

**Natália Tomich de Paiva Miranda**

**Busca de genes de *Leishmania* spp que  
possam codificar a leishporina e expressão  
dos produtos gênicos de hemolisinas do tipo  
III putativas de *L.major*.**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**ORIENTAÇÃO:**

DR<sup>a</sup> MARIA DE FÁTIMA MARTINS HORTA

**CO-ORIENTAÇÃO:**

DR<sup>a</sup> ROSIANE A. DA SILVA PEREIRA

BELO HORIZONTE  
MINAS GERAIS-BRASIL

2010

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Patiu por me receber em seu laboratório, me ajudar a pensar como cientista e por ser para mim mais do que uma orientadora, uma grande terapeuta nos momentos de desespero, que não foram poucos! Rsrtrs. Obrigada a Rô pela paciência e disponibilidade ao me ensinar a dar os primeiros passos na ciência, pela presença constante na solução de todos os problemas e principalmente pela amizade que pudemos construir durante todo esse tempo. Agradeço à Dra. Daniella Bartholomeu pela colaboração neste trabalho e à Dra. Santuza Teixeira pelas discussões sempre produtivas durante o projeto. Agradeço à Dras. Clara Barbieri e Márcia Regina Machado por me receberem em seu laboratório na UNIFESP, onde pude aprender técnicas importantes para a realização deste trabalho. Dani, valeu pela contribuição na realização de grande parte dos experimentos dessa dissertação. Eli, agradeço ao apoio técnico importantíssimo!! Amigos do lab, nem preciso agradecer não é?? Gabiroba, Pri, Vivis, Pati, Lu, Jahjah, Barbara, Juliano, Ramon, Thiago, Wanderson e Fabs, obrigado pela convivência, pela amizade, pelos momentos inesquecíveis nos congressos e na varandinha do lab!!!! Rsrtrs!! Valeu!!!!!!!!!!!! Agradeço especialmente à minha família pela oportunidade de estudar longe de casa, pelo incentivo constante e pela dedicação à minha formação. Espero um dia poder retribuir tudo isso que recebi com tanto carinho. Sem vocês essa caminhada não teria sido possível. Um obrigado especial também ao meu amor por incentivar sempre meu crescimento profissional, pela presença carinhosa, divertida e atenciosa em todos os momentos!! Amo todos vocês!!!!

## RESUMO

A leishporina é uma citolisina formadora de poros descrita pelo nosso grupo, inicialmente em *Leishmania amazonensis*, mas cuja atividade citolítica foi também detectada em *L. major*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Noronha, 1996; Noronha *et al.*, 1996; Noronha *et al.*, 2000; Almeida-Campos & Horta, 2000). A atividade citolítica da leishporina de *L. amazonensis* foi detectada em extratos de promastigotas e de amastigotas, mas toda a caracterização desta atividade foi feita em promastigotas. Diversas características desta citolisina e do seu mecanismo de ação já foram determinadas (Noronha *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1996; Noronha *et al.*, 2000; Almeida-Campos & Horta, 2000; Castro-Gomes *et al.*, 2009). O fato de parasitas do gênero *Leishmania*, causador de diversas formas de leishmaniose, possuírem uma proteína formadora de poros gera a questão óbvia de que função tal proteína poderia ter. É esta a pergunta que queremos responder. A resposta, no entanto, depende de conhecermos a identidade molecular da leishporina. Dentre as abordagens que estão sendo utilizadas em nosso laboratório para a identificação desta citolisina estão: 1) purificação da proteína a partir de extratos do parasita, 2) produção de um banco de dados com proteínas formadoras de poros (PFPs) funcionalmente caracterizadas para verificar o grau de homologia com genes de *L. major*, 3) *screening* funcional de bibliotecas de cDNA e 4) caracterização dos genes de *L. major* anotados como hemolisinas no banco de dados GeneDB. As duas últimas abordagens foram o alvo do presente trabalho. Com o *screening* funcional de uma biblioteca de cDNAs da forma amastigota de *L. amazonensis*, construída em fago T7, não foi possível identificar proteínas hemolíticas, uma vez que a biblioteca havia perdido a sua representatividade. Esta é uma abordagem que utilizaremos novamente, tentando amplificar esta biblioteca de forma representativa, além de realizar um novo *screening* com uma biblioteca cDNA da forma promastigota de *L. amazonensis* construída em nosso laboratório. Quanto à segunda abordagem, encontramos 4 sequências anotadas como hemolisinas do tipo III no banco de dados GeneDB de *L. major*. Demonstramos existência de RNAs mensageiros para estes quatro genes e determinamos o nível de expressão relativa de cada um deles na forma promastigota do parasita. Experimentos de clonagem e expressão em bactéria nos indicaram que esses genes possam ser tóxicos para a bactéria *E. coli* e, portanto, um outro sistema será utilizado para a expressão destas proteínas.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> .....	12
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de ativação da leishporina.....	19
<b>Figura 3:</b> Placa representativa do <i>screening</i> por hemólise de uma biblioteca de cDNAs de amastigotas de <i>L.amazonensis</i> .....	32
<b>Figura 4:</b> Amplificação por RT-PCR das sequências dos mRNAs de promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	34
<b>Figura 5:</b> Atividade hemolítica de extrato de membranas (Ext-ms) de promastigotas de <i>Leishmania major</i> .....	35
<b>Figura 6:</b> Análise da lista de Pfam de <i>Leishmania major</i> no banco de dados GeneDB.....	37
<b>Figura 7 :</b> Análise da presença de genes ortólogos de hemolisina III de <i>L. major</i> em outros tripanossomatídeos.....	39
<b>Figura 8:</b> Expressão dos genes anotados como hemolisinas III de <i>Leishmania major</i> .....	40
<b>Figura 9:</b> Níveis relativos de expressão dos supostos genes de hemolisina III em promastigotas de <i>Leishmania major</i> .....	42
<b>Figura 10:</b> Curvas de dissociação dos produtos amplificados por PCR em Tempo Real..	43
<b>Figura 11:</b> Alinhamento do domínio de hemolisina III dos genes de <i>Leishmania major</i> e <i>Bacillus cereus</i> .....	44
<b>Figura 12:</b> Amplificação por PCR do gene LmjF36.5520 de <i>Leishmania major</i> e análise da orientação dos insertos clonados.....	46
<b>Figura 13:</b> Amplificação por PCR do gene LmjF36.5520 de <i>Leishmania major</i> utilizando DNA polimerase com atividade corretora e análise da orientação dos insertos clonados...	48
<b>Figura 14:</b> Indução da expressão da proteína recombinante codificada pelo gene LmjF36.5520 de <i>Leishmania major</i> .....	49

<b>Figura 15:</b> Atividade hemolítica do extrato protéico de bactérias transformadas com o plasmídeo pGEX 4T1 portando o gene da LmjF36.5520 de <i>Leishmania major</i> .....	51
<b>Figura 16:</b> Amplificação das sequências anotadas como hemolisina III de <i>Leishmania major</i> para clonagem no vetor pBAD/gIII.....	54
<b>Figura 17:</b> Confirmação da clonagem da sequência LmjF36.5500 de <i>Leishmania major</i> no plasmídeo pBADgIII.....	55
<b>Figura 18:</b> Indução da expressão da proteína codificada por LmjF36.5500 de <i>Leishmania major</i> .....	56
<b>Figura 19:</b> Confirmação da clonagem das sequências LmjF36.5500, LmjF36.5510 e LmjF36.5520 no vetor pX63NEO.....	58

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

cDNA – DNA complementar sintetizado através de uma molécula de RNA mensageiro numa reação catalizada pela enzima transcriptase reversa

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPPC – dipalmitoilfosfatidilcolina

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GFP – Proteína fluorescente verde

GST – Glutathione S-transferase

LB – Luria bertani (meio para crescimento de bactérias)

IPTG – Isopropil  $\beta$ - thiogalactosideo

MACPF – Complexo de staque a membrane simililar à perforina

mRNA – RNA mensageiro

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PFPs – Proteínas formadoras de poros

pH – Potencial hidrogeniônico

RNA – Ácido ribonucléico

RPM – Rotações por minuto

RT PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SM – Meio para estocagem de bacteriófagos

SMF – Sistema monocítico fagocitário

UFC – Unidades formadoras de colônias

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	10
O PROTOZOÁRIO DO GÊNERO LEISHMANIA: CICLO DE VIDA E PATOGENESE.....	10
PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS.....	13
PROTEÍNAS FORMADORAS DE POROS DE PROTOZOÁRIOS PATOGENICOS.....	14
A LEISHPORINA.....	15
OBJETIVO E JUSTIFICATIVA.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
<i>SCREENING</i> DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> .....	21
OBTENÇÃO DE PRODUTOS DE RT-PCR PARA CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i> amazonensis.....	21
CULTIVO E ESTOQUE DE PROMASTIGOTAS.....	22
PREPARO DOS EXTRATOS UTILIZADOS EM ENSAIO HEMOLÍTICO.....	23
ENSAIO HEMOLÍTICO.....	24
<i>Padronização de hemácias</i> .....	24
<i>Determinação da atividade hemolítica</i> .....	24
AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE HEMOLISINA III DE <i>Leishmania</i> <i>major</i> DEPOSITADAS NO BANCO DE DADOS GENEDB.....	24
PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS OBTIDOS POR PCR E DIGESTÃO.....	25

DIGESTÃO DOS PRODUTOS DE PCR E LIGAÇÃO EM VETORES PLASMIDIANOS.....	25
OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOCOMPETENTES.....	27
TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOCOMPETENTES.....	27
OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES.....	28
TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS ELETROCOMPETENTES.....	28
SELEÇÃO DE CLONES BACTERIANOS POR PCR DE COLÔNIA.....	29
OBTENÇÃO DO DNA PLASMIDIANO EM PEQUENA ESCALA.....	29
INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	29
EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania major</i> .....	30
PCR EM TEMPO REAL.....	30
RESULTADOS.....	31
1. SCREENING FUNCIONAL DE UMA BIBLIOTECA DE cDNAS DE AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> .....	31
2. CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE cDNA DE PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> .....	31
3. BUSCA DE SEQUÊNCIAS ANOTADAS COMO HEMOLISINAS NO GENOMA DE <i>Leishmania major</i> .....	33
3.1 ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO SOLÚVEL DE MEMBRANA (EXT-MS) DE PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania major</i> .....	33
3.2. ANÁLISE DO BANCO DE DADOS PFAM DE <i>Leishmania major</i> NO GeneDB.....	33
4. EXPRESSÃO DOS GENES ANOTADOS COMO HEMOLISINAS III DE <i>L. major</i> .....	36



5. AMPLIFICAÇÃO GÊNICA POR PCR E POSTERIOR CLONAGEM NO VETOR TOPO 2.1.....	41
6. CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pGEX 4T1.....	47
7. TENTATIVAS DE INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE NO VETOR pGEX 4T1.....	47
8. ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO DA BACTÉRIA TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO pGEX 4T1 PORTANDO O GENE DA LmjF36.5520.....	50
9. CLONAGEM DOS GENES ANOTADOS COMO HEMOLISINA III DE <i>Leishmania major</i> NO VETOR DE EXPRESSÃO REGULADA pBADgIII.....	53
10. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LmjF36.5500.....	53
11. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS DAS SUPOSTAS HEMOLISINAS III DE <i>Leishmania major</i> NO VETOR DE EXPRESSÃO pX63NEO.....	57
DISCUSSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## INTRODUÇÃO:

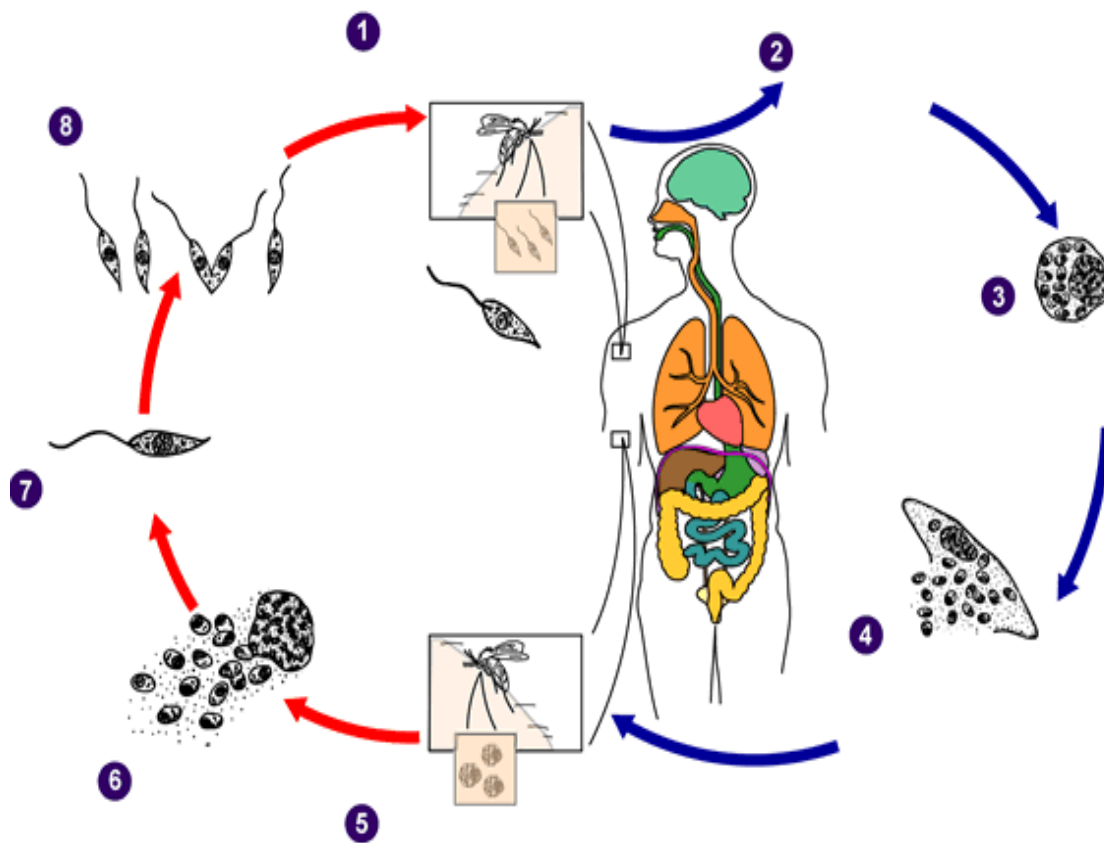
### O protozoário do gênero *Leishmania*: ciclo de vida e patogênese:

O gênero *Leishmania* pertence ao grupo de zooflagelados da ordem *Kinetoplastida* que são caracterizados pela presença de uma massa de DNA evidente chamada cinetoplasto localizada no interior de uma mitocôndria grande, alongada e única. Dos cinetoplastídeos, os pertencentes à família Trypanosomatidae são parasitas intestinais de insetos e parasitos intra ou extracelulares de vertebrados, podendo neste se desenvolver em células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF), no caso do gênero *Leishmania*, ou ainda viver no interstício como observado em certas espécies do gênero *Trypanosoma*. Os tripanosomatídeos possuem um flagelo único que se localiza no cinetoplasto ou próximo a ele. Parasitas do gênero *Leishmania* são causadores de doenças conhecidas como leishmanioses que podem se manifestar sob várias formas clínicas, dependendo da espécie do parasito, da resposta imune do hospedeiro, como também do flebotômíneo vetor (Sacks & Kamhawi, 2001). Lainson & Shaw, em 1987, propuseram uma divisão em dois sub-gêneros, *Leishmania* e *Viannia*, baseada principalmente no local de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e no desenvolvimento do protozoário na pele de hamsters e em meio de cultura. Assim sendo, no sub-gênero *Viannia* encontram-se as espécies do complexo chamado *braziliensis* causadoras das leishmanioses cutânea e mucocutânea no Novo Mundo, sendo exemplos a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. O outro sub-gênero, *Leishmania*, inclui as espécies do complexo donovani como a *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* responsáveis pela leishmaniose visceral no Velho e Novo Mundo, nesta ordem. No sub-gênero *Leishmania* ainda encontram-se as espécies do complexo mexicana, representado pelas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* causadoras da leishmaniose cutânea e cutânea difusa do Novo Mundo e do complexo major, sendo que estas espécies são prevalentes no norte da África, Índia e Sudão (Grimaldi e Tesh 1993; Lainson e Shaw, 1987).

