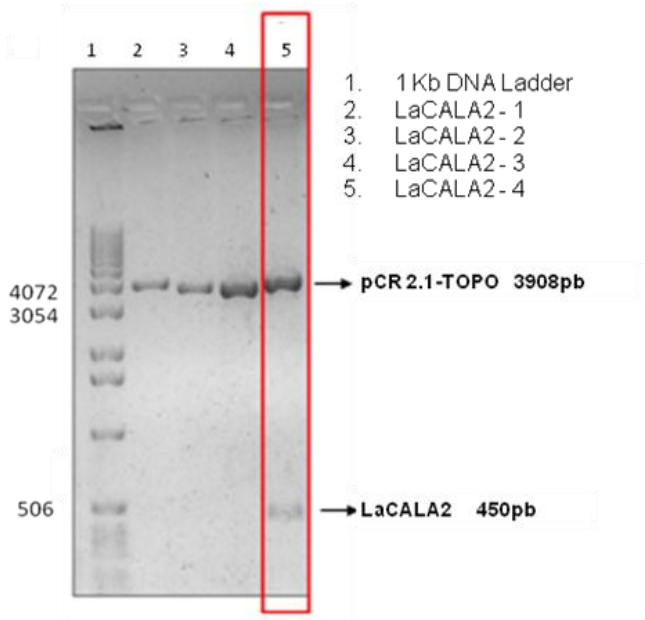


Figura 9. Digestão dos clones PCR de colônia positivos com *Eco*RI. Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo contendo 1kb DNA Ladder (Invitrogen) na linha 1. Nas linhas 2, 3 e 4 clones que aparentemente não contém o inserto com o gene LaCALA2. Na linha 5 clone recombinante mostrando a liberação do inserto contendo o gene LaCALA2 (450pb) e o vetor linearizado pCR 2.1-TOPO (3,9kb).

A confirmação da construção foi realizada por sequenciamento automático, onde foram obtidos quatro sequenciamentos por meio dos iniciadores senso e antisenso de LaCALA2 (Figura 5) e iniciadores do vetor TOPO (M13 Fw e M13 Rv) (Tabela 1). Os sequenciamentos comprovaram o sucesso da clonagem de LaCALA2 no vetor TOPO sem mutações. As sequências obtidas são mostradas na figura 10.

Sequência de nucleotídeos:

ATGGCGGATCAGCTGTCCAACGAGCAGATCTCCGAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCCTCTTTGACA
AGGACGGCGATGGCACCATCACCACCAAGGAGCTCGGCACCGTCATGCGCTCGCTCGGCCAG
AACCCCACCGAGGCGGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTGGACCAGGACGGCAGCGGCAC
CATCGACTTCCCCGAGTTCCTGACGCTGATGGCGCGTAAGATGCAGGACTCCGACTCGGAGGA
GGAGATCAAGGAGGCGTTCCGCGTGTTCGACAAGGACGGCAACGGCTTCATCTCCGCCGCGG
AGCTGCGCCACGTCATGACCAACCTCGGCGAGAAGCTCACGGACGAGGAGGTGGACGAGATG
ATCCGTGAGGCCGACGTGGATGGCGACGGCCAGATCAACTACGAGGAGTTCGTGAAGATGATG
ATGAGCAAGTAG

Sequência de aminoácidos:

MADQLSNEQISEFKEAFSLFDKDGDGTITTKELGTVMRSLGQNPTEAELQDMINEVDQDGSGTIDFP
EFLTLMARKMQDSDSEEEIKEAFRVFDKDGNGFISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADVDGD
GQINYEEFVKMMMSK

Figura 10. Sequência de nucletídeos, obtida através dos sequenciamentos com os iniciadores senso e antisenso de LaCALA2 e iniciadores do vetor TOPO (M13 Fw e Rv), e sequência traduzida de aminoácidos.

A sequência de aminoácidos de LaCALA2 foi submetida à uma análise *in silico* no banco de dados dos tripanossomatídeos (TritrypDB), usando Blastp, os resultados obtidos foram compilados na tabela 2. Analisando a localização cromossômica podemos notar que em muitos organismos aparecem de 1 a 5 cópias do gene, organizadas em *tandem* no mesmo lócus cromossômico. Este tipo de distribuição e organização genômica já havia sido evidenciada para o gene candidato a codificar o componente à LaGT1 (sequências homólogas a LaCALA2, obtidas no banco de dados de *L. major: LmjF09.0910, LmjF09.0920 e LmjF09.0930*). As identidades entre as sequências de genes de outros tripanossomatídeos (produtos hipotéticos na tabela 2) e a LaCALA2 variam de 50 a 100% e foram nomeados como: proteína hipotética desconhecida, calmodulina putativa (fragmento), calmodulina putativa, calmodulina e calmodulina (CALA2).

Tabela 2. Blastp entre LaCALA2 e sequências anotadas no banco de dados dos tripanossomatídeos (TritrypDB). Mostrando a localização cromossômica, linhagem do tripanossomatídeo, produto do gene e identidade com LaCALA2, respectivamente.

Localização Cromossômica	Linhagem do tripanossomatídeo	Produtos hipotéticos	Identidade com LaCALA2
TcCLB.507483.30	*Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like	Calmodulina putativa	100%
LbrM.09.0960	*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904		
LbrM.09.0970			
LbrM.09.0980			
LdBPK_090970.1	*Leishmania donovani* BPK282A1		
LdBPK_090980.1			
LinJ.09.0970	*Leishmania infantum* JPCM5		
LinJ.09.0980			
LmjF.09.0910	*Leishmania major* strain Friedlin		
LmjF.09.0920			
LmjF.09.0930			
LmxM.09.0910	*Leishmania mexicana* MHOM/GT/2001/U1103		
LmxM.09.0920			
LmxM.09.0930			
LtaP09.0940	*Leishmania tarentolae* Parrot-TarII		
TcCLB.507483.39	*Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like	Calmodulina (CALA2)	
TcCLB.506391.10	*Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo-like		
TcCLB.506391.20		Calmodulina putativa	
Tb427tmp.01.4621	*Trypanosoma brucei* Lister strain 427	Calmodulina	99%
Tb427tmp.01.4622			
Tb427tmp.01.4623			
Tb427tmp.01.4624			
Tb927.11.13020	*Trypanosoma brucei* TREU927		
Tb927.11.13030			