A epidemiologia da leishmaniose é bastante diversa sendo que cerca de 21 espécies de *Leishmania* são patogênicas para os seres humanos e 30 espécies do mosquito flebotômíneo são vetores potenciais (Desjeux, 2004). A leishmaniose apresenta amplo espectro de quadros clínicos, que podem variar de lesões cutâneas até lesões internas que

podem comprometer o funcionamento de órgãos, podendo levar inclusive à morte. A gravidade da infecção varia de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida e depende também da resposta imune do hospedeiro e da patogenicidade do parasita.

O ciclo de vida da *Leishmania* (**Figura 1**) é do tipo heteroxeno, no qual um inseto flebotomíneo hematófago fêmea do gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (no Velho Mundo) pica um mamífero parasitado pelo protozoário e ingere, no momento do repasto, formas amastigotas juntamente com o sangue. Os parasitos ingeridos, ainda que pouco numerosos, se transformam em promastigotas, as quais são capazes de se multiplicar extraordinariamente por divisão binária no intestino do inseto. Com relação à infecção do hospedeiro vertebrado no momento do repasto por uma fêmea contaminada, existem duas teorias que tentam explicar o mecanismo de contágio (de Almeida *et al.*, 2003). A primeira, mais antiga, presume que as formas promastigotas metacíclicas (mais alongadas e extremamente infectantes) migram para a glândula salivar do inseto e são inoculadas junto com a saliva que é liberada no local da picada. Outra corrente de pensamento, mais moderna, entende que a multiplicação de promastigotas é tão grande que chega a formar êmbolos de parasitos no proventrículo intestinal do inseto, o que impede o repasto sanguíneo. Deste modo, o inseto regurgitaria esse agregado de promastigotas as quais seriam então fagocitadas pelas células do SMF dando continuidade ao ciclo. No interior do hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas passam ainda por modificações morfológicas e bioquímicas antes de se tornarem infectantes, esse conjunto de transformações é conhecido como metaciclogênese. Para ter sucesso na infecção, a *Leishmania* inoculada pelo inseto vetor precisa penetrar em sua célula hospedeira, geralmente um fagócito, onde se diferencia, reproduz e de onde, em algum momento, sai para penetrar em outras células. Os mecanismos de penetração do parasita na célula fagocitária continuam objeto de muita controvérsia, podendo envolver uma série de moléculas, mecanismos de facilitação da fagocitose e até penetração ativa. Uma vez fagocitado, o parasita vive no interior do da célula hospedeira em um compartimento membranoso chamado vacúolo parasitóforo, formado após a fusão de lisossomos com o vacúolo fagocítico. É no interior desse vacúolo, que as formas promastigotas se transformam em amastigotas. Após a reprodução, as membranas do vacúolo parasitóforo e do próprio macrófago são rompidas, as amastigotas ganham o interstício e são fagocitadas por outras células, amplificando a infecção. Esta etapa de ruptura do vacúolo parasitóforo e



**Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp** - As etapas representadas no esquema acima são as seguintes: 1) promastigotas no inseto; 2) inoculação de promastigotas; 3) multiplicação de amastigotas; 4) rompimento do macrófago; 5) ingestão de células infectadas; 6) liberação de amastigotas; 7) transformação em promastigotas; 8) multiplicação das promastigotas.

do macrófago ainda hoje é objeto de muita discussão, não se sabendo ao certo como isso ocorre. O rompimento de células hospedeiras por seus patógenos intracelulares é passo chave para continuação do ciclo de vida desses organismos e, conseqüentemente, é muito importante compreender os mecanismos e interações moleculares que ocorrem durante essa evasão. A utilização de moléculas membranolíticas para esse rompimento, como proteínas ou peptídeos formadores de poros, tem sido postulada e comprovada para uma série de organismos, de vírus a mamíferos, sendo uma ferramenta importante para a adaptação às condições ambientais (Andreeva-Kovalevskaya *et al.*, 2008; revisado por Hybiske e Stephens, 2008).

### **Proteínas formadoras de poros:**

Proteínas ou peptídeos formadores de poros (PFP) são moléculas capazes de interagir com a bicamada lipídica formando canais transmembrana que permitem a passagem de íons e de moléculas de baixo peso molecular. Essas proteínas estão envolvidas em vários processos biológicos importantes como comunicação celular, citólise e apoptose. Atualmente há cerca de 300 PFPs descritas e estima-se que um terço delas aja rompendo membranas (Parker & Feil, 2005), embora várias outras funções tenham sido atribuídas a essas moléculas (revisado por Almeida-Campos *et al.*, 2002). Sob este aspecto, as PFPs podem, de modo geral, ser reunidas em alguns grupos principais. Há PFPs cujas funções estão relacionadas à defesa contra patógenos ou agressores. Fazem parte desse grupo a perforina e o componente C9 do sistema do complemento presente no sistema imune dos mamíferos, os cnidoporos dos cnidários, as PFPs que integram a composição de alguns venenos de insetos e aracnídeos e as recém descobertas PFPs dos anelídeos e de alguns vegetais do gênero *Passiflora* (Yuldusheva *et al.*, 2005). Há ainda PFPs com funções possivelmente nutricionais, entre as quais podemos citar os amebaporos de *Entamoeba histolytica*, já que parecem ajudar na digestão de bactérias, a principal fonte alimentar deste protozoário (Leippe, 1997; Andrä *et al.*, 2004) e as PFPs encontradas na saliva de alguns insetos hematófagos como *Triatoma infestans* (Amino *et al.*, 2002) que parecem estar envolvidas na digestão das células ingeridas por estes insetos ou na facilitação do aporte de sangue durante o repasto. PFPs podem ainda ser uma boa arma para assegurar a competitividade, o bom desempenho e o sucesso de um organismo ao explorar seu nicho, pois pode utilizá-las para impedir a aproximação ou crescimento de competidores ou para evadir de um determinado local e explorar outro quando o meio se

torna hostil ou saturado. Neste grupo podemos citar as PFPs produzidas por algumas bactérias intracelulares dos gêneros *Legionella*, *Yersinia*, *Listeria* e *Neisseria* (Almeida-Campos *et al.*, 2002) que parecem ajudar esses organismos ao induzir a entrada na célula hospedeira ou seu escape desta, possibilitando a evasão dos mecanismos de defesa de seus hospedeiros. PFPs podem induzir a célula hospedeira a entrar em apoptose matando-a como verificado em infecções por *Salmonella* e *Shigella*, possivelmente possibilitando que a bactéria invada outra célula quando há escassez de nutrientes (Lundberg *et al.*, 1999; revisado por Almeida-Campos *et al.*, 2002).

### **Proteínas formadoras de poros de protozoários patogênicos:**

Microorganismos intracelulares são adaptados ao crescimento e desenvolvimento dentro da célula hospedeira. Este nicho fornece uma proteção parcial ao sistema imune e uma fonte de nutrientes para o patógeno. A evasão do patógeno do meio intracelular é bem menos conhecida do que o processo de invasão celular. O escape do parasita requer a quebra de múltiplas barreiras como o vacúolo parasitóforo, organelas citosólicas do hospedeiro e a membrana plasmática. Vários estudos recentes sustentam a idéia de que esta evasão é um processo ativo e que as proteínas formadoras de poros (PFPs) estariam envolvidas nos passos principais (Roiko e Carruthers, 2009).

*Entamoeba histolytica*, protozoário causador da amebíase humana parece utilizar suas PFPs, os *amebaporos*, para a digestão do conteúdo alimentar. Contudo, essas PFPs podem também ser secretadas e acabam gerando a principal manifestação clínica da infecção ao destruir o tecido da mucosa intestinal do hospedeiro (Young *et al.*, 1982; Leippe, 1997; Hecht *et al.*, 2004). Dentre as PFPs de protozoários, a mais bem caracterizada é a chamada *amebaporo*, uma molécula com 77 resíduos de aminoácidos (Hecht *et al.*, 2004). A ameba de vida livre *Naegleria fowleri*, causadora de uma meningocefalite humana, produz uma PFP chamada *naegleriaporo*, molécula que parece estar envolvida nos danos teciduais presentes na infecção (Herbst *et al.*, 2004). *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, possui uma atividade lítica cujo mecanismo é por formação de poros. Essa atividade lítica foi atribuída a uma citolisina que foi chamada Tc-TOX e, algumas evidências sugerem que possa estar envolvida no rompimento do vacúolo parasitóforo com conseqüente escape do parasita para o citoplasma. A Tc-TOX possui peso molecular em torno de 70 kDa e apresenta homologia

com o C9 do sistema do complemento e com a perforina de camundongo (Andrews & Whitlow, 1989; Andrews, 1990; Andrews, 1994). Mais tarde, Manning-Cella *et al.* (2001) clonaram um gene, denominado *Lyt1*, que codifica uma proteína cuja mutação diminui a hemólise mediada pelo parasita. Essa proteína possui tamanho semelhante à Tc-TOX e, como ela, é similar ao componente C9 do complemento, mas ainda não se sabe se são a mesma molécula. Outro protozoário no qual recentemente foi detectada uma putativa PFP foi o *Plasmodium falciparum*, um dos agentes causadores da malária humana. Foi descoberta nesses protozoários uma família de genes codificando proteínas com domínios semelhantes ao da *Família de Complexo de Ataque a Membranas e Perforina (MACPF-like domains)* (Kaiser *et al.*, 2004; Ishino *et al.*, 2005). Foi demonstrado que as proteínas codificadas por esta família de genes se localizam nos micronemas dos esporozoítos (regiões secretórias e de fundamental importância para a infecção) e que eram fundamentais para o sucesso de um dos passos cruciais da infecção: a travessia do endotélio dos capilares sinusóides pelos esporozoítos com posterior infecção dos hepatócitos (Ishino *et al.*, 2005). Outra proteína recém descoberta, a TgPLP1 de *Toxoplasma gondii*, também apresenta uma alta similaridade com o domínio MACPF de mamíferos, bactérias e protozoários e apresenta o motivo (Y/W)-X6-(F/Y)GTH(F/Y)-X6-GG, conhecido como a assinatura deste grupo de proteínas. TgPLP1 apresenta um papel central no escape do parasita do vacúolo parasitóforo, uma vez que parasitas com deficiência desta proteína não conseguem sair de seus vacúolos parasitóforos (Kafsack *et al.*, 2009). Nosso grupo também descreveu uma atividade citolítica em *Leishmania* mediada por uma PFP, a qual foi denominada leishporina, cujas principais características descrevemos abaixo. A **Tabela 1** resume as principais características de PFPs já descritas em protozoários.

### **A leishporina**

A leishporina é uma citolisina que foi descrita em *L. amazonensis*, *L. major*, *L. panamensis* (Noronha *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1996) e posteriormente em *L. guyanensis* (Almeida-Campos & Horta, 2000).

Protozoário	PEP - características	Função
<i>Entamoeba histolytica</i> . Young <i>et al.</i> (1982) . Leippe <i>et al.</i> (1991)	Amoebapores . ~ 8 kDa . Localizada em vesículas citoplasmáticas . pH ótimo= ácido . Tamanho do poro= 2 nm	Citólise mediada por contato - dano ao tecido do hospedeiro;
<i>Naegleria fowleri</i> . Young & Lowrey (1989) . Herbst <i>et al.</i> (2002)	Naegleriapores . 10-13 kDa . pH ótimo=ácido . Associada a membrana	Citólise - meningo-encefalite invasiva com alto grau de dano tecidual.
<i>Plasmodium falciparum</i> . Kaiser <i>et al.</i> (2004) . Ishino <i>et al.</i> (2005) . Ecker <i>et al.</i> (2007)	Spect2 . Localizada em micronemas. . Similar a proteínas da família MACPF-like domains (complex of membrane attack and perforin)	Evasão do parasita dos capilares sanguíneos e entrada no hepatócito;
<i>Toxoplasma gondii</i> Kafsack <i>et al.</i> (2009)	Tg-PLP . Localizada em micronemas. . Similar a proteínas da família MACPF . Provavelmente maior que 40 nm	Escape do vacúolo parasitóforo;
<i>Trypanosoma cruzi</i> Andrews <i>et al.</i> (1990) Manning-Cela <i>et al.</i> (2001)	LY1 . ~ 70 kDa / Homóloga a C9 . Secretada por amastigotas . pH ótimo = ácido / Tamanho do poro = ~ 10 nm	Ruptura do fagolisossomo
<i>Leishmania sp.</i> . Noronha <i>et al.</i> (2000) . Almeida-Campos <i>et al.</i> (2002) . Noronha <i>et al.</i> (1996) . Horta (1997) . Castro-gomes <i>et al.</i> (2009)	Leishporina Tamanho do poro: 1.6 a 6.1nm Capaz de lisar macrófagos pH ótimo: ácido	Escape do vacúolo parasitóforo e posterior rompimento da membrana plasmática

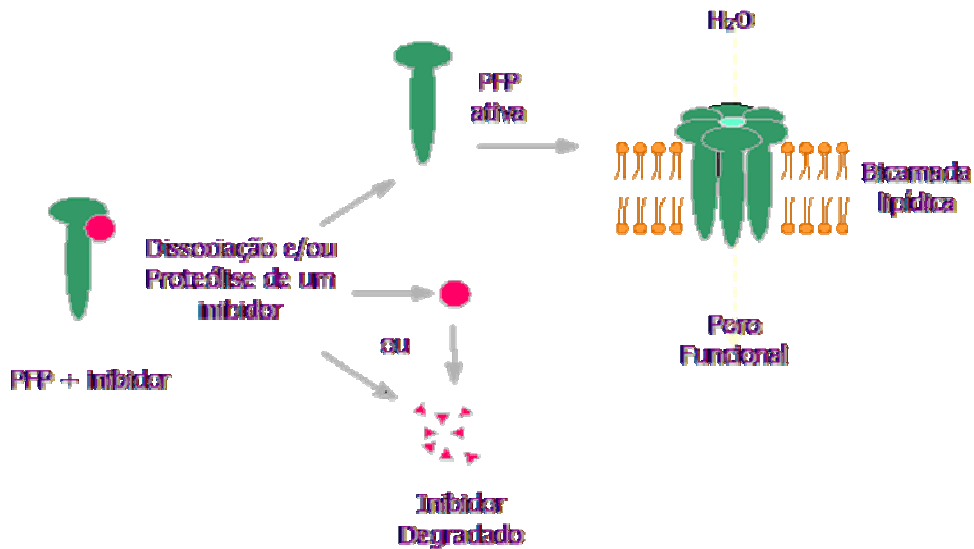
**Tabela 1: proteínas formadoras de poros de protozoários patogênicos**



Suas características descritas até o momento foram, em sua maioria, provenientes de *L. amazonensis* e algumas de *L. guyanensis*, espécies causadoras da leishmaniose cutânea e/ou mucocutânea no Novo Mundo. Presente em extratos de promastigotas e amastigotas, a leishporina lisa hemácias e células nucleadas, incluindo o macrófago. Utilizando a técnica de *patch-clamp*, Noronha et al. (2000) mostraram que o dano celular causado no macrófago por extratos do parasita é mediado pela formação de poros não seletivos na membrana alvo. O diâmetro dos poros formados aumenta com o tempo ou a concentração da citolisina, variando de 1.6 a >6.1nm, o que mostra que o mecanismo de ação é provavelmente por inserção seguida de polimerização de monômeros. Uma característica interessante da leishporina é que sua atividade lítica ótima é em pH ácido de 5,5 e na temperatura de 37°C, o que sugere o hospedeiro vertebrado e suas células alvo, particularmente o interior do fagolisossoma, como microambiente ótimo para atuação desta citolisina (Noronha *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1996). No entanto, a leishporina também é ativa em pH neutro, o que permitiria que ela agisse também no citoplasma da célula hospedeira ou no interior do inseto vetor. Assim, possíveis funções para a leishporina seriam 1) a facilitação da penetração na célula hospedeira, 2) a ruptura de hemácias no interior do inseto vetor para a obtenção de nutrientes, 3) a nutrição dos parasitas através de poros no vacúolo parasitóforo e 4) a ruptura da membrana do fagolisossomo e do próprio macrófago, etapa que propicia a amplificação da infecção com conseqüente comprometimento tecidual. Qualquer dessas funções poderia ter um papel importante para a sobrevivência do parasita e para a patogenia da leishmaniose.