Tb927.11.13040			
Tb927.11.13050			
Tbg972.11.14490	*Trypanosoma brucei* gambiense DAL972	Calmodulina putativa	
Tbg972.11.14500			
Tbg972.11.14510			
Tbg972.11.14520			
TcIL3000_0_05490	*Trypanosoma congolense* IL3000	Proteína hipotética desconhecida	
TcIL3000_0_05500			
TcIL3000.11.13400			
TcIL3000.11.13410			
TcIL3000.11.13420			
TcIL3000_0_31130			
TcIL3000_0_31140			
TevSTIB805.11_01.13440	*Trypanosoma evansi* strain STIB 805	Calmodulina	
TevSTIB805.11_01.13450			
TevSTIB805.11_01.13460			
TvY486_1113900	*Trypanosoma vivax* Y486	Calmodulina putativa	
TcCLB.507483.50	*Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like	Calmodulina	
TvY486_1113890	*Trypanosoma vivax* Y486	Calmodulina putativa	98%
Tbg972.11.14480	*Trypanosoma brucei* gambiense DAL972	Calmodulina putativa (fragmento)	
TevSTIB805.11_01.13470	*Trypanosoma evansi* strain STIB 805	Calmodulina	100%
TcCLB.506389.79	*Trypanosoma cruzi* CL Brener Non-Esmeraldo-like	Calmodulina putativa	
Tb427tmp.01.1550	*Trypanosoma brucei* Lister strain 427		50%
Tb927.11.9790	*Trypanosoma brucei* TREU927		
Tbg972.11.10980	*Trypanosoma brucei* gambiense DAL972		
TevSTIB805.11_01.10090	*Trypanosoma evansi* strain STIB 805		

Além disso, LaCALA2 também compartilha identidade e similaridade com a proteína KIP1 humana nos domínios EF-hand (Figura 11). A proteína hKIP1 foi descrita como uma proteína quinase dependente de DNA (*DNA-PKcs-interacting protein)* que se associa à porção proteica da telomerase (Lee, Yu et al. 2004), sugerindo que a existência de proteínas que contém domínios do tipo EF-hand nos complexos teloméricos é conservada entre eucariotos.

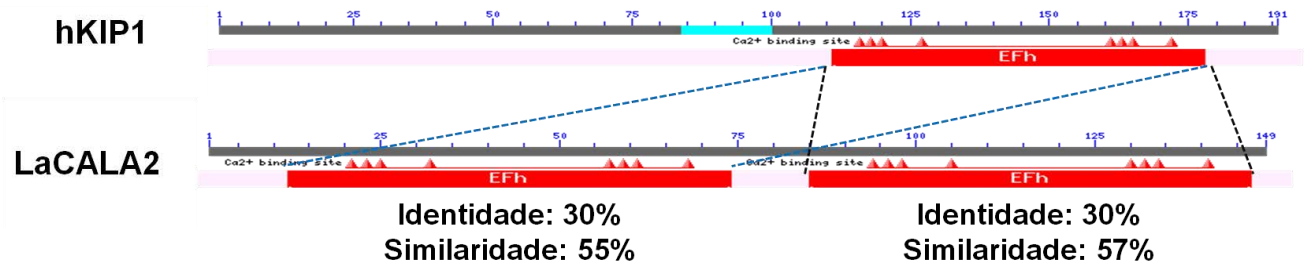


Figura 11. A proteína hKIP1 é parte da subunidade catalítica da DNA-proteína quinase que interage com a telomerase humana. LaCALA2 tem dois domínios que compartilham 30% de identidade e 55-57% de similaridade com o domínio EF-hand da hKIP.

7.3. Subclonagem no vetor de expressão pET-28a(+)

Bactérias DH5-alfa que contém o clone de interesse, denominado de LaCALA2 - 4, foram cultivadas em meio LB na presença de ampicilina. A cultura permitiu a geração de um maior número de cópias desse plasmídeo que foi extraído por mini-preparação. O DNA plasmidial obtido foi digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Hind*III, cujos sítios se encontram exclusivamente nos iniciadores desenhados, como forma de liberar LaCALA2 do vetor TOPO e permitir a ligação de LaCALA2 no vetor de expressão pET-28a(+). O vetor, sob a forma plasmidial, também foi digerido com as enzimas *Nde*I e *Hind*III. Os produtos das digestões foram analisados em gel de agarose 0,8% e os dois fragmentos de interesse obtidos, o inserto contendo LaCALA2 (450pb) e o vetor linearizado pET-28a(+) (5369pb), foram purificados do gel, submetidos a reação de ligação e posterior transformação em bactéria DH5-alfa (dados não mostrados).

Como forma inicial de verificar o êxito da ligação foram selecionadas 5 colônias provenientes da transformação e estas foram submetidas à PCR de colônia (Figura 12, linhas 3-8) utilizando os iniciadores do vetor pET-28a(+) (T7 senso e T7 antisenso, Tabela 1), estes iniciadores amplificam um fragmento de 749pb correspondente ao inserto contendo LaCALA2 mais porções do vetor pET-28a(+) (Figura 4). A linha 2 corresponde ao controle negativo da reação, com ausência do DNA molde. As linhas 3, 7 e 8 apresentaram a amplificação do produto esperado (749pb), confirmando a clonagem de LaCALA2 no vetor pET-28a(+) .

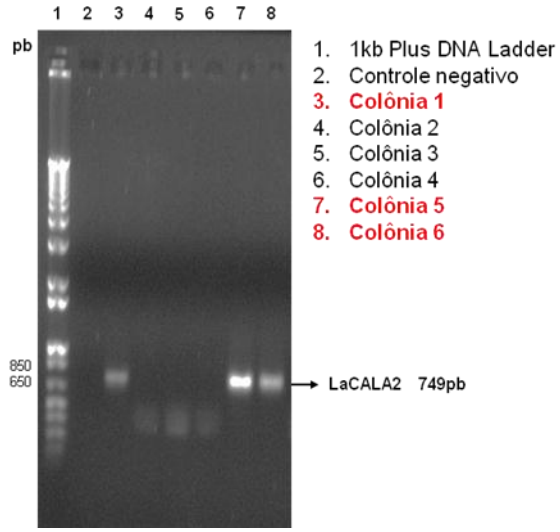


Figura 12. PCR das colônias provenientes da ligação pET-LaCALA2. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo contendo 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) na linha 1. Controle negativo com ausência do DNA molde na linha 2. Linhas 3, 7 e 8 correspondentes aos produtos do PCR de diferentes colônias provenientes da transformação da ligação pET-LaCALA2, com padrão de banda esperado de 749pb. As linhas 4, 5 e 6 não apresentaram a amplificação esperada.

As colônias 1, 5 e 6, que apresentaram o padrão de banda esperado, foram submetidas à extração do DNA plasmidial por mini -preparação (item 6.5) e este foi submetido à PCR com os iniciadores do vetor pET-28a(+) (Tabela 1). A linha 2 da figura 13 corresponde ao controle negativo da reação, com ausência do DNA molde. As linhas 3, 4 e 5 apresentaram a amplificação do produto esperado (749pb).