A leishporina está presente na fração de membranas do parasito, provavelmente em forma solúvel no interior de vesículas. Ensaio feitos com hemácias humanas demonstraram que a lise mediada pela leishporina ocorre em pelo menos duas etapas distintas: 1) ligação da citolisina à membrana da célula-alvo, etapa independente da temperatura, ocorrendo de 0 a 40°C; 2) lise propriamente dita, provavelmente pela inserção da citolisina na membrana-alvo e polimerização de subunidades com a formação do poro, etapa que não ocorre em baixas temperaturas e cuja temperatura ótima de ação é 37 °C (Noronha *et al.*, 1996). Nosso grupo ainda mostrou que a leishporina liga-se diretamente a fosfolípídeos da membrana, sem a necessidade de outros receptores como o colesterol, proteínas ou carboidratos (Castro-Gomes *et al.*, 2009).

Foi ainda mostrado que, para apresentar atividade citolítica, a leishporina precisa ser antes ativada (Almeida-Campos & Horta, 2000). Esta ativação consiste na remoção de um oligopeptídeo inibidor não covalentemente ligado à leishporina, o que faz com que a proteína não só tenha maior afinidade para fosfolípides como provavelmente também torne-se capaz de se inserir na bicamada lipídica e polimerizar (Almeida-Campos et al, resultados não publicados; **Figura 2**).



(Almeida-Campos & Horta, 2000, Almeida-Campos, 2001)

**Figura 2 – Ativação da leishporina.** A ativação da leishporina ocorre pela remoção de um peptídeo inibidor por agentes dissociantes ou pela ação de proteases. A PFP ativa é a forma capaz de gerar um poro transmembrana funcional.

## **OBJETIVO E JUSTIFICATIVA**

A leishmaniose, a malária, a amebíase, a doença de Chagas e a toxoplasmose, todas causadas por protozoários, são moléstias de mais alta importância em saúde pública, sendo responsáveis pela morte e invalidez de milhões de pessoas a cada ano e sobrecarregando os serviços de saúde pública, na maioria das vezes ineficazes. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na biologia desses organismos pode oferecer informações preciosas para a descoberta de alvos para tratamento. As PFPs são moléculas com funções diversas que permitem a esses organismos a evasão dos mecanismos antimicrobianos, a invasão de células e tecidos e a saída destas das células infectadas, amplificando a infecção. O estudo e a compreensão de seus mecanismos de atuação são particularmente interessantes, já que podem fornecer pistas importantes a respeito dos mecanismos de infecção e da patogenia.

No momento, um estudo mais detalhado da leishporina, depende diretamente da sua identificação molecular, pela determinação de sua seqüência de aminoácidos, a clonagem do seu gene e, finalmente, a caracterização funcional desta proteína.

Várias abordagens vêm sendo utilizadas em nosso laboratório para a identificação da molécula responsável pela atividade formadora de poros de *L. amazonensis*, a leishporina. Neste trabalho, nosso objetivo foi a busca de genes que codificam proteínas hemolíticas expressas pelos parasitas *L. amazonensis* e *L. major*. Nossa estratégia inicial foi o *screening* funcional de bibliotecas de cDNA de formas amastigotas de *L. amazonensis*, na busca de clones expressando proteínas hemolíticas. Uma vez que o genoma de *L. major* foi completamente seqüenciado, uma segunda estratégia utilizada foi a busca e a caracterização de seqüências eventualmente anotadas como hemolisinas após o sequenciamento do genoma deste parasita. Para isto, nossos objetivos específicos foram: a) pesquisar no banco de dados GeneDB genes anotados como hemolisinas; b) verificar se as seqüências encontradas correspondem a genes expressos no parasita; c) comparar o nível de expressão destes genes na forma promastigota de *L. major*; d) amplificar estas seqüências por PCR; e) clonar e expressar as proteínas recombinantes em sistema procarioto; e) clonar e superexpressar as proteínas em promastigotas de *Leishmania* utilizando vetores específicos de expressão no parasita.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

### **Screening de uma biblioteca de cDNAs de amastigotas de *Leishmania amazonensis*:**

Uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. amazonensis*, cedida ao nosso grupo pelas Dras. Clara Barbieri, da UNIFESP, e Márcia Regina Machado, da UNIBAM, foi utilizada em um *screening* funcional por atividade hemolítica. As amastigotas de *L. amazonensis* utilizadas para extração de RNA eram derivadas da lesão da pata de camundongos e os insertos contidos na biblioteca de cDNAs tinham um tamanho médio de 1,3 kb (Gentil et al., 2007). Estes insertos foram clonados em bacteriófagos  $\lambda$ Ziplox sob controle do promotor lac, induzido por IPTG. O *screening* era realizado em placas de cultura pequenas e as seguintes quantidades de reagentes eram utilizadas em cada placa: 2ml de TOP agarose 2x, 200 $\mu$ l da bactéria *E. coli* Y1090, 100 $\mu$ l da biblioteca de fagos diluída em SM (NaCl 0,1M, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10mM, Tris-HCl 1M, pH 7,5, gelatina 2%) para 10<sup>-4</sup>ufc/ml, 20 $\mu$ l de IPTG 2,5mM, 800 $\mu$ l de tampão acetato (acetato de sódio 20mM, NaCl 150mM), 600 $\mu$ l de sangue humano diluído em SM 1:3. A bactéria Y1090 era crescida *overnight* em LB líquido (10g/L NaCl; 10g/L tripton; 5g/L extrato de levedura; pH ajustado para 7.0 com NaOH) contendo maltose 2% e sulfato de magnésio 10mM, que aumentam a expressão do receptor para o fago T7. A cultura era centrifugada e ressuspensa em MgSO<sub>4</sub> 10mM para OD<sub>600nm</sub> de 0,5 a 1,0. Em um tubo de ensaio pequeno eram acrescentados o top agarose, o IPTG e o tampão acetato e a mistura era deixada em banho-maria a 52°C. Enquanto isso, a bactéria era infectada com os fagos por 20min a 37°C e 0,3ml da suspensão infectada era acrescentada ao tubo em banho-maria juntamente com o sangue. O conteúdo era homogeneizado e imediatamente vertido em uma placa contendo uma fina camada de LB ágar sólido. As placas eram incubadas a 37°C por 16h e 24h e analisadas quanto ao aparecimento de halos hemolíticos.

### **Obtenção de produtos de RT-PCR para construção de uma biblioteca de cDNA de promastigotas de *Leishmania amazonensis*:**

Para construir a biblioteca de cDNA de promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária, 4,5 x 10<sup>8</sup> parasitas foram coletados no quarto e quinto dias de crescimento e

usados em uma extração de RNA total utilizando o kit *RNeasy* (QIAGEN). O RNA extraído foi utilizado para síntese de cDNA com o kit *SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen) e Oligo dT. Foi feita uma reação em paralelo sem a enzima transcriptase reversa, como controle negativo. Os cDNAs foram utilizados em uma PCR utilizando os *primers* oligo dT e *Spliced leader*. Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 1% e divididos em três amostras de acordo com faixas de peso molecular. Estes produtos, purificados de gel de agarose, serão utilizados para construção de uma biblioteca de expressão de promastigotas de *L. amazonensis*, utilizando vetores de expressão de proteínas potencialmente tóxicas para bactérias.

### **Cultivo e estoque de promastigotas**

As espécies de *Leishmania* utilizadas neste trabalho foram a *L. major*, linhagem Friedlin e *L. amazonensis*, cepa PH8. As amostras preservadas em nitrogênio líquido eram descongeladas e inoculadas em meio de cultura Schneider (Sigma Chem. Co.) acrescido de 10% v/v de soro fetal bovino. O crescimento dos parasitas era acompanhado ao microscópio invertido (Olympus IMT, Tóquio, Japão) para verificar o crescimento adequado do parasita e a ausência de contaminação. Os parasitas utilizados eram colhidos preferencialmente no quinto dia de cultivo, no ponto máximo de seu crescimento e início da fase estacionária, quando a atividade hemolítica era máxima (Noronha *et al.*, 1996). A contagem das promastigotas era feita utilizando uma pequena alíquota retirada das garrafas de cultura. Essa alíquota era diluída num determinado volume de ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5 % v/v, pH 7,2), 10 µl dessa diluição eram então aplicados em câmara hemacitométrica de Neubauer (C. A. Hausser & Son, Philadelphia, USA) e a contagem das promastigotas era feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A média aritmética dos quatro quadrantes para contagem de células era obtida e multiplicada pelo inverso da diluição em ISOTON e novamente multiplicada por  $10^4$ , o fator de correção da câmara, para a obtenção do número de parasitas por *ml* de cultura. O número máximo de passagens que as promastigotas eram submetidas era dez, uma vez que parasitas mantidos culturas *in vitro* por longo tempo perdem suas características, incluindo a virulência.

Após serem lavadas cinco vezes com PBS, as promastigotas eram aliquotadas e congeladas a -80 °C em tubos tipo *Eppendorf* até o momento do uso. Essas massas de parasitas eram posteriormente ressuspensas em tampões apropriados para extração de DNA genômico, extração de RNA ou preparação de extratos para ensaio hemolítico.

### **Preparo dos extratos de parasita utilizados em ensaio hemolítico**

Alíquotas de  $2 \times 10^9$  promastigotas de *L. major* eram ressuspensas em tampão ácido bórico-NaOH 50mM pH 7,0. Esta suspensão era então submetida a cinco ciclos de congelamento-descongelamento em N<sub>2</sub> líquido e banho-maria 37°C para rompimento dos parasitas. Este extrato total era então submetido a uma rápida centrifugação a 1000g durante 5 minutos para sedimentação dos núcleos e parasitas íntegros. O sobrenadante, o extrato total, era então transferido para outro tubo de 1,5ml e centrifugado durante uma hora a 10.000g para sedimentar as frações de membrana. Em seguida o sobrenadante era desprezado, o sedimento rico em membranas era ressuspendido para o volume inicial, acrescido de 0,4% de CHAPS ({3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propanosulfato}) (Sigma), concentração sub-lítica para as hemácias, e incubado por 1 hora a 4°C com agitação ocasional. Depois desse tratamento, a fração de membranas solubilizada era novamente centrifugada a 10.000g e o sobrenadante, o extrato da fração de membranas solubilizado (Ext-ms), era então utilizado nos experimentos.

### **Preparo dos extratos de bactéria utilizados em ensaio hemolítico**

Os extratos bacterianos eram obtidos da seguinte maneira: os *pellets* das bactérias coletadas nos tempos 0, 4 e 24hs após a indução da expressão protéica foram ressuspensos em 100µl de tampão borato, submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento e então centrifugados. Após esta centrifugação, 100µl do sobrenadante obtido e o *pellet* ressuspendido em 100µl de tampão borato foram utilizados em um ensaio hemolítico padrão.

## **Ensaio hemolítico**

### *Padronização de hemácias*

Hemácias humanas eram colhidas e mantidas diluídas em solução preservativa de Alsever (glicose 100mM, citrato de sódio 30mM, NaCl 70mM, pH 6,0) na proporção 1:3, onde ficavam guardadas a 4°C por até três semanas. Antes de serem utilizadas, as hemácias eram lavadas três vezes com PBS. O número de células era determinado de modo indireto através da liberação da hemoglobina na lise em água. Após a última lavagem, 100µl do sedimento de hemácias eram colocados em 900µl de PBS e 100µl dessa nova suspensão eram colocados em 1400µl de água destilada para rompimento das células. O produto da lise era então lido a 545nm e, uma vez conhecida a densidade óptica, obtínhamos o número de hemácias presentes nos 1000µl da suspensão formada. Sabendo que 0,7 unidade de absorbância corresponde a  $1 \times 10^9$  hemácias, o número de células era determinado.

### *Determinação da atividade hemolítica*

A atividade hemolítica dos extratos ou frações obtidas dos mesmos era determinada fazendo-se a sua diluição em série (1:2) em placa de micro-ensaio Nunc (Dinamarca). Após a diluição, 200µl de tampão acetato (tampão acetato de sódio-ácido acético 20mM, pH 5,5 com 150mM de cloreto de sódio) contendo  $5 \times 10^6$  hemácias eram acrescentados em cada compartimento. Após incubação de 30 minutos a 37°C, a placa era então centrifugada por 10 minutos a 500g para sedimentar as hemácias não rompidas. A hemoglobina liberada no sobrenadante era lida em placa de fundo chato Nunc a 414nm, em leitor de ELISA. Para os cálculos de porcentagem de lise, a quantidade total de hemoglobina liberada era obtida provocando-se a lise da mesma quantidade de hemácias de cada compartimento com 10µl de solução de Triton X-100 a 0,25%. Eram ainda reservados compartimentos que continham somente as hemácias e tampão para se fazer o controle da lise espontânea que era sempre deduzida dos valores obtidos.

## **Amplificação das sequências de hemolisina III de *Leishmania major* depositadas no banco de dados GeneDB:**

As sequências de interesse foram amplificadas por PCR utilizando DNA genômico extraído de *L. major* e o SuperMix High Fidelity (Gibco), que possui a enzima *Taq* DNA

polimerase e uma DNA polimerase de *Pyrococcus* com atividade corretora 3'→5'. Foram desenhados pares de iniciadores específicos que amplificam as sequencias depositadas por completo, correspondendo à região codificadora dos supostos genes. Estes *primers* contêm sítios para digestão pelas endonucleases *XhoI* (extremidade 5') e *Xba* (extremidade 3') para clonagem no vetor pBADgIII (Invitrogen) (**Tabela 2**) e pelas enzimas *BglII* (extremidade 5') e *BamHI* (extremidade 3') para clonagem no vetor pX63NEO, um vetor para expressão em *Leishmania* cedido pela Dra. Ângela Cruz, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Cada reação continha 2µl de DNA genômico, 1µl de cada iniciador a 10 pmoles/µl e 45µl do Supermix, em um volume final de 50µl. As reações foram feitas em termociclador PTC-100TM (MJ Research Inc) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos a separação por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio 0,1mg/ml, e visualizados em luz ultravioleta.

#### **Purificação de fragmentos obtidos por PCR e digestão:**

Após a separação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose, os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados usando o kit *GFX gel and pcr purification kit* (GE Healthcare), que se baseia na adsorção de DNA em sílica, conforme instruções do fabricante. Nos casos de purificação dos produtos de digestão dos fragmentos de PCR, as amostras eram purificadas diretamente da reação de digestão conforme instruções do mesmo kit citado acima.