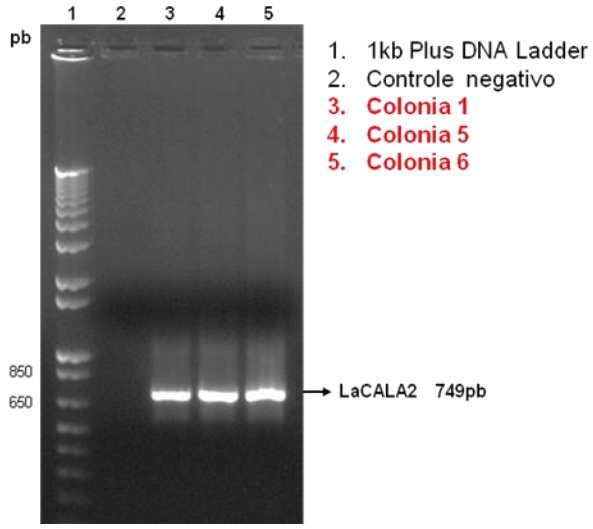
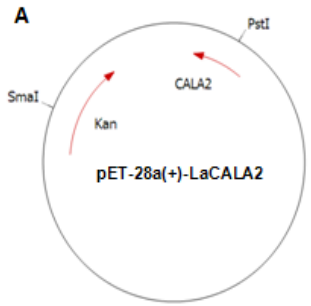


Figura 13. PCR a partir de DNA plasmidial das colônias provenientes da ligação pET-LaCALA2. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo contendo 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) na linha 1. Controle negativo com ausência do DNA molde na linha 2. Linhas 3, 4 e 5 correspondentes aos produtos de PCR a partir de DNA plasmidial das diferentes colônias prove€€€€nientes da transformação da ligação pET-LaCALA2, com padrão de banda esperado de 749pb.

A colônia 1 foi submetida à análise de restrição com as enzimas *Sma*I, que apresenta sítio único no vetor, e a enzima *Pst*I, que apresenta sítio único no inserto contendo LaCALA2 (Figura 14 A). A figura 14 B apresenta análises de restrição realizadas com o vetor vazio (pET) e com a construção pET-LaCALA2 com as respectivas enzimas utilizadas e padrão de bandas esperado mostradas na figura 14 C.

A



B

DNA	Enzima de restrição	Padrão esperado
pET	Sem enzima	Forma plasmidial - não há digestão
	*Pst*I	Forma plasmidial - não há digestão (ausência de sítio no vetor)
	*Sma*I	Linearização do plasmídeo (5369pb)
pET-LaCALA2	Sem enzima	Forma plasmidial - não há digestão
	*Pst*I	Linearização do plasmídeo (5758pb)
	*Sma*I	
pET	*Pst*I e *Sma*I	Linearização do plasmídeo (5369pb)
pET-LaCALA2		Bandas de 4206pb e 1552pb

C

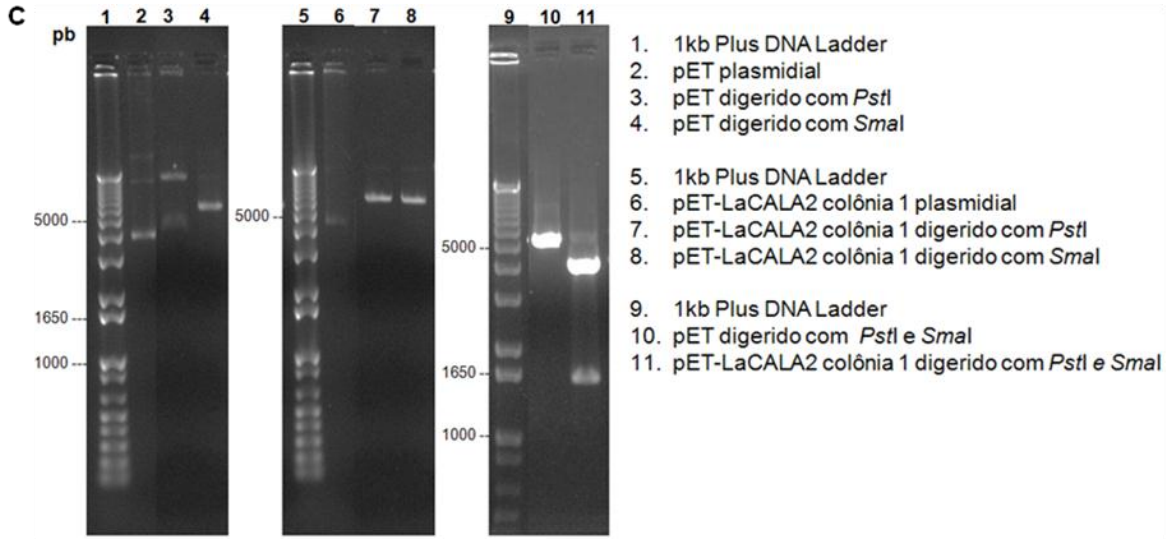


Figura 14. Análise de restrição do clone recombinante pET-LaCALA2. (A) Representação gráfica da construção pET-LaCALA2 com sítios para as enzimas de restrição *Pst*I e *Sma*I, localizados no inserto contendo LaCALA2 e no vetor, respectivamente. Kan representa a marca de resistência à kanamicina presente no vetor. (B) Padrões esperados correspondentes às análises de restrição da construção pET-LaCALA2 com as enzimas *Pst*I e *Sma*I. (C) Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos das digestões do vetor vazio e do clone recombinante pET-LaCALA2 com as enzimas *Pst*I e *Sma*I. Note que as digestões conjuntas com as enzimas *Pst*I e *Sma*I linearizam o vetor vazio (linha 10) e liberam um fragmento contendo uma porção do inserto mais o vetor de 1552pb.

Foi realizada uma segunda análise de restrição com a construção pET-LaCALA2 utilizando as enzimas *Hind*III e *Nde*I, que liberam o inserto contendo LaCALA2 (450pb) do vetor (5369pb) (Figura 15).