#### **Digestão dos produtos de PCR e ligação em vetores plasmidiano:**

Os produtos de PCR purificados e os vetores utilizados nas clonagens eram submetidos à digestão com as endonucleases de restrição específicas para cada *primer* e para cada clonagem. A reação total continha: 15µl do produto de PCR purificado ou 3µg do vetor, 1µl de cada enzima (aproximadamente 10 unidades), 4µl de tampão, 4µl de BSA 10x e água suficiente para completar um volume de 40µl. A reação era então incubada a 37°C por 4 horas e os produtos purificados conforme descrição anterior. Ao final de todas as



<b>Iniciador</b>	<b>Direção</b>	<b>Sequência</b>
5520 RT PCR	direto	GGCCATCACCACAAACAGAG
5520 RT PCR	reverso	GCTCAGGTCATACAAGGGGA
GAPDH RT PCR	direto	ACATGAAGGACATTCTCGGC
GAPDH RT PCR	reverso	GTAGCCCCACTCGTTGTCAT
0750 RT PCR	direto	AETGECTCCTGCATCTTTGT
0750 RT PCR	reverso	CTCGTCGTGTCCAGTGAAAAC
5500 RT PCR	direto	GTCGGTTCCTCGTTGAAAAC
5500 RT PCR	reverso	TGCCGTAGTAGTCAAGTGCG
5510 RT PCR	direto	ACGGCTGGACTTTATAGGCA
5510 RT PCR	reverso	TCAACCGCACTEGTACATTC
P5520fw	direto	ATGAACGADGCACTAACCAGE
P5520rev	reverso	TTACGGCGCACTCACCGCCCA
GFP pBAD	direto	CCGCTCGAGCATGAGTAAAGGAGAAGAA
GFP pBAD	reverso	<u>CGTCTAGAGT</u> TTTGTATAGTTCATECCAT
5520 pBAD	direto	<u>CCGCTCGAGCAT</u> GAAACGACGCACTAACC
5520 pBAD	reverso	<u>GCCTAGAGG</u> CGCGCACTCACCGCCCAAC
5510 pBAD	direto	CCGCTCGAGCATGTCTETGAAGGCAACA
5510 pBAD	reverso	<u>CGTCTAGAGT</u> TCCGCACATGCCATCGCT
0750 pBAD	direto	<u>CCGCTCGAGCAT</u> GCAGCGAGGCCATGGA
0750 pBAD	reverso	<u>GCCTAGAGT</u> GCCGCACTGGACGAGGTC
5500 pBAD	direto	CCGCTCGAGCATGTTTTCTEGCAAGAGC
5500 pBAD	reverso	<u>CGTCTAGAGT</u> CACGCACACGATCGTTTC

Tabela 2: Descrição da sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho nos experimentos de PCR em Tempo Real (RT PCR) e para clonagem no vetor pBADgIII (pBAD).

digestões, as endonucleases eram inativadas a 75°C por 15 minutos e a reação era estocada a 4°C até sua utilização. Os insertos e vetores digeridos eram submetidos a uma reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) a 16°C por 24 horas. O produto da ligação era então utilizado na transformação de bactérias competentes.

### **Obtenção de bactérias termocompetentes**

Para os experimentos de transformação bacteriana, foi utilizada a linhagem de *E. coli* XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI<sup>q</sup>Z M15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)] termocompetente, preparada pela inoculação de uma colônia isolada em 10ml de meio LB e incubação sob agitação (180 rpm) a 37°C por 12 horas. Cerca de 1ml da pré-cultura era transferido para uma nova cultura de 50ml de meio LB e novamente incubada a 37°C sob forte agitação até a obtenção de OD<sub>600nm</sub> entre 0,2-0,6. As células eram coletadas por centrifugação a 5000g por 10 minutos, concentradas em 3ml de solução para indução de competência (1g tripton; 0,5g extrato de levedura; 0,5g NaCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub>; PEG 8.000 10% (p/v) e 5ml DMSO para 100ml de solução, pH 7,5) e incubadas por 10 minutos no gelo. Após a adição e homogeneização de glicerol 15%, a suspensão era dividida em alíquotas de 300µl. Estas foram congeladas imediatamente em gelo seco e estocadas a -80°C até o uso.

### **Transformação de bactérias termocompetentes:**

Bactérias *E. coli* XL1-Blue termocompetentes foram utilizadas para transformação por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989). A transformação foi feita adicionando 1µl da solução de DNA a uma alíquota de 50µl da suspensão de bactérias e incubando a mistura em gelo por 30 minutos. A solução foi submetida a um choque térmico de 42°C por 1 minuto e 0°C no gelo por mais 1 minuto. Adicionou-se 250µl de meio LB e incubou-se a 37°C por 1 hora. A cultura transformada foi plaqueada em meio LB-ágar (LB + 15g/L ágar) acrescido de 100 µg/ml de ampicilina e incubada por 37°C por 16 horas.

### **Obtenção de bactérias eletrocompetentes:**

Para preparação das bactérias eletrocompetentes, uma colônia isolada de *E.coli* da linhagem LMG194 foi inoculada em 100ml de 2xYT e mantida sob agitação a 37°C por aproximadamente 16 horas. Em seguida, 10ml desta cultura foram diluídos em 1 litro de 2xYT (sem antibióticos). Ao alcançar a OD<sub>600</sub> de 0,2 - 0,6, a cultura foi resfriada no gelo. Uma vez resfriada, a mesma foi dividida em 6 garrafas e centrifugada a 10.000rpm por 10 minutos (centrífuga Hitachi CR216II) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e cada *pellet* ressuspenso em 50ml de glicerol 10% frio e estéril, mantido no gelo por todo o tempo, sendo que nesta etapa todo o volume foi transferido para apenas 2 garrafas e submetido a nova centrifugação por 15min a 10.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado imediatamente para evitar perda de células. Os *pellets* foram ressuspenso em 100ml de glicerol 10%, unificados e novamente centrifugados nas condições descritas anteriormente. Novamente o *pellet* foi ressuspenso em 50ml de glicerol 10% e centrifugado por 20 min a 10.000 rpm, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 1ml de glicerol 10%. Alíquotas de 50µl foram congeladas rapidamente em gelo seco/etanol e em seguida estocadas a -80°C.

### **Transformação de bactérias eletrocompetentes:**

Alíquotas contendo bactérias *E.coli* da linhagem LMG194 eletrocompetentes foram descongeladas no gelo por 15min. Foi adicionado vagarosamente 1µl de DNA e a solução foi mantida no gelo por 5 min. Em seguida, as bactérias foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0,2cm (Bio-Rad) estéril, sendo submetidas à um campo elétrico nas seguintes condições: 1,8Kvolts, 200 OHMS de resistência, 25µFD de capacitância. Depois do choque elétrico foram adicionados 500µl de meio LB. Em seguida, o conteúdo da cubeta foi totalmente transferido para um tubo de 1,5 ml estéril e incubado a 37°C por 1 hora sob agitação. Em seguida as bactérias foram selecionadas em placas contendo ampicilina (100µg/ml).

### **Seleção de clones bacterianos por PCR de colônia**

As colônias de bactérias obtidas após transformação e plaqueamento foram repicadas simultaneamente para outras placas de LB-ágar contendo ampicilina 100µg/ml e para tubos contendo 30µl de tampão de lise para PCR (10mM Tris pH 8,0; 100µM EDTA; Tween 20 0,1%). Após fervura a 95°C por 10 minutos, a preparação foi centrifugada a 14.000 rpm por 2 minutos e 4µl do sobrenadante foram utilizados para a reação de PCR. Cada reação continha ainda 50µM de cada dNTP, 0,2µl de Taq polimerase (Phoentria), 2µl do tampão da taq 10x e 1µl de cada iniciador a 10 pmoles/µl, em um volume final de 20µl. As reações foram feitas em termociclador PTC-100TM (MJ Research Inc) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos; 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio 0,1mg/ml e visualizados em luz ultravioleta.

### **Obtenção do DNA plasmidiano em pequena escala:**

Preparações de DNA plasmidiano em pequena escala (*miniprep*) foram obtidas utilizando colunas do kit *GFX Plasmid mini kit* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante, ou um protocolo caseiro baseado no método de lise alcalina, de acordo com Sambrook *et al.*, 1989. A eficiência da purificação foi analisada através da separação de 1µl das amostras de DNA obtidas em géis de agarose 1% e por espectrofotometria a 260 nm.

### **Indução da expressão de proteínas recombinantes:**

As colônias de bactérias foram crescidas em 3ml de meio LB com ampicilina (100µg/ml) por aproximadamente 16 horas, a 37°C, em agitador (200 rpm). Em seguida foi feito um repique de 1:100 em frascos contendo 10ml de meio LB e o mesmo antibiótico. Após cerca de 2 horas foram obtidas leituras de densidade óptica das culturas a 600nm. Ao atingir uma OD<sub>600</sub> 0,4, foi coletado 1ml das culturas (0h) antes de adicionar IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) 1mM ou arabinose (0,2%), conforme o vetor utilizado. Novas amostras foram coletadas após 4 horas de indução, mantendo-se sempre o mesmo número de células, de acordo com a densidade óptica das amostras colhidas no tempo 0h. As amostras

foram centrifugadas a 14.000 rpm (Eppendorf) e os *pellets* ressuspensos em 75µl de água. Após a adição de 25µl de tampão da amostra (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,00125%) as amostras foram fervidas por 5 min. O material foi então utilizado para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, como descrito em Ausubel e Cols. (1995).

#### **Extração de RNA total de promastigotas de *Leishmania major*:**

Cerca de  $4 \times 10^8$  promastigotas em início da fase estacionária eram utilizadas para extração e purificação de RNA total. Os parasitas eram centrifugados a 10.000 rpm (centrífuga Hitachi CR216II) por 10min e lavados 2 vezes em PBS. O *pellet* de parasitas era armazenado a -80°C até sua utilização. A extração era realizada utilizando o kit *Nucleospin RNA II (Macherey-nagel)*, conforme instruções do fabricante. Durante as preparações, era utilizada DNase para eliminar a contaminação com DNA genômico. A eficiência da extração de RNA era analisada por espectrofotometria a 260nm.

#### **PCR em Tempo Real:**

Cerca de 300ng do RNA era utilizado para síntese de cDNA com o kit *SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen) e Oligo d(T). O cDNA produzido era armazenado a -20°C até ser utilizado. O nível de expressão dos RNAs mensageiros dos 4 genes em estudo foi analisado por PCR em Tempo Real. Foi utilizado o SYBR Green, corante fluorescente que fluoresce quando ligado ao sulco menor da dupla fita de DNA e excitado por uma fonte de luz. Iniciadores específicos para a PCR em Tempo Real foram desenhados para cada gene alvo, uma vez que para este experimento é desejável que seja amplificado um produto de PCR de no máximo 200pb. Os iniciadores utilizados estão listados na **Tabela 2**. Como controle endógeno foi utilizado o gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *L.major*. A reação foi realizada em placas de 96 poços (Applied Biosystems), com 5µl de SYBR Green 2x, 1µl do iniciador *forward* e 1µl do reverso e 3µl de cDNA por poço. O experimento foi realizado em triplicata para cada gene. Para a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foi utilizado o método  $C_T$  comparativo ( $\Delta\Delta C_T$ ).

## **RESULTADOS:**

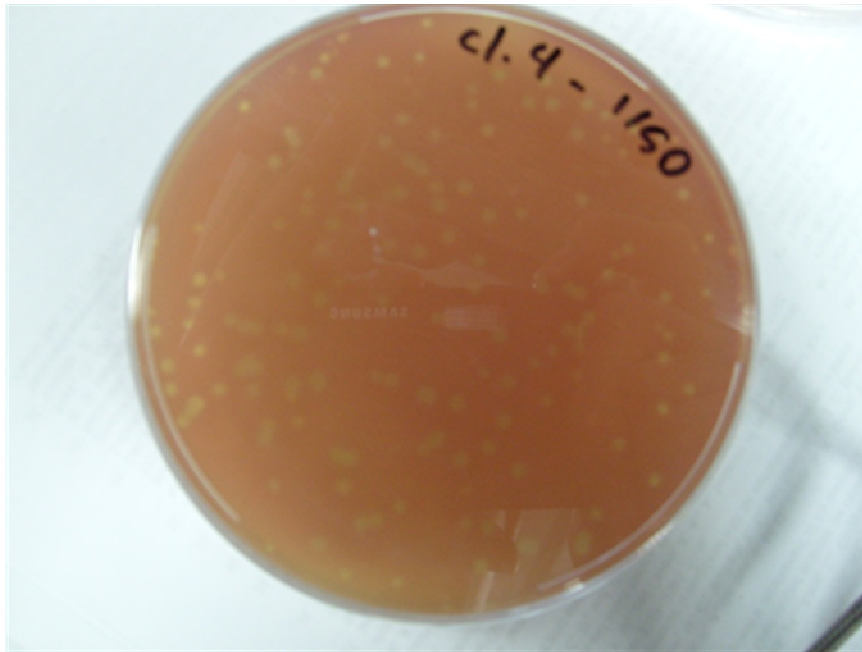
### **1. *Screening* funcional de uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *Leishmania amazonensis*:**

Uma biblioteca de cDNA de formas amastigotas de *L. amazonensis* construída pelo grupo da Dra. Clara Barbiéri em fagos T7 (Gentil *et al.*, 2007) foi utilizada para realizarmos um *screening* funcional com o objetivo de identificar proteínas hemolíticas, possíveis candidatas a serem responsáveis pela atividade citolítica de *Leishmania*. Segundo protocolo previamente padronizado em nosso laboratório, bactérias da linhagem Y1090 eram infectadas com os fagos, plaqueadas em top ágar contendo 5% de sangue e IPTG 2,5mM e incubadas a 37°C por 16 horas para induzir a expressão das proteínas recombinantes. A **Figura 3** mostra uma placa após 16 horas de incubação, sendo que os pequenos halos correspondem à lise bacteriana causada pelo fago. Não conseguimos identificar clones hemolíticos, mesmo após o *screening* de aproximadamente 120.000 clones. O genoma do parasita possui aproximadamente 32.8Mb (Gentil *et al.*, 2007) e o tamanho médio da biblioteca era de 1.3Kb. Verificamos, posteriormente, que a biblioteca de cDNA que nos foi fornecida havia perdido sua representatividade pois, antes de nos ser enviada, havia sido amplificada de forma inadequada, o que tornou inviável persistir nesta estratégia naquele momento.

### **2. Construção de uma biblioteca de cDNA de promastigotas de *Leishmania amazonensis*:**

Simultaneamente, resolvemos construir nossa própria biblioteca de de cDNA para ser clonada em vetor de expressão para o *screening* funcional. Para a extração de mRNA, utilizamos promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento nos 4º e 5º dias de cultivo, uma vez que a atividade hemolítica do extrato do parasita alcança um pico nesta fase, apresentando uma atividade 6 vezes maior do que em fase logarítmica (Almeida-Campos, 2001).

A partir do RNA total extraído de promastigotas foi sintetizado o cDNA utilizando oligo dT como *primer* . Os produtos da reação de transcrição reversa foram utilizados em



**Figura 3-** Placa representativa do *screening* por hemólise de uma biblioteca de cDNA de amastigotas de *L. amazonensis*. Bactérias infectadas com fagos eram plaqueadas em top ágar contendo 5% de sangue humano e IPTG (2,5mM). A placa era incubada por 16 ou 24 horas a 37°C e então analisada quanto a presença de halos hemolíticos. Os pontos claros correspondem às placas de lise formadas pelos fagos ao lisar as bactérias. A figura mostra uma placa após 16 horas de incubação.

uma reação de PCR utilizando oligo dT e a sequência de *splice leader* de *L. major* como iniciadores. Como podemos observar na **Figura 4**, foi possível amplificar fragmentos que variam de cerca de 500pb a mais de 5.000pb, em ambas as amostras obtidas. Estes produtos purificados de RT-PCR, que contêm a sequência completa dos mRNAs expressos no parasita, serão clonados em um vetor de expressão regulada para ser realizado um novo *screening* por proteínas hemolíticas.