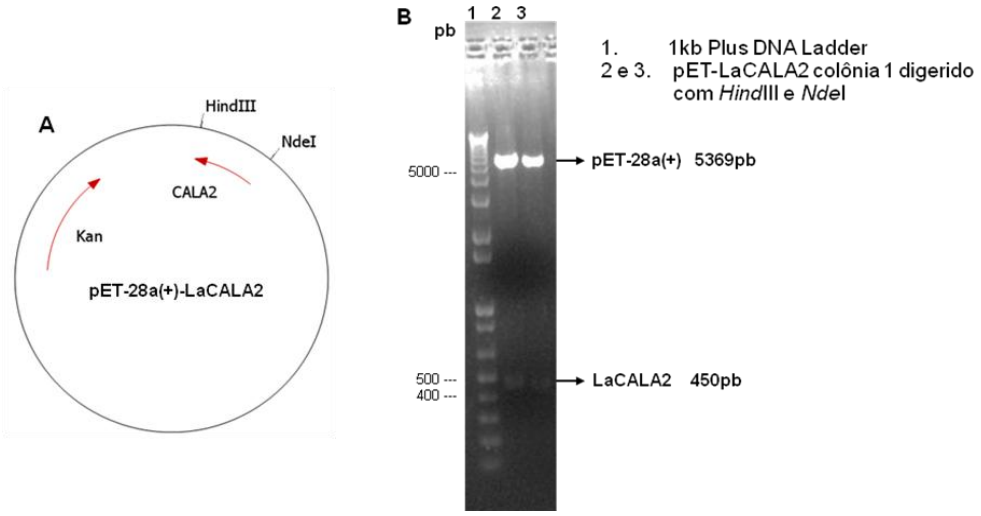


Figura 15. (A) Representação gráfica da subclonagem de LaCALA2 no vetor pET. (B) Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo, mostrando os produtos das digestões do clone recombinante pET-LaCALA2 com as enzimas *Nde*I e *Hind*III resultando na liberação do inserto contendo LaCALA2 (450pb) e do vetor pET (5.3kb) (linhas 2 e 3). Marcador de DNA 1kb Plus (Invitrogen) (linha 1).

A construção também foi confirmada por sequenciamento automático, onde foram obtidos quatro sequenciamentos por meio dos iniciadores senso e antisenso de LaCALA2 e iniciadores do vetor pET-28a(+) (T7 promotor e T7 terminador) (Figura 5 e Tabela 1). Os sequenciamentos comprovaram o sucesso da clonagem de LaCALA2 no vetor e ausência de mutações (dados não mostrados). A figura 16 apresenta um blast realizado com a sequência de nucleotídeos de LaCALA2 no banco de dados dos kinetoplastidas (Tritryp) e a posição do gene que codifica LaCALA2 no cromossomo 9 de *Leishmania major*, presente em 3 cópias em *tandem* (LmjF.09.0910, LmjF.09.0920, LmjF.09.0930).

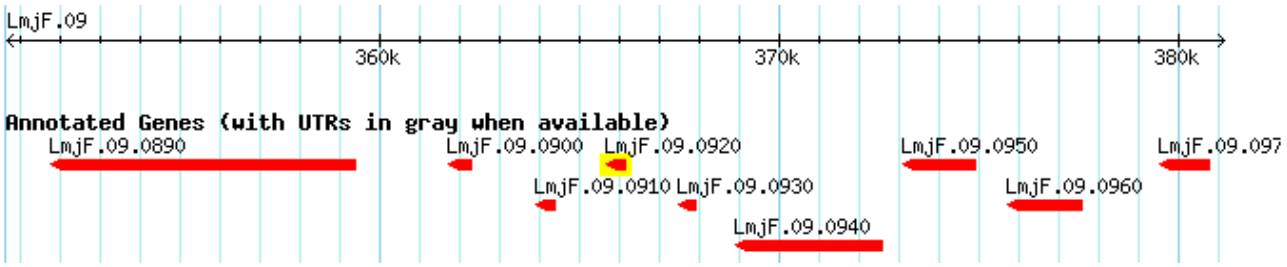


Figura 16. Blast realizado com a sequência de nucleotídeos de LaCALA2 no banco de dados Tritryp. O gene que codifica CALA2 apresenta-se em 3 cópias em *tandem* (LmjF.09.0910, LmjF.09.0920, LmjF.09.0930) no cromossomo 9 de *Leishmania major.*

7.4. Teste de mini-indução da proteína LaCALA2 em sistema bacteriano

O teste de mini-indução tem como objetivo padronizar a expressão da proteína em sistema bacteriano, visando encontrar sua melhor condição de expressão. A construção pET-LaCALA2 foi utilizada para transformar bactérias das linhagens *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) e *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Estas foram cultivadas em meio LB líquido contendo kanamicina – marca de resistência do vetor pET-28a(+), e cloranfenicol – marca de resistência das bactérias, a 37ºC sob agitação (225rpm) até atingirem DO entre 0,3 e 0,6nm. Quando a DO foi atingida, 1mL da cultura foi coletado, correspondente à amostra não induzida e foi adicionado IPTG na concentração final de 1mM, visando a indução da expressão da proteína.

Amostras foram coletadas a cada uma hora, durante um período de seis horas, e após 16h (*overnight*) (Figura 17, linhas 3-9). Das amostras coletadas foram extraídas proteínas totais, as quais foram fracionadas e analisadas em gel SDS-PAGE 15% corado com azul de *Coomassie*. O objetivo era se observar qual extrato bacteriano originado das amostras induzidas, apresentava uma proteína de aproximadamente 15kDa em maior concentração que as demais, a qual poderia corresponder a superexpressão de LaCALA2.

Os extratos correspondentes à expressão da proteína na bactéria da linhagem *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) apresentaram melhores resultados quando comparados à expressão na bactéria da linhagem *E. coli* BL21 (DE3) pLysS: maior intensidade da banda correspondente a LaCALA2 quando comparada com outras proteínas. O tempo de indução escolhido foi o de 2h pois não houveram grandes variações na expressão de LaCALA2 ao longo do tempo.