### **3. Busca de sequências anotadas como hemolisinas no genoma de *Leishmania major***

Uma vez que o genoma de *L. major* já foi completamente sequenciado (Ivens *et al.*, 2005), resolvemos investigar se havia alguma sequência no banco de dados GeneDB que tivesse sido anotada como codificadora de hemolisinas presentes no genoma de *L. major*, na tentativa de identificar a leishporina.

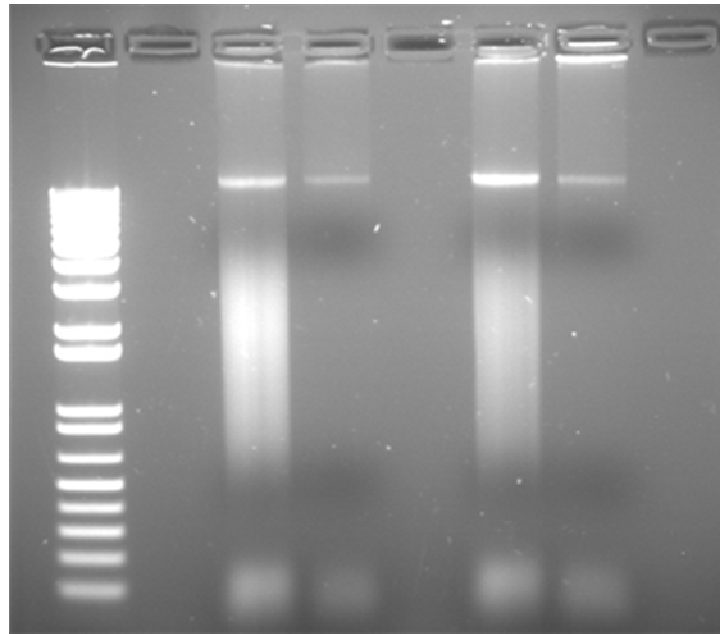
#### **3.1 Atividade hemolítica do extrato solúvel de membrana (Ext-ms) de promastigota de *Leishmania major*:**

Como dito anteriormente, a leishporina é uma citolisina que foi descrita inicialmente em *L. amazonensis*, mas cuja atividade citolítica foi também detectada em *L. major*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Noronha *et al.*, 1996). Para confirmar a atividade hemolítica de *L. major*, realizamos um ensaio hemolítico utilizando extratos de proteínas solubilizadas de membrana de promastigotas (Ext-ms) em um ensaio hemolítico. Na **Figura 5** está o resultado representativo da atividade hemolítica que era encontrada nos Ext-ms logo após sua preparação.

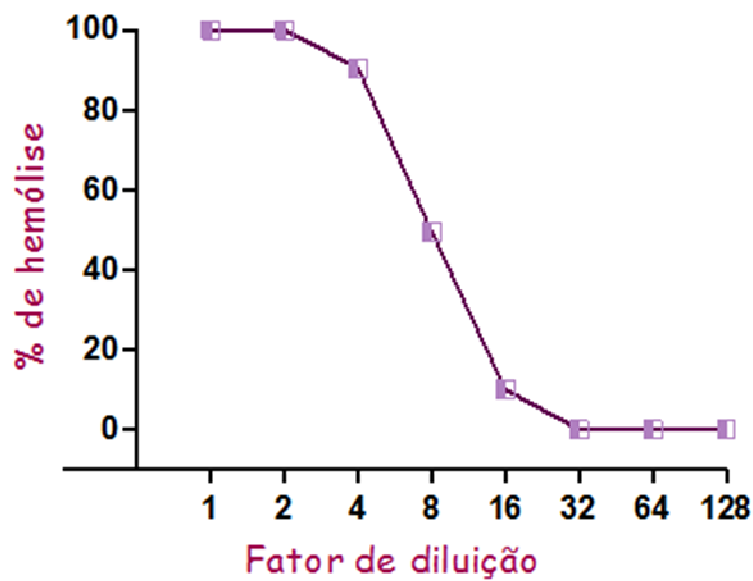
#### **3.2. Análise do banco de dados Pfam de *Leishmania major* no GeneDB:**

Proteínas geralmente possuem uma ou mais regiões funcionais denominadas domínios, cuja identificação pode nos dar uma idéia de sua função. Pfam é um banco de dados de famílias de proteínas que inclui anotações geradas a partir de alinhamentos múltiplos usando o modelo oculto de Markov. Desta forma, o banco de dados Pfam agrupa





**Figura 4-** Amplificação por RT-PCR das sequências dos mRNAs de promastigotas de *L. amazonensis*. RNA total de *L. amazonensis* de 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias de cultivo foi extraído e utilizado para a síntese de cDNAs com o kit *SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR* (Invitrogen) e Oligo d(T). Foi feita uma reação em paralelo sem a enzima transcriptase reversa. Os cDNAs foram utilizados em uma PCR utilizando os *primers* Oligo d(T) e *Spliced leader*. Como controle negativo (C-) foi feita uma PCR da reação de transcrição reversa feita sem a enzima transcriptase reversa. Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 1% e corados com brometo de etídeo. PM= Peso Molecular 1Kb Plus *DNA ladder* (Invitrogen).



**Figura 5-** Atividade hemolítica de extrato de membranas (Ext-ms) de promastigotas de *L. major*: Ext-ms diluídos em série eram incubados com  $5 \times 10^6$  hemácias humanas em  $200\mu\text{l}$  de tampão de lise durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . As hemácias eram sedimentadas e o sobrenadante era lido a  $414\text{nm}$  para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica está expressa em porcentagem de hemólise, calculada em relação à lise total obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias.

famílias de proteínas a partir da identificação de domínios. Analisando a lista de Pfam descrita para este parasita, encontramos 4 sequências anotadas como hemolisinas do tipo III (**Figura 6**), cuja identificação de Pfam é PF03006: LmjF06.0750, LmjF36.5500, LmjF36.5510, LmjF36.5520. Membros desta família são proteínas integrais de membrana incluindo uma proteína com atividade hemolítica de *Bacillus cereus*. As 4 sequências encontradas foram descritas como codificadoras de proteínas hipotéticas, conservadas, possuindo uma janela de leitura completa, do códon de iniciação ao códon de terminação. A **Tabela 3** mostra as características gerais de cada uma das sequências. Todas as sequências possuem apenas 1 cópia no genoma, não possuem peptídeo sinal ou sinal de adição de âncora GPI e prediz-se que todas as sequências possuam 6 ou 7 hélices transmembranas. Seus tamanhos variam de 338 a 670 aa, com pesos moleculares de aproximadamente 38 a 70 kDa e PIs de 8,5 a 8,9. As informações contidas na tabela, assim como o mapa de cada uma das proteínas, foram retiradas do banco de dados GeneDB, exceto o número de cópias de cada sequência no genoma do parasita, que foi encontrado utilizando a ferramenta **Basic Local Alignment Search Tool**, ou **BLAST**, um algoritmo para comparação de sequências de aminoácidos ou nucleotídeos.

Análises *in silico* no banco de dados TrytripDB revelou a presença de ortólogos das sequências anotadas como hemolisinas III de *L. major* em outros tripanossomatídeos que já tiveram seu genoma sequenciado (*L. brasiliensis*, *L. infantum*, *T. brucei* e *T. cruzi*). Como mostra a **Figura 7A**, o gene LmjF36.5520 possui ortólogos em todos os tripanossomatídeos analisados, enquanto a sequência LmjF36.5500 é exclusiva de *L. major*. As sequências 5500, 5510 e 5520, estão organizadas *in tandem* no cromossomo 36 da *L. major*, enquanto a 0750, no cromossomo 6 (**Figura 7B**).

#### **4. Expressão dos genes anotados como hemolisinas III de *Leishmania major***

Com o objetivo de verificar se essas quatro sequências de *L. major* anotadas como sendo codificadoras de hemolisinas III correspondem a genes que são expressos no parasita, extraímos o RNA total de promastigotas em início de fase estacionária, produzimos cDNAs por transcrição reversa e os utilizamos em uma reação de PCR com o iniciadores específicos de cada sequência. Como pode ser observado na **Figura 8**, os mRNAs correspondentes às quatro sequências analisadas são expressos em promastigotas.

[Previous 100](#) This list takes you to the first entry that starts with the selected letter, and shows you the next 100 alphabetical entries

[Q](#) [R](#) [A](#) [B](#) [C](#) [D](#) [E](#) [F](#) [G](#) [H](#) [I](#) [J](#) [K](#) [L](#) [M](#) [N](#) [O](#) [P](#) [Q](#) [R](#) [S](#) [T](#) [U](#) [V](#) [W](#) [X](#) [Y](#) [Z](#)

[Haemolysin-III related PF03006](#) (4) 

<i>L. major</i>	CDS	<a href="#">LmjF06.0750</a>	hypothetical protein, conserved
<i>L. major</i>	CDS	<a href="#">LmjF36.5500</a>	hypothetical protein, conserved, CHR36_tmp.136c
<i>L. major</i>	CDS	<a href="#">LmjF36.5510</a>	hypothetical protein, conserved, CHR36_tmp.137c
<i>L. major</i>	CDS	<a href="#">LmjF36.5520</a>	hypothetical protein, conserved, CHR36_tmp.138c

Accession number: PF03006



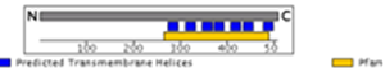
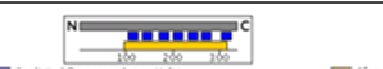
Previous identifiers: UPF0073;

Haemolysin-III related

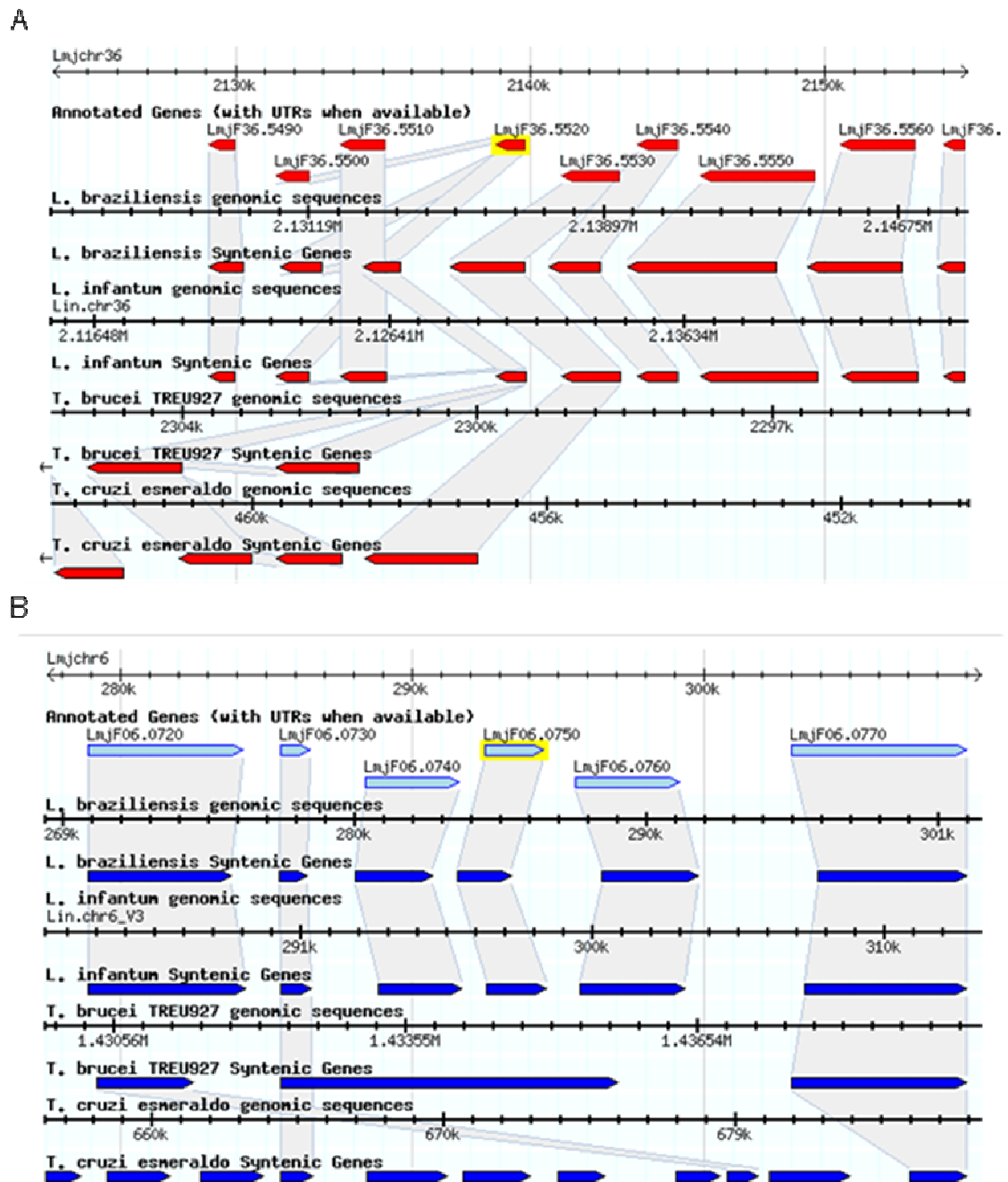
[Add Annotation](#)

Members of this family are integral membrane proteins. This family includes a protein with hemolytic activity from *Bacillus cereus*. It is not clear if all the members of this family are hemolysins. It has been proposed that YOL002c encodes a *Saccharomyces cerevisiae* protein that plays a key role in metabolic pathways that regulate lipid and phosphate metabolism [2].

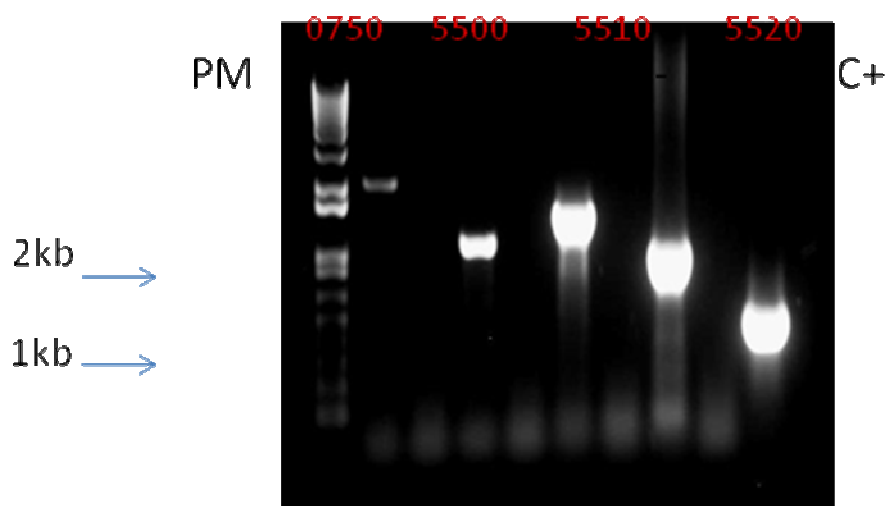
**Figura 6:** Análise da lista de Pfam de *L. major* no banco de dados GeneDB. A busca no banco de dados revelou 4 sequências hipotéticas anotadas como hemolisinas III por apresentar homologia com o domínio que caracteriza esta família de proteínas. O número de Pfam PF03006 caracteriza uma família de proteínas integrais de membrana com atividade hemolítica descrita primeiramente em *Bacillus cereus*.

Identificador GeneDB	Adição de âncora GPI	Peptídeo sinal	Mapa protéico e E-value *	Nº de cópias no genoma
<b>Imj106_0750</b> 670 aa 70 kDa pI 5.5 6 helices transmembrana	Não	Não	 <p>Plan: Resíduos 28-655 - E-value: 5.3e-09</p>	1
<b>Imj136_5500</b> 364aa 41 kDa pI 8.9 7 helices transmembrana	Não	Não	 <p>Plan: Resíduos 104-347 - E-value: 2.9e-37</p>	1
<b>Imj136_5510</b> 507aa 56 kDa pI 8.9 7 helices transmembrana	Não	Não	 <p>Plan: Resíduos 265-489 - E-value: 7.1e-40</p>	1
<b>Imj136_5520</b> 333aa 38 kDa pI 8.7 7 helices transmembrana	Não	Não	 <p>Plan: Resíduos 96-316 - E-value: 2.9e-53</p>	1

**Tabela 3: Informações sobre as sequências anotadas como hemolisinas III de *L. major* no banco de dados GeneDB. \*O E-value é conhecido como *Expectation value* e é um valor calculado através do alinhamento da sequência de interesse com a sequência do banco de dados. Quanto menor o E-value, mais próximas são as sequências comparadas.**



**Figura 7** : Análise da presença de genes ortólogos de hemolisina III de *L. major* em outros tripanossomatídeos. As seqüências: LmjF36. 5500, LmjF36. 5510, LmjF36. 5520 e LmjF06.0750 foram analisadas quanto a presença no genoma de outros tripanossomatídeos cujo genoma foi sequenciado. A figura foi obtida através de análises no banco de dados TrytripDB. A) cromossomo 36 de *L. major* e B) Cromossomo 6 de *L. major*.



**Figura 8: Expressão dos genes anotados como hemolisinas III de *L. major*:** RNA total de promastigotas de *L. major* foi extraído e aproximadamente 300ng foram utilizados para a síntese de cDNA com o kit SUPER-SCRIPT FIRST STRAND SYNTHESIS SYSTEM FOR RT-PCR (Invitrogen). O *primer* utilizado para a síntese de cDNA foi o oligo d(T). Os cDNAs foram submetidos a uma PCR para verificar a expressão dos RNAs mensageiros das 4 sequências anotadas como hemolisinas III de *L. major*. *Primers* específicos que amplificam a região codificadora completa dos 4 genes foram utilizados (Tabela 3). (+) PCR a partir de uma reação de transcrição reversa na presença da enzima transcriptase reversa, (-) PCR a partir de uma reação de transcrição reversa sem a transcriptase reversa, (C+) PCR a partir de uma reação de transcrição reversa utilizando um RNA controle fornecido pelo kit. PM = Padrão de peso molecular 1kb *Plus DNA ladder* (Invitrogen). Tamanho da região codificadora de cada gene: LmjF06.0750 – 2000pb, LmjF36.5500 – 1092pb, LmjF36.5510 – 1524pb, LmjF36.5520 – 1014pb.

Os fragmentos amplificados correspondem ao tamanho esperado da região codificadora de cada gene, a saber: LmjF06.0750 – 2000pb, LmjF36.5500 – 1092pb, LmjF36.5510 – 1524pb, LmjF36.5520 – 1014pb,

Os cDNAs produzidos foram utilizados também em uma PCR em tempo real para verificarmos os níveis de expressão dos mRNAs das supostas hemolisinas. Desenhamos novos *primers* específicos para cada um dos genes estudados e para o controle endógeno GAPDH (**Tabela 2**), pois neste tipo de experimento é desejado que um pequeno fragmento seja amplificado para obter uma melhor eficiência na quantificação (máximo 200pb). A PCR em tempo real é capaz de quantificar a reação através da coleta de dados de emissão de fluorescência ao longo da reação. Portanto, quanto maior o número de cópias iniciais da sequência alvo, mais rápido será observado o aumento da fluorescência. Utilizamos o SYBR Green como fluoróforo e o gene GAPDH como normalizador. Os dados foram coletados e analisados pelo método do  $\Delta\Delta C_t$  para construção do gráfico mostrado na **Figura 9**. Verificamos que, dentre os genes estudados, o mRNA de LmjF36.5520 é o mais expresso, sendo cerca de 120 vezes mais expresso que o do LmjF36.0750, que corresponde ao mRNA menos expresso. Os mRNAs de LmjF36.5500 e LmjF36.5510 são cerca de 25 e 20 vezes mais expressos, respectivamente, que o de LmjF36.0750.

As curvas de dissociação (**Figura 10**) indicaram que, como desejado, somente as sequências alvos foram amplificadas, pois apenas um pico, correspondente a uma temperatura de dissociação, foi obtido para cada sequência, não sendo detectados fragmentos inespecíficos.

## 5. Amplificação gênica por PCR e clonagem no vetor TOPO 2.1

Inicialmente, fizemos o alinhamento da sequência correspondente ao domínio que caracteriza a família das hemolisinas III dos 4 genes de *L. major* (ver tabela 3) com a sequência do mesmo domínio de *B. cereus* (**Figura 11**), organismo no qual esta proteína foi primeiramente caracterizada, utilizando o programa de alinhamento global para DNA ou proteína, denominado ClustalW. O *score* deste alinhamento, que é a pontuação dada às



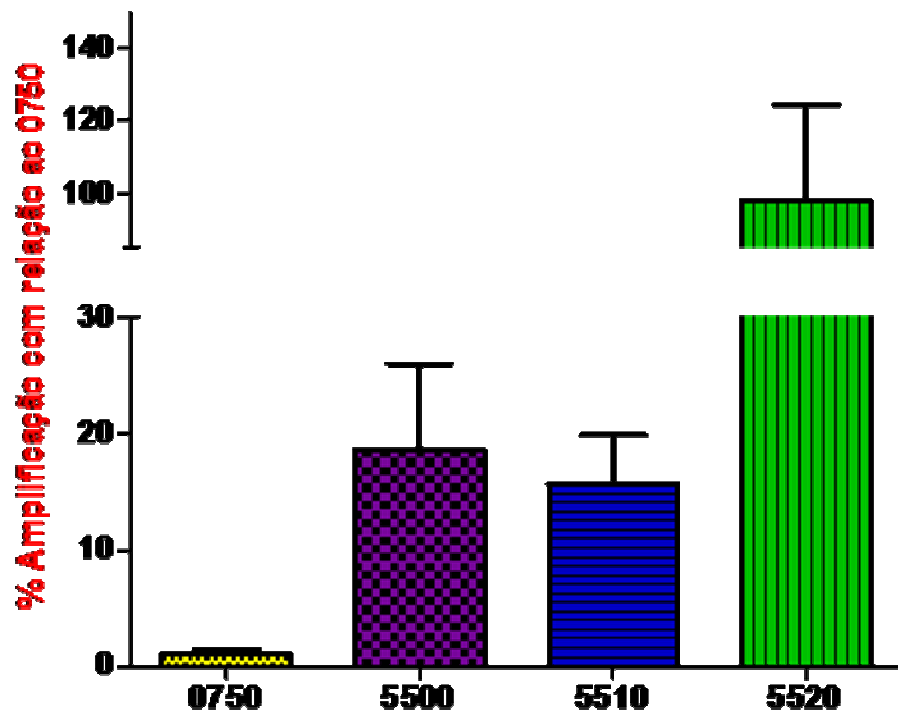
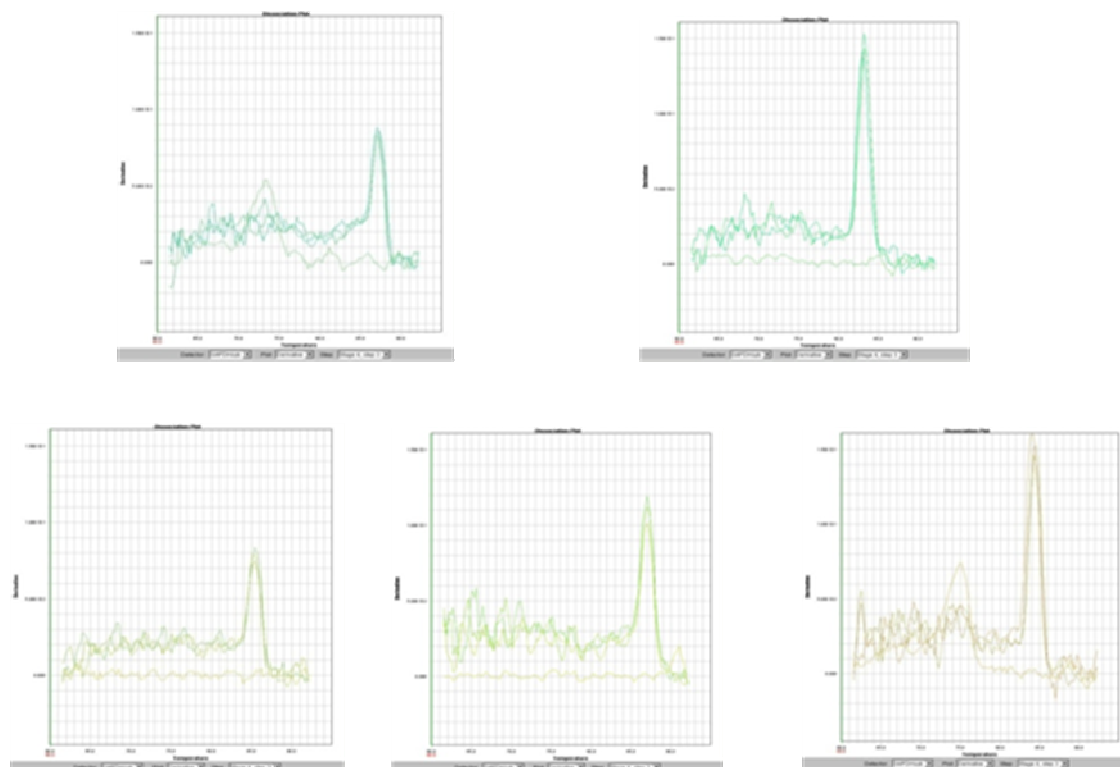


Figura 9 – Níveis relativos de expressão dos supostos genes de hemolisina III em promastigotas de *L. major*. RNA total isolado de promastigotas foi utilizado para síntese de cDNA e este para medida da expressão dos genes por PCR em Tempo Real utilizando o corante SYBR green. *Primers* que amplificam aproximadamente 100pb da região codificadora de cada gene foram utilizados (Tabela 2). Os experimentos foram realizados em triplicata e o gene da gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH) usado como normalizador. O método  $\Delta\Delta CT$  foi utilizado para calcular as quantidades de mRNA relativas para cada amostra e o mRNA do gene LmjF06.0750 usado como calibrador.



**Figura 10 – Curvas de dissociação dos produtos amplificados por PCR em Tempo Real. A curva de dissociação foi gerada pelo programa ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) após o término da PCR. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada par de *primer* utilizado no experimento. 1- LmjF36.0750, 2- LmjF36.5500, 3- LmjF36.5510, 4-LmjF36.5520 e 5- GAPDH.**

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

5500      LPMGNETINIWTHLLGVFFFLGLMAQLFTQHIIPDYLAGNVLHNASR----- 47
5520      FALHNETLSIWTHLVGLLIVL-----VLSLHLLLN-LG---LHRIQ----- 37
5510      LGMHNETINVCSHLLTFVVFVLVT-ALLVTTVLSKAVTADSLASK----- 45
BACILLUS  QFVKEEIANAITHGTGAILSPALILIIHASKHGTAS----- 38
0750      LYFRNETFNIVSHLAMAIVLLVLLMLPFRSTAMSSGGGASEIYDGADGGYGLYTAASAG 60
          ::* . :* . . :

5500      -----
5520      -----
5510      -----
BACILLUS  -----
0750      CQCCCGGAFCEHAAGAPFRCHRSEAAEVPSWLRCLNCLAAASCATAAGTDKWDGAQQYVPS 120

5500      -----TVRSVVENARI 59
5520      -----
5510      -----
BACILLUS  -----
0750      RDEAASPRAHLSDAAGAAAASSPSFRVFASLSGDSAAPSSPANIVSGIDTALPPPRMSVA 180

5500      ANPFIIFGTFSLACVMCLCSACFHTFL-CHMSEDFYHRMGALDYGGITFLVVGSELPFC 118
5520      --DYLVSFVQLGSMVNLGSSVYHTLS-AMHSEKVRNIALAIDYFGITSMIVGSFYPPV 94
5510      ---LIYGLFCFCGLICMLNSAIYHLFN-SHCSCRVMTAMGRDFOGITALIVSSFLPPL 100
BACILLUS  --AVVAFTVYGVSMFLLYLFTLLNB---IHGPKVEKLFITLDNSAIYLLIAGTYTP-- 90
0750      ARLSLSLTSLVFSLLLTFFVLSVLYHTFMPCCRSRRGYQQLLQCDVMGVVCAISGSAYAF 240
          : . . : * * . . : : : .

5500      FYAMSCAPANRANAYLSMIGSFG-----LVGFIGDFFRHMTEKAFAMKKIIFYVGMVSGCI 173
5520      FYLFSCLTVVRAVYLISITLLG-----ILGLMGDFFTFNTQTFWPDMILYSLSLTSIGI 149
5510      YVMFNCHPVARTVYITAILLS-----TAGVIGPMTDLFNGN--VRVRLSVFLGLGFSGL 153
BACILLUS  YLLITLRGPLGWTLLAIINTLA-----IGGII---FKIFFVRRFIKASTLCYIMGHLII 142
0750      TGMPCAGEYVQGWTAALMVVATLLCITYVVVLAPMGDVVADVCALALHLVQVVAVVIAA 300
          : . . : . . : .