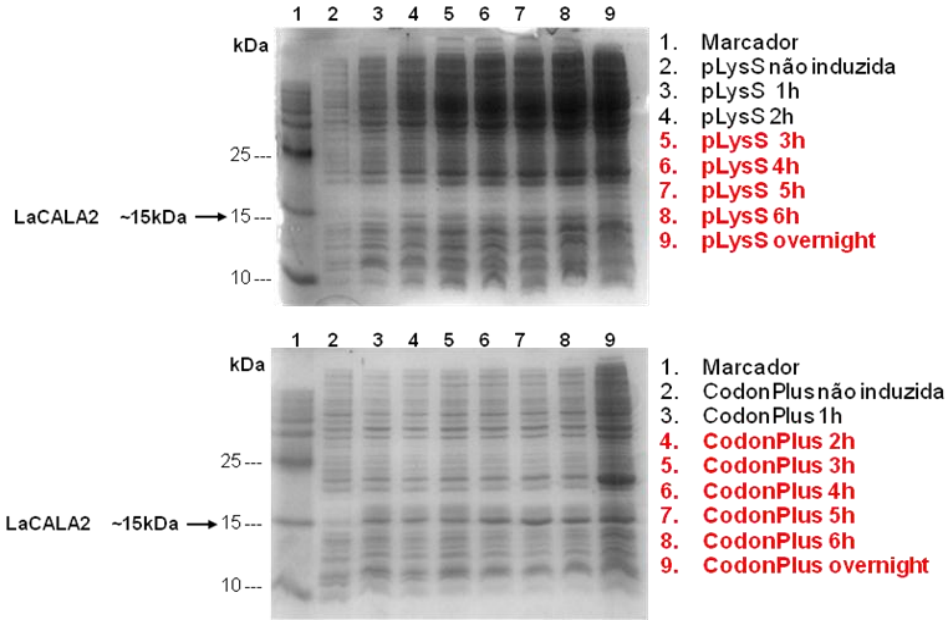


Figura 17. Teste de mini-indução da expressão de LaCALA2 nas linhagens de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) e BL21 (DE3) pLysS. Gel SDS-PAGE 15% corado com coomassie. A indução da expressão da proteína foi feita com 1mM de IPTG a 37ºC. Linhas 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Linhas 2: fração do extrato proteico bacteriano na ausência de IPTG (não induzido). Linhas 3 a 9: extratos proteicos obtidos após indução por 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h e *overnight*. A expressão de LaCALA2 (~15kDa) não se alterou substancialmente após o tempo de 3h de indução na bactéria pLysS e após 2h na bactéria CodonPlus. A bactéria CodonPlus demonstrou melhor eficiência na expressão de LaCALA2.

Após padronizados o tempo de expressão e a linhagem bacteriana utilizada foram realizados testes para definir a concentração ideal de IPTG para a indução da expressão de LaCALA2. Foi realizada indução com 0,1mM, 0,25mM e 0,5mM de IPTG com o tempo de indução de 2h e 4h (Figura 18). Não houve diferenças significativas variando a concentração de IPTG e o tempo. A concentração selecionada foi a de 0,5mM de IPTG.

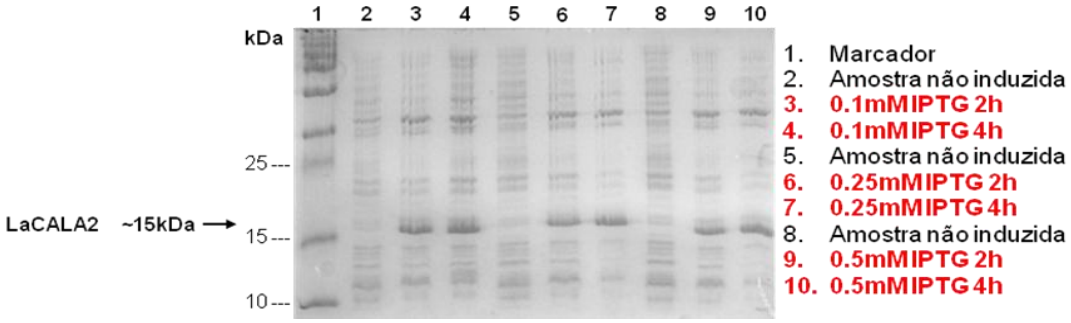


Figura 18. Teste de mini-indução da expressão de LaCALA2 variando a concentração de IPTG. Gel SDS-PAGE 15% corado com coomassie. Linha 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). As linhas 2, 5 e 8 correspondem às frações não induzidas (sem IPTG). Linhas 3 e 4: frações induzidas com 0,1mM de IPTG por 2h e 4h, respectivamente. Linhas 6 e 7: frações induzidas com 0,25mM de IPTG por 2h e 4h, respectivamente. Linhas 9 e 10: frações induzidas com 0,5mM de IPTG por 2h e 4h, respectivamente. A expressão de LaCALA2 não apresentou grandes variações com as diferentes concentrações de IPTG e nos diferentes tempos. A concentração de IPTG selecionada foi a de 0,5mM com tempo de indução de 2h.

7.5. Teste de solubilidade de LaCALA2

Padronizadas as condições ideais para a expressão de LaCALA2 (0,5mM de IPTG, 2h, 37°C) prossegui-se com a avaliação de sua solubilidade. Extratos proteicos totais induzidos com IPTG e ressuspendidos em tampão de lise (Tris HCl 50mM pH 8,0 e NaCl 50mM) foram submetidos à sonicação na presença de DNAse e RNAse: 45 sessões de 20 segundos, potência de 50, com intervalos de 10 segundos. Após a série de sonicações a amostra foi centrifugada a 5000rpm por 15 minutos, separando assim o extrato nas frações solúvel e insolúvel. Na figura 19 estão presentes as frações não induzida do extrato - sem IPTG (linha 2), fração induzida - com IPTG onde nota-se a presença de LaCALA2 com ~15kDa (linha 3), fração solúvel do extrato com a presença de LaCALA2 (linha 4) e a fração insolúvel (linha 5).

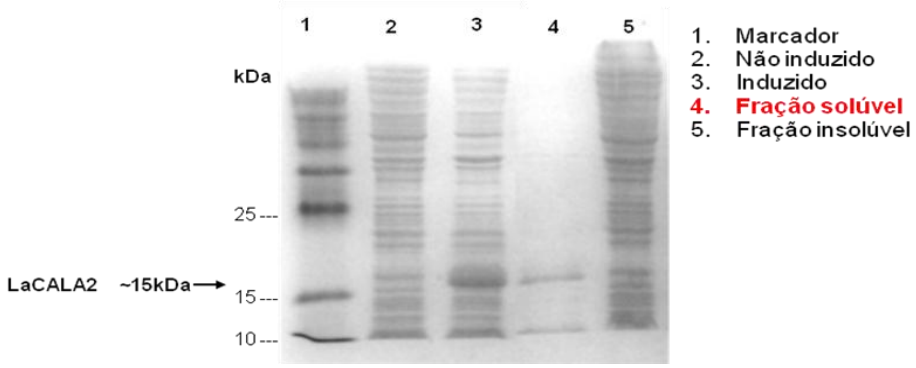


Figura 19. Avaliação da solubilidade de LaCALA2. Linha 1: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Linha 2: fração do extrato proteico bacteriano total na ausência de IPTG (não induzido). Linha 3: extrato proteico bacteriano total mostrando a expressão de LaCALA2 (~15kDa) induzida com 0,5mM IPTG. Linha 4: fração solúvel do extrato proteico com a presença de LaCALA2 (~15kDa). Linha 5: fração insolúvel do extrato proteico.