5500      IPTIHL----- 179
5520      LPTVNG----- 155
5510      APALNS----- 159
BACILLUS  VAIKPL----- 148
0750      VLEFLMGCLPSAPPCCPPPLQSRGRERDRQPRSPPPAHNSRQHLDPANVQQHRHLSAR 360

5500      -----SQMIPLNHSQ-PRVKGLLTMLALYGVGVFIYAFRIPEA----- 216
5520      -----FFGLDANEQTLPLYKGMFFMLATYCVGIVYIFKVPER----- 193
5510      -----LAILPQNAASVSTLLGICLNVVLYCGVAFYVYVYQFPES----- 197
BACILLUS  -----YENLTHGFSLLLAGS-----ILYSVGAIFFLMEKLD----- 180
0750      LGDPPPTAATAVAANTGVDPVPLSALQRATVVGIVYLLNLCVYVALVYVYKSRAMOGFTQ 420
          : . * . :

5500      -----
5520      -----
5510      -----
BACILLUS  -----
0750      ATHYHNASYVNLCLGGLINAARFFEVVVFHWTRRAARHTRVAAAASAAARCAEALGRDAA 480

5500      -----
5520      -----
5510      -----
BACILLUS  -----
0750      VAEMDARGADAASSSSRGSARPLRASPGGVATELAAQAPSVLITSSPPATAPTLNDRLCV 540