7.6. Purificação de LaCALA2 recombinante

A fração solúvel do extrato proteico bacteriano (Figura 20, linha 2) que contém LaCALA2, foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade, onde variou-se a concentração de Imidazol (até 500mM) de maneira crescente. A purificação foi possível, pois LaCALA2 recombinante tem cauda de 6xHis em seu N-terminal a qual tem afinidade pelo níquel presente na coluna HisTrap HP (GE Healthcare). A figura 20 – linha 4 mostra a fração obtida após a aplicação da amostra contendo LaCALA2 na coluna (flowthrough), podemos observar que

não há a presença de LaCALA2 nessa fração, indicando que esta foi retida na coluna conforme esperado. As linhas de 6 a 13 correspondem às frações 27 a 34, de um total de 93 frações, onde há a presença de LaCALA2 purificada.

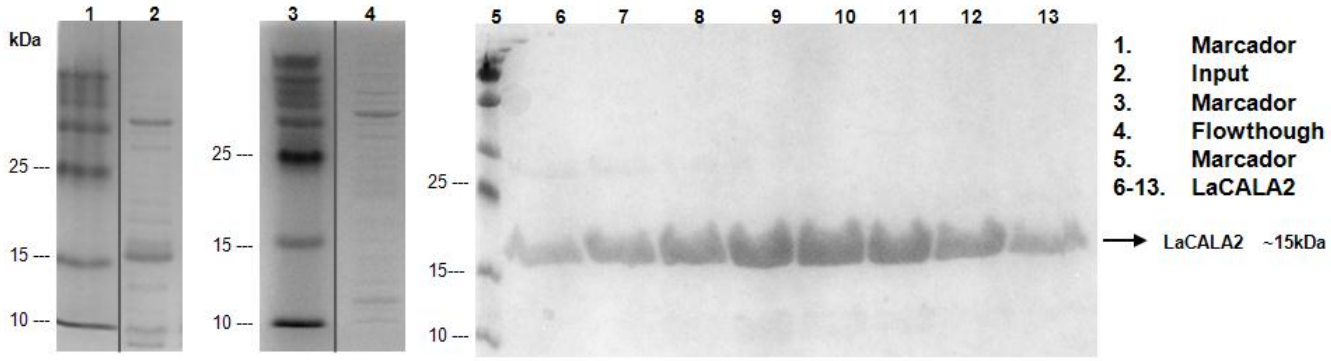


Figura 20. Purificação de LaCALA2 por cromatografia de afinidade. A purificação foi realizada em coluna de níquel HisTrap HP (GE Healthcare) com afinidade à cauda de 6xHis presente no N-terminal de LaCALA2 usando o cromatógrafo AKTAprime plus (GE Healthcare). Linhas 1, 3 e 5: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Linha 2: Fração solúvel do extrato proteico contendo LaCALA2. Linha 4: fração resultante da amostra contendo LaCALA2 aplicada na coluna (flowthrough). Linhas 6-13: LaCALA2 purificada correspondente aos eluatos 27 a 34.

7.7. Análise estrutural de LaCALA2 recombinante por espectroscopia de Dicroísmo Circular

A proteína recombinante purificada foi submetida à análise estrutural por espectroscopia de dicroísmo circular, técnica que permite elucidar a composição de sua estrutura secundária.

A predição teórica da estrutura secundária da LaCALA2 foi realizada pela predição consenso do servidor NPS@ (Combet *et al.*, 2000) apontou que essa proteína seria composta de 62% de alfas-hélices e 36% de elementos desordenados. Além disso, essa proteína possui um domínio EF-hand e é homóloga a diversas calmodulinas, características que reforçam que essa proteína deve ser composta por um grande número de alfas hélices. De fato, como podemos ver pelo espectro de DC da LaCALA2 (Figura 21), essa proteína possui alfas-hélices como sua estrutura secundária predominante graças a valores mínimos de [θ] proeminentes a 208 e 222nm, característica típica de proteínas ricas em alfas hélices.

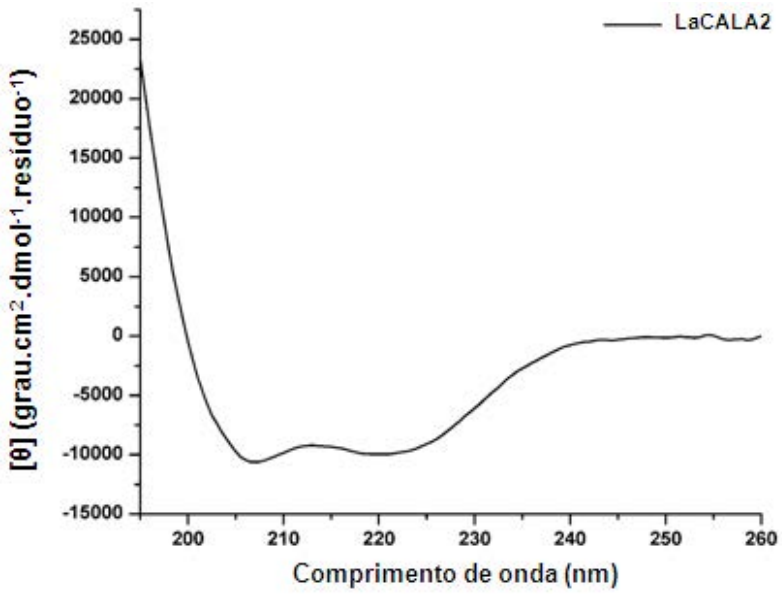


Figura 21. **Análise da estrutura secundária de LaCALA2 por espectroscopia de dicroísmo circular.** LaCALA2 apresenta-se enovelada e possui predominante alfas-hélices em sua estrutura secundária (valores mínimos de [θ] proeminentes a 208 e 222nm). A análise corresponde à média de 20 acumulações com espectros coletados no intervalo de 195-260nm no aparelho Jasco J-815.

A deconvolução da curva de DC obtida utilizando-se o algoritmo CDSSTR (Sreerama & Woody, 2000) sugeriu que LaCALA2 seja constituída de 36% de alfas hélices e 44% de elementos desordenados. Apesar da discordância de valores entre a predição teórica e a proveniente da análise de DC, há a predominância de alfas-hélices devido aos valores mínimos de [θ] obtidos. As análises podem sofrer interferência devido à quantidade de sal presente na amostra, presença de DNA, contaminação com outras proteínas e intervalo da leitura, sendo que os intervalos ideais se iniciam a partir de 190nm.

7.8. Expressão de LaCALA2 em extratos de formas promastigotas: ensaio preliminar

Com o intuito de se observar a expressão de LaCALA2 no parasito foi realizado um teste preliminar de Dot Blot. O anticorpo primário, produzido em coelhos através da imunização com peptídeos de LaCALA2 (sequência: CMIREADVDGDGQIN), foi testado contra extratos totais de parasita, extrato de núcleo e de citoplasma e com a proteína recombinante purificada (Figura 22). O título do anticorpo primário utilizado foi de 1:50 e este foi pouco reativo no teste, o que pode ser devido à uma baixa imunogenicidade do peptídeo.

As linhas correspondentes ao extrato de núcleo obtido segundo Fragaki et al. (1999), extrato total de proteínas solúveis S100 de *L.amazonensis*, obtidos segundo Fernández et al. (2004) e a proteína recombinante LaCALA2 purificada apresentaram sinais mais intensos (linhas 1, 4 e 6, respectivamente) quando comparadas às demais linhas, o que pode ser sinal da presença de LaCALA2 no núcleo do parasita. A presença de LaCALA2 em extratos totais *L. major* não foi evidente com este ensaio, apesar de LaCALA2 e LmjCALA2 apresentarem 100% de identidade, sugerindo que a baixa reatividade apresentada pode ser devida à baixa qualidade do extrato obtido. Novos testes serão realizados buscando identificar CALA2 em extratos de *L. major* e de *L. amazonensis.*

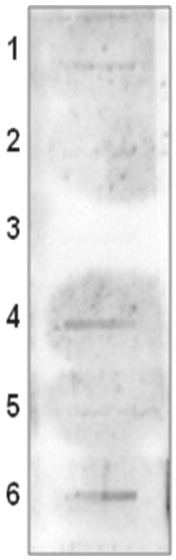


Figura 22. Dot Blot com anticorpo primário anti-LaCALA2. *As linhas 1, 3-6 contém ~60µg de proteínas e o título do anticorpo primário utilizado foi 1:50. Linha 1: Extrato de núcleo (Fragaki) de *L. amazonensis*. Linha 2: ~30µg de extrato de núcleo (Fragaki) de *L. amazonensis*. Linha 3: extrato total de proteínas (S100) de *L. major*. Linha 4: extrato total de proteínas (S100) de *L. amazonensis*. Linha 5: extrato de citoplasma de *L. amazonensis*. Linha 6: LaCALA2 recombinante purificada.

7.9. LaCALA2 mostra predominante localização nuclear por Imunofluorescência indireta

Ensaios de imunofluorescência foram realizados com o intuito de se observar a localização subcelular de LaCALA2. A figura 23 apresenta a morfologia do parasito (DIC), DNA do núcleo e cinetoplasto corados em azul (DAPI), LaCALA2 marcada em vermelho, seguido da colocalização entre LaCALA2 e o núcleo de *L. amazonensis* (merged = sobreposição das imagens). Como mostrado na figura, fica evidenciada a presença de

LaCALA2 no núcleo do parasito. Aqui vale ressaltar que esta é uma amostra dos resultados obtidos de mais de 10 campos examinados em lâminas diferentes, onde a LaCALA2 aparece predominantemente no núcleo de formas promastigotas do parasita, independente da fase do ciclo celular (dados não mostrados).

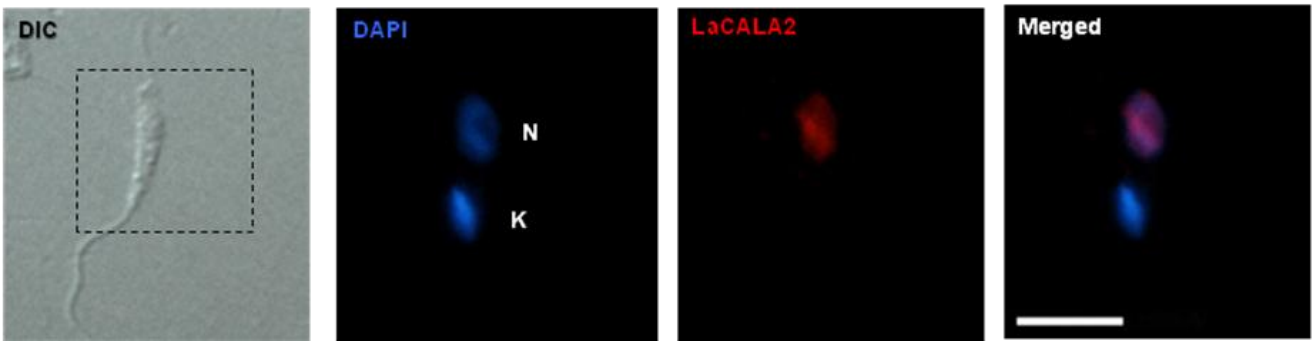


Figura 23. Imunofluorescência indireta revelada com soro anti-LaCALA2. Morfologia do parasito (DIC), DAPI em azul corando organelas que contém DNA (núcleo e cinetoplasto), em vermelho LaCALA2 e Merged mostrando a sobreposição das imagens onde fica evidenciada a colocalização de LaCALA2 com o núcleo do parasito.

8. Perspectivas

1. Realizar ensaios de Western Blot;
2. Realizar hibridação de fluorescência *in situ* (FISH) seguida de imunofluorescência (IF) para verificar uma possível co-localização de LaCALA2 com os telômeros de *L. amazonensis;*
3. Realizar ensaio de interação *in vivo* e *in vitro* de LaCALA2 com o DNA telomérico.
4. Composição de uma manuscrito a ser submetido para publicação.

9. Referências

. Akopyants, N. S., R. S. Matlib, et al. (2004). "Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite Leishmania major." Mol Biochem Parasitol 136(1): 71-86.

. Alexander J., B. K. (2005). "T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm." Immunol Lett 2005 Jun 15:99(1):17-23.

. Beverley, S. M. (1991). "Gene amplification in Leishmania." Annu Rev Microbiol 45: 417-44.

. Blackburn, E. H. and P. B. Challoner (1984). "Identification of a telomeric DNA sequence in Trypanosoma brucei." Cell 36(2): 447-57.

. Cano, M. I., J. M. Dungan, et al. (1999). "Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa." Proc Natl Acad Sci U S A 96(7): 3616-21.

. Cano, M. I. N. (2001). "Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers." Trends Parasitol 17: 425-429.

. Chan, S. R. and E. H. Blackburn (2004). "Telomeres and telomerase." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 359(1441): 109-21.

. Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and, Deléage G (2000). NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* 25, 147-150.

. Conte, F. F. and M. I. Cano (2005). "Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of Leishmania (Leishmania) amazonensis." Int J Parasitol 35(13): 1435-43.

. da Silva, M. S., A. M. Perez, et al. (2010). "The Leishmania amazonensis TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres." BMC Microbiol 10: 136.

. da Silva, M. S. d. S., R. C. V. ; Perez, A. M. ; Monteiro, J. P. ; Calderano, S. G. ; Cunha, J. P.; Elias, M. C.; Cano, M. I. N. (2012). Nuclear DNA Replication in Trypanosomatid Protozoa. DNA Replication and Mutation. N. Y. N. S. Publishers.