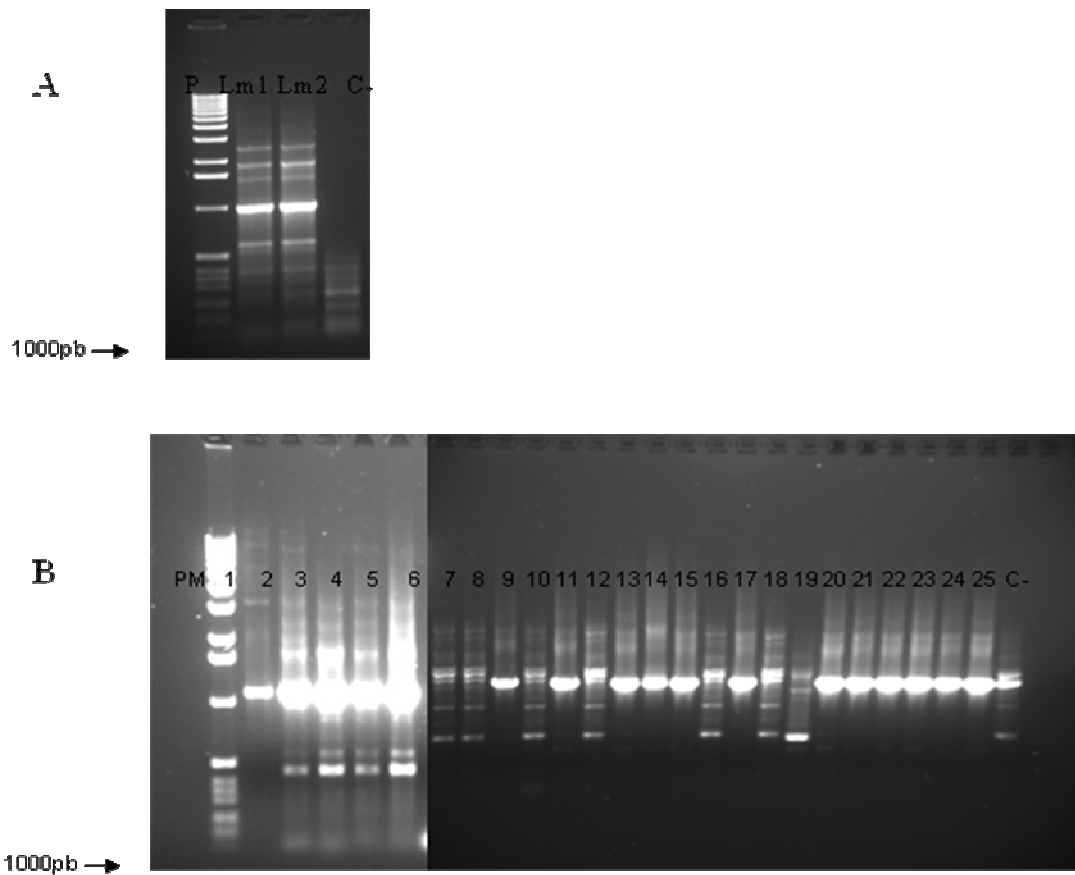
5500      -----LSPDTFDYFSSNQINHLKCVLGAATHF 244
5520      -----HYDGRFDVNLNSHQLNHFFVLCAAVVHY 221
5510      -----RYPGRFDONLSHQLNHFFVSMALVHY 225
BACILLUS  -----FNKAHWHLFVLGSSAMNF 198
0750      PKLNVTVVVSASTLDYIGNSHNINRVCTALSALSAI 576
          . * : * * . . : |

```

Figura 11: Alinhamento do domínio de hemolisina III dos genes de *L. major* e *B. cereus*:

O domínio característico de hemolisina III dos 4 genes estudados de *L. major*, juntamente com o domínio de hemolisina III de *B. cereus*, foram alinhados pelo programa ClustalwX. \*==identidade; •==similaridade; := ?

sequências dependendo do grau de homologia com a sequência de hemolisina III de *B. cereus*, foi o seguinte: para LmjF36.5500: 20, LmjF36.5510: 17, LmjF36.5520: 20 e LmjF06.0750: 15. A sequência LmjF36.5520 foi uma que apresentou o melhor *score* neste alinhamento e a que possui o menor *E-value* (**Tabela 3**). O *E-value* é frequentemente utilizado como uma boa evidência inicial de que a sequência de interesse e a sequência do banco de dados estão relacionadas, o que nos levou a escolher a sequência LmjF36.5520 para iniciar os experimentos de clonagem e expressão de proteína recombinante. Iniciadores específicos (P5520fow e P5520rev) (**tabela 2**) que amplificam a sequência correspondente à região codificadora deste gene foram desenhados e a sequência foi amplificada a partir do DNA genômico de *L.major* por PCR. A **Figura 12A** mostra o resultado da amplificação de duas reações de PCR onde foi obtido um fragmento mais abundante de aproximadamente 1000pb, como esperado para o fragmento de 1014pb. Este fragmento foi purificado do gel de agarose e clonado no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen), conforme instruções do fabricante, em bactérias *E. coli* XL1 blue. Verificamos a orientação do inserto presente nos clones obtidos por PCR de colônia utilizando os *primers* P5520Fow e M13Rev (*primer* reverso que se anela no vetor). Desta maneira, um fragmento de aproximadamente 1000pb seria amplificado se o inserto estivesse sido clonado na posição invertida. Como mostra a **Figura 12B**, a maior parte dos insertos possuíam cerca de 1000pb, indicando que foram clonados na posição invertida. Sequenciamos alguns clones que supostamente estavam na posição correta para saber se a sequência estava completa. O clone 18, que apresentou maior grau de homologia com a sequência depositada no banco de dados, possuía uma deleção de Timina na posição 234, o que acarretava a mudança da janela de leitura do gene. Outros clones (invertidos ou não) também foram sequenciados. Entretanto, nenhum deles possuía total identidade com gene LmjF365520. Assim, fizemos uma nova PCR utilizando o SuperMix High Fidelity (Gibco) que possui uma DNA polimerase com atividade corretora 3'→5'. O fragmento obtido de aproximadamente 1000pb (**Figura 13A**) foi também purificado do gel de agarose e clonado no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen). Neste experimento foram obtidos apenas 8 clones. O DNA plasmidiano destes clones foi extraído por mini-prep e a inserção e orientação do fragmento da PCR foram confirmadas por digestão com a enzima de restrição *KpnI*. Esta enzima liberaria um fragmento de 900pb se o inserto estivesse inserido



**Figura 12:** Amplificação por PCR do gene LmjF36.5520 de *Leishmania major* e análise da orientação dos insertos clonados: A região codificadora do gene LmjF36.5520 foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico de *L. major* utilizando 1µl (Lm1) e 2µl de DNA (Lm2) e os iniciadores específicos para a sequência (P5520fow= ATGAACGAC GCACTAACCCAGC e P5520rev= TTACGCGCACTCACCGCCCA). O controle negativo (C-) possuía todos os reagentes da reação, exceto o DNA (A). Em B, resultado da PCR de colônia para verificar a orientação dos insertos nos clones obtidos. Utilizou-se os *primers* P5520Fow (*primer forward* específico para a sequência e M13rev (*primer reverso* que se anela no vetor). PM= padrão de peso molecular. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

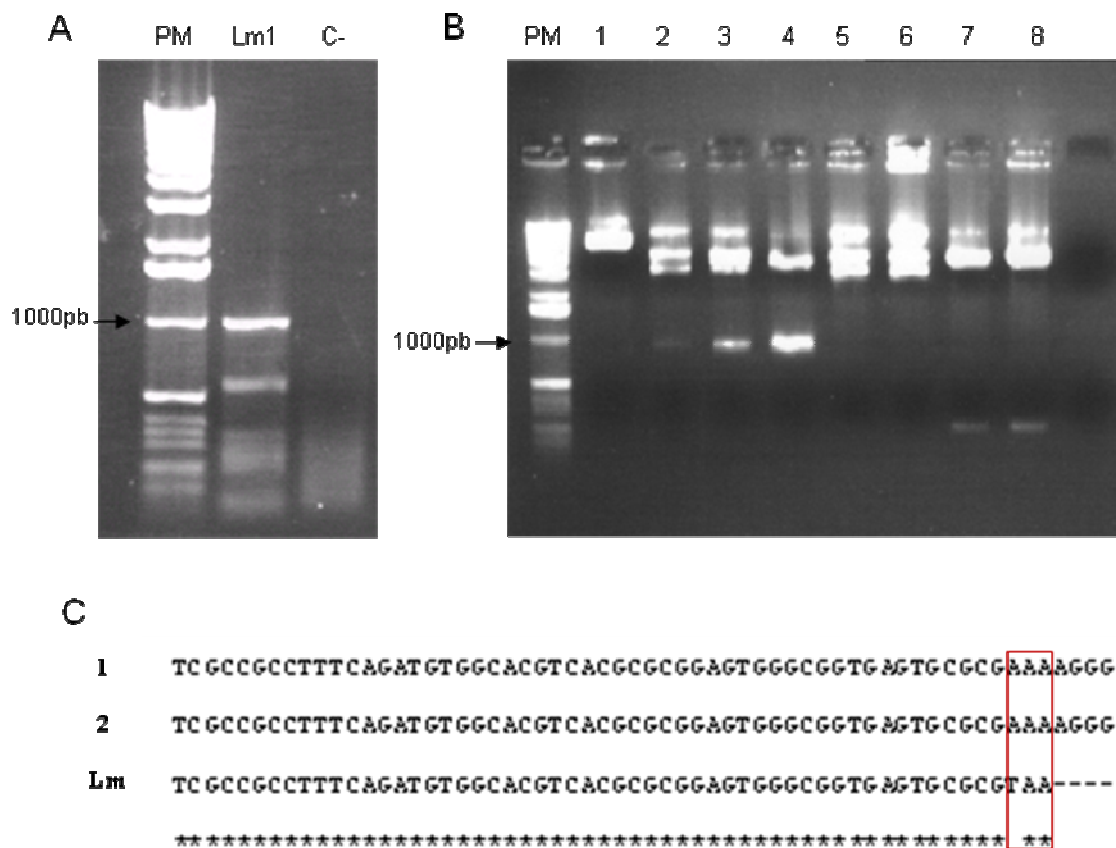
na orientação correta no vetor e um fragmento de 180pb se estivesse invertido. O perfil das digestões está mostrado na **Figura 13B**, indicando que os clones 2, 3 e 4 estavam inseridos na orientação correta, enquanto os clones 7 e 8 na orientação invertida. Os clones 1, 5 e 6 parecem não ter sido digeridos. Os clones 2, 3, 4, 7 e 8 foram sequenciados para verificação das sequências clonadas, sendo que várias deleções de nucleotídeos foram observadas no clone 4. Os clones 3, 7 e 8 apresentaram a sequência completa e o clone 2 possuía uma mutação no códon de terminação (**Figura 13C**).

## **6. Clonagem no vetor de expressão pGEX 4T1**

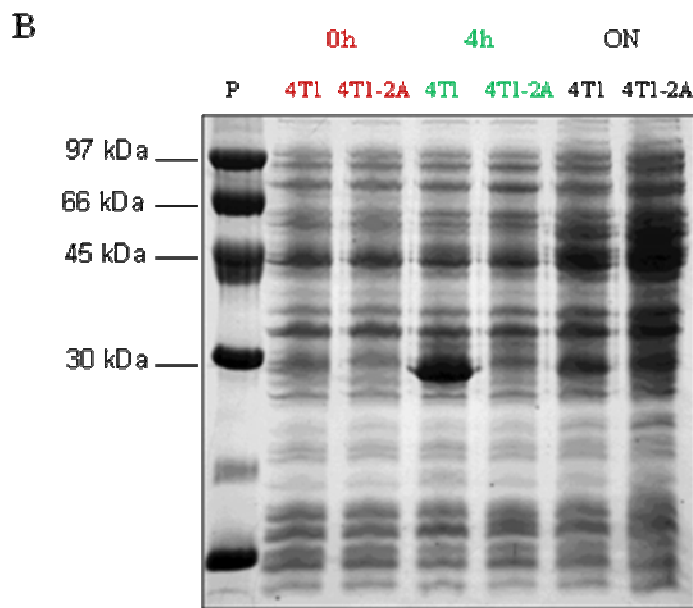
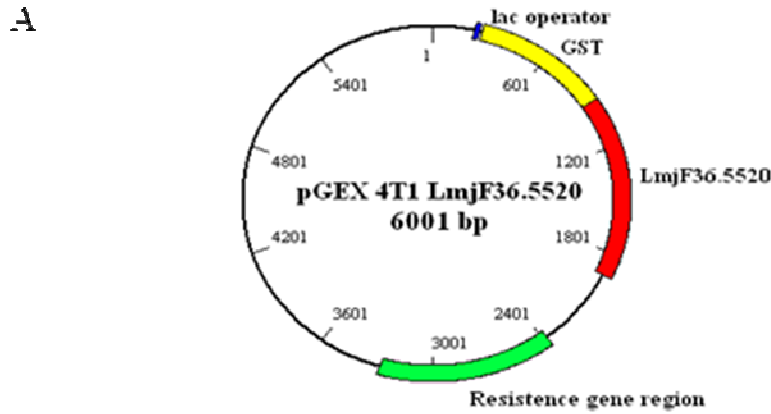
Os clones em 2, 3, 7 e 8 foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI*, que retira o inserto completo do vetor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>, e, em seguida, os insertos foram clonados no vetor de expressão pGEX 4T1 (Glutathione S-Transferase gene fusion vector - GE Healthcare) digerido com a mesma enzima (**Figura 14A**). Neste sistema, o gene de interesse seria clonado em fusão com a GST (Glutathione S-transferase) na porção N-terminal da proteína, o que facilitaria a sua posterior purificação. A orientação dos insertos foi novamente verificada por digestão dos DNA plasmídicos e, dos clones obtidos, passamos a utilizar apenas o clone 2A, pois foi o único que estava na orientação correta (dado não mostrado). A mutação ocorrida no códon de terminação deste clone não impediria a expressão da proteína, pois existe um códon de terminação localizado no vetor logo após o sítio múltiplo de clonagem que ficaria em fusão com a proteína.

## **7. Tentativas de indução da expressão da proteína recombinante no vetor pGEX 4T1**

O clone 2A, que possui a região codificadora do gene LmjF36.5520 clonada no vetor de expressão pGEX 4T1, foi utilizado para expressão da proteína recombinante induzida por IPTG. Amostras da cultura de bactérias foram coletadas nos tempos de 0, 4 e 16 horas de indução. Utilizamos o vetor pGEX 4T1 sem inserto como controle positivo do experimento, pois desta forma haveria a expressão apenas da GST, que possui peso molecular de 27kDa. Era esperada uma banda de aproximadamente 66kDa correspondente à proteína codificada pelo gene LmjF36.5520 (peso molecular de 39 kDa) em fusão com a GST. Este experimento foi repetido algumas vezes e, como mostrado na **Figura 14B**, não



**Figura 13:** Amplificação por PCR do gene LmjF36.5520 de *Leishmania major* utilizando DNA polimerase com atividade corretora e análise da orientação dos insertos clonados: A- A região codificadora do gene LmjF36.5520 foi amplificada a partir de 1µl (Lm1) de DNA genômico de *L. major* em uma reação de PCR utilizando o SuperMix High Fidelity (Gibco) e *primers* específicos para o gene alvo ((P5520fow= ATGAACGAC GCACTAACCAGC e P5520rev= TTACGCGCACTCACCGCCCA). O controle negativo (C-) possuía todos os reagentes da PCR, exceto o DNA genômico. B- DNA plasmidiano dos 8 clones obtidos foi digerido com a enzima de restrição *Kpn*I. C- Resultado do sequenciamento da porção C terminal do clone 2, indicando, em vermelho, a mutação no códon de terminação. Lm: sequência do gene LmjF36.5520 do banco de dados; 1 e 2: sequências obtidas. PM= Peso Molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.



**Figura 14: Indução da expressão da proteína recombinante codificada pelo gene LmjF36.5520 de *Leishmania major*:** A- Figura esquemática da construção obtida: vetor pGEX 4T1 portando o gene LmjF36.5520 em fusão com a GST na porção N-terminal. A figura mostra ainda o gene de resistência à ampicilina. B- SDS-PAGE das amostras colhidas nos tempos 0 (0h), 4 (4h) e 16 horas de indução com 1mM de IPTG. 4T1 = vetor vazio. 4T1-2A = vetor portando o gene da LmjF36.5520. PM= Padrão de peso molecular *Benchmark* (Invitrogen). Coloração com azul de Coomassie.



foi possível detectar banda, na região de peso molecular esperado, que evidenciasse a expressão da proteína recombinante. Entretanto, houve expressão apenas da GST no controle positivo.

#### **8. Atividade hemolítica do extrato da bactéria transformada com o plasmídeo pGEX 4T1 portando o gene da LmjF36.5520**

Bactérias transformadas com o plasmídeo pGEX 4T1, portando a região codificadora do gene LmjF36.5520 de *L. major* (clone 2A), coletadas nos tempos 0, 4 e 24 horas de indução da expressão da proteína recombinante com IPTG 1mM, foram utilizadas para obtenção de extrato protéico e realização de ensaio hemolítico. Mesmo não sendo possível detectar a expressão da proteína recombinante em SDS-PAGE corado com azul de Coomassie, decidimos avaliar a atividade hemolítica presente no extrato de proteínas do clone 2A. *Pellets* destas bactérias foram ressuspendidos em 100µl de tampão borato, submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento e então centrifugados. O material precipitado e os sobrenadantes resultantes desta centrifugação foram utilizados em um ensaio hemolítico. Como controles negativos foram utilizadas tanto a bactéria transformada com o plasmídeo vazio quanto a bactéria não transformada. A **Figura 15** mostra os gráficos representativos deste experimento. Verificamos que a atividade hemolítica contida no material precipitado obtido após rompimento e centrifugação das bactérias transformadas com o vetor contendo o gene de interesse foi semelhante a encontrada no mesmo material obtido das bactérias utilizadas como controle negativo, em todos os tempos de indução analisados. O sobrenadante obtido após rompimento e centrifugação das bactérias transformadas com o plasmídeo recombinante, com o plasmídeo vazio e não transformadas não apresentou nenhuma atividade hemolítica (dado não mostrado).

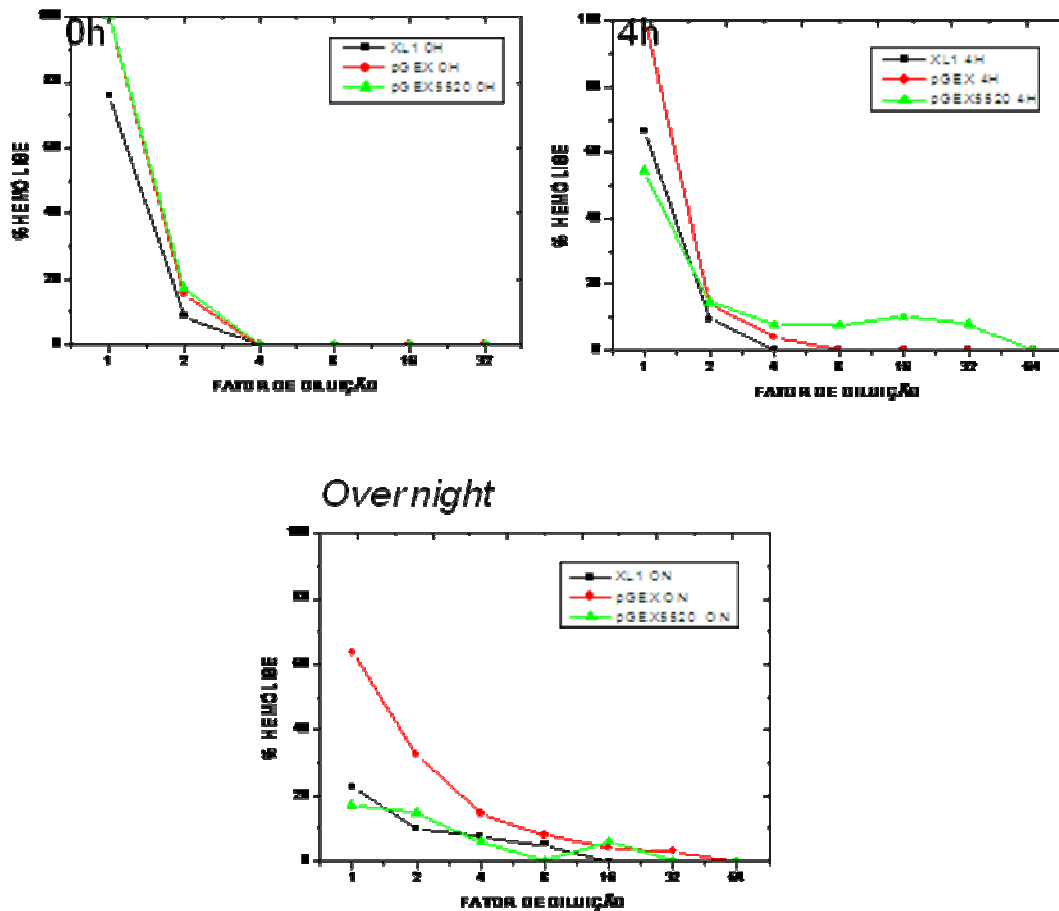


Figura 15: Atividade hemolítica do extrato protéico de bactérias transformadas com o plasmídeo pGEX 4T1 portando o gene da LmjF36.5520 de *Leishmania major*. Os *pellets* de bactérias coletadas nos tempos 0h, 4h e overnight (ON) de indução da expressão da proteína recombinante por IPTG foram ressuspensos em 100µl de tampão borato, submetidos a 3 ciclos de congelamento e descongelamento e então centrifugados. Após esta centrifugação, 100µl do material precipitado, ressuspensado também em tampão borato, foram utilizados em um ensaio hemolítico. Como controles negativos foram utilizadas bactérias portando o vetor vazio (pGEX) e bactérias não transformadas (XL1).

## 9. Clonagem dos genes anotados como hemolisina III de *Leishmania major* no vetor de expressão regulada pBAD gIII:

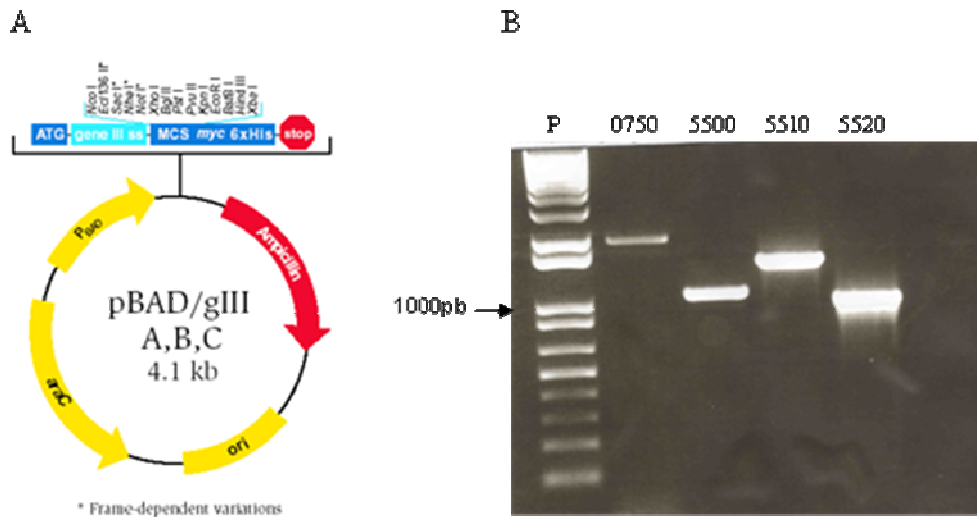
As dificuldades de obter uma sequência isenta de mutações e de expressar a proteína recombinante nos levou a pensar na possibilidade de esta proteína ser tóxica para *E. coli*, o que já havia sido salientado por Baida e Kuzmin (1995) no trabalho com a hemolisina III de *Bacillus cereus*. Decidimos, então, utilizar um vetor próprio para expressão de proteínas tóxicas, o pBAD gIII (Invitrogen) que possui um gene sinal que secreta a proteína recombinante para o espaço periplasmático (**Figura 16A**). Além disso, o vetor permite forte regulação da expressão da proteína, pela indução dose-dependente de arabinose, sua produção em grandes quantidades, detecção e purificação simplificadas devido à fusão da proteína com uma cauda de histidinas. Assim, desenhamos iniciadores específicos para as 4 sequências anotadas como hemolisinas III presentes na lista de Pfam de *L. major* para cloná-las nesse vetor (**Tabela 2**). Os iniciadores possuem adaptadores com os sítios das enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI* e mais 3 nucleotídeos para ancoragem das enzimas. Desenhamos também iniciadores para amplificação da sequência correspondente a GFP, com estes mesmos sítios de restrição, para ser utilizada controle positivo da clonagem e da indução da expressão da proteína recombinante (**Tabela 2**).

As 4 sequências foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *L. major* (**Figura 16B**) utilizando o SuperMix High Fidelity (Gibco). As regiões codificadoras completas, que correspondem à sequência amplificada dos genes LmjF36.0750, LmjF36.5500, LmjF36.5510 e LmjF36.5520, possuem, respectivamente, 2000 pb, 1092 pb, 1524 pb e 1014 pb. A sequência amplificada de GFP, que também corresponde à região codificadora do gene, foi obtida a partir de um vetor construído em nosso laboratório denominado pROCKdualluc (DaRocha *et al.*, 2004) (dado não mostrado). Os produtos de PCR foram purificados de gel de agarose, digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *XbaI* e ligados ao vetor pBADgIII B previamente digerido com as mesmas enzimas. A bactéria LMG194 (kit pBAD gIII - Invitrogen), indicada para clonagem de proteínas tóxicas, foi utilizada para transformação por eletroporação das 5 construções obtidas e, em seguida, os clones foram selecionados em placas contendo o antibiótico ampicilina. Analisamos os clones obtidos por PCR de colônia utilizando *primers* específicos para cada sequência. Obtivemos 5 clones positivos portando a sequência amplificada do gene LmjF36.5500 (**Figura 17A**), nenhum clone positivo

correspondente às outras 3 sequências (dado não mostrado) e vários clones positivos para GFP (dado não mostrado). Para confirmar a clonagem da sequência de LmjF36.5500 e de GFP, DNA plasmidiano foi extraído por mini-prep e submetido a uma digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem. A **Figura 17B** mostra o resultado desta digestão. Dos dois clones contendo a sequência de GFP foi liberado um fragmento de aproximadamente 700pb, como esperado, e dos clones contendo o gene LmjF36.5500 não foi liberado nenhum fragmento. Uma PCR utilizando o DNA do plasmídeo contendo a sequência LmjF36.5500 como molde para amplificação e *primers* específicos para esta sequência foi realizada para confirmar a inserção do gene. O resultado desta PCR está mostrado na **Figura 17C**. Um fragmento do tamanho esperado foi amplificado nos 5 clones analisados. Como controle positivo, utilizamos o DNA genômico de *L.major* e, como controle negativo, o vetor vazio como molde para a PCR. Desta forma mostramos que a sequência foi inserida no vetor. Entretanto, em uma posição não esperada.

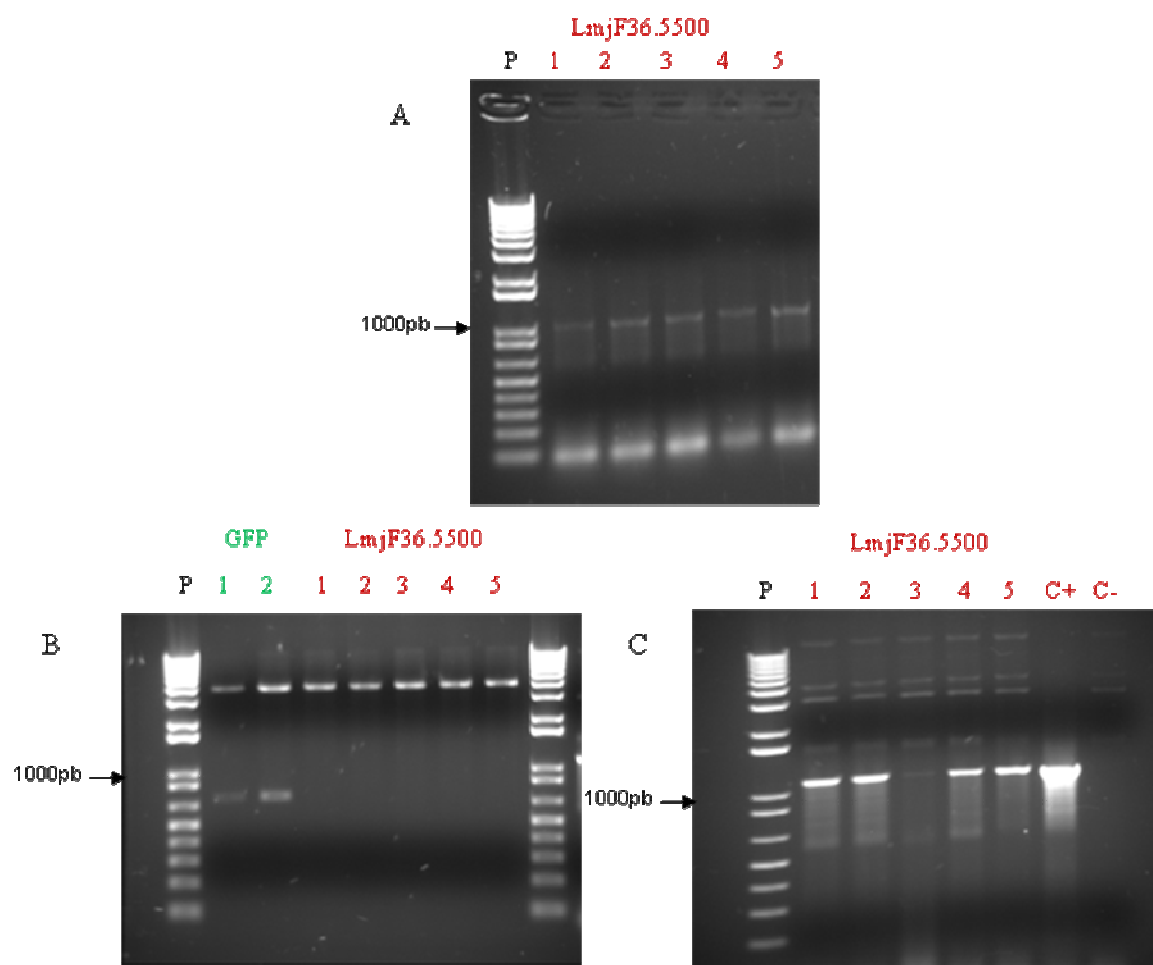
#### **10. Indução da expressão da proteína recombinante LmjF36.5500:**

Mesmo não conhecendo a posição onde foram inseridas as sequências de LmjF36.5500 no pBADgIII, culturas de bactérias transformadas com esta construção tiveram a expressão da proteína recombinante induzida com 0,2% de arabinose ao alcançar a OD<sub>600</sub> 0,5. Como controle positivo, utilizamos a construção contendo a sequência de GFP inserida no plasmídeo pBADgIII. Amostras foram coletadas antes da adição de arabinose (0h) e após 4 horas de indução (4h), mantendo-se sempre o mesmo número de células, de acordo com a densidade óptica das amostras colhidas no tempo 0h. As amostras foram centrifugadas, os *pellets* de bactéria ressuspensos em tampão de amostra 1x e fervidos por 5 min. Em um gel SDS-PAGE 12,5%, posteriormente corado por azul de Coomassie, foram aplicados 10µl desta suspensão. A **Figura 18** mostra o resultado da indução onde foi possível visualizar a banda de 27kDa correspondente à proteína GFP induzida nos dois clones testados. Porém, não foi possível visualizar uma banda, na