. de Lange, T. (2005). "Telomere-related genome instability in cancer." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 70: 197-204.

. Dmitriev, P. V., A. V. Petrov, et al. (2003). "Yeast telosome complex: components and their functions." Biochemistry (Mosc) 68(7): 718-34.

. Fasman, G. D. (1996). Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York.

. Fernandez, M. F., R. R. Castellari, et al. (2004). "Identification of three proteins that associate in vitro with the Leishmania (Leishmania) amazonensis G-rich telomeric strand." Eur J Biochem 271(14): 3050-63.

. Fragaki, K., Ferrua, B., Mograbi, B., Waldispuhl, J., Kubar, J. (2003). “A novel *Leishmania infantum* nuclear phosphoprotein Lepp12 which stimulates IL1-beta synthesis in THP-1 transfectants”. *BMC Microbiol*.3, 7.

. Fu, G., G. Perona-Wright, et al. (1998). "Leishmania braziliensis: characterisation of a complex specific subtelomeric repeat sequence and its use in the detection of parasites." Exp Parasitol 90(3): 236-43.

. Gao, H., R. B. Cervantes, et al. (2007). "RPA-like proteins mediate yeast telomere function." Nat Struct Mol Biol 14(3): 208-14.

. Giardini, M. A., M. F. Fernandez, et al. (2011). "Leishmania amazonensis: partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage." Exp Parasitol 127(1): 243-8.

. Gilson, E. and V. Geli (2007). "How telomeres are replicated." Nat Rev Mol Cell Biol 8(10): 825-38.
. Giraud-Panis, M. J., M. T. Teixeira, et al. "CST meets shelterin to keep telomeres in check." Mol Cell 39(5): 665-76.
. Ivens, A. C., C. S. Peacock, et al. (2005). "The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major." Science 309(5733): 436-42.
. Johnston, D. A., Blaxter, M. L., Degrave, W. M., Foster, J., Ivens, A. C. & Melville (1999). Genomics and the Biology of Parasites.
. Lee, G. E., E. Y. Yu, et al. (2004). "DNA-protein kinase catalytic subunit-interacting protein KIP binds telomerase by interacting with human telomerase reverse transcriptase." J Biol Chem 279(33): 34750-5.
. Leprohon, P., D. Legare, et al. (2009). "Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant Leishmania infantum." Nucleic Acids Res 37(5): 1387-99.
. Lira, C. B., M. A. Giardini, et al. (2007a). "Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions." Trends Parasitol 23(8): 357-62.
. Lira, C. B., J. L. Siqueira Neto, et al. (2007b). "LaRbp38: a Leishmania amazonensis protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs." Biochem Biophys Res Commun 358(3): 854-60.
. Lira, C.B.B., Siqueira-Neto, J.L., Ramos, C.H.I. & Cano, M.I.N. (2007c) LaTBP1: a *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates *in vivo* with telomeres and GT-rich sequences using a Myb-like domain, *ArchBiochemBiophys*, 465, 399-409.
. Liu, D., M. S. O'Connor, et al. (2004). "Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins." J Biol Chem 279(49): 51338-42.
. Longhese, M. P. (2008). "DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres." Genes Dev 22(2): 125-40.
. Lydall, D. (2009). "Taming the tiger by the tail: modulation of DNA damage responses by telomeres." Embo J 28(15): 2174-87.
. Lye, L. F., K. Owens, et al. "Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans." PLoS Pathog 6(10): e1001161.
. Medina-Acosta, E. and G. A. Cross (1993). "Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure." Mol Biochem Parasitol 59(2): 327-9.
. Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, et al. (1988). "A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 85(18): 6622-6.
. Munoz-Jordan, J., G. A. M. Cross, T. de Lande, J. D. Griffith (2001). "T-loops at trypanosome telomeres." EMBO J 20:579-588.
. Munoz, D. P. and K. Collins (2004). "Biochemical properties of Trypanosoma cruzi telomerase." Nucleic Acids Res 32(17): 5214-22.
. Neves, D. P., Melo, A. L., Genaro, O. & Linardi, P. M. (2005). Parasitologia Humana. Peacock, C. S., K. Seeger, et al. (2007). "Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease." Nat Genet 39(7): 839-47.
. Price, C. M., K. A. Boltz, et al. "Evolution of CST function in telomere maintenance." Cell Cycle 9(16): 3157- 65.
. Rey, L. (2001). Parasitologia. Rio de Janeiro.
. Rey, L. (2002). Parasitologia. Rio de Janeiro.
. Rodger, A. N., B. (1997). Circular dichroism of biomolecules: DNA-ligand interactions. Circular dichroism and linear dichroism. O. U. Press.
. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-91.
. Schramke, V. P. Luciano, et al. (2004). "RPA regulates telomerase action by providing

Est1p access to chromosome ends." Nat Genet 36(1): 46-54.
. Segovia, M. (1994). "Leishmania gene amplification: a mechanism of drug resistance." Ann Trop Med Parasitol 88(2): 123-30.
. Simpson, L. (1987). "The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution." Annu Rev Microbiol 41: 363-82.
. Siqueira-Neto, J. L., C. B. Lira, et al. (2007). "Leishmania replication protein A-1 binds in vivo single- stranded telomeric DNA." Biochem Biophys Res Commun 358(2): 417-23.
. Smogorzewska, A. and T. de Lange (2004). "Regulation of telomerase by telomeric proteins." Annu Rev Biochem 73: 177-208.
. Sreerama, N., and Woody, R. W. (2000) Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry* 287, 252-260
. Stewart, S. A. and R. A. Weinberg (2002). "Senescence: does it all happen at the ends?" Oncogene 21(4): 627-30.
. Stiles, J. K., P. I. Hicock, et al. (1999). "Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania." Ann Trop Med Parasitol 93(8): 781-807.
. Teixeira, M. T. and E. Gilson (2005). "Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm." Chromosome Res 13(5): 535-48.
. Thomas, S., A. Green, et al. (2009). "Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in Leishmania major." BMC Genomics 10: 152.
. Wellinger, R. J. (2009). "The CST complex and telomere maintenance: the exception becomes the rule." Mol Cell 36(2): 168-9.
. Who (2002). Weekly Epidemiological Report. 44: 365-372
. Wilkinson, S. R., M. C. Taylor, et al. (2008). "A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes." Proc Natl Acad Sci U S A 105(13): 5022-7.
. Wincker, P., C. Ravel, et al. (1996). "The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved
across widely divergent human pathogenic species." Nucleic Acids Res 24(9): 1688-94.
. Yanez, M., J. Gil-Longo, et al. (2012). "Calcium binding proteins." Adv Exp Med Biol 740: 461-82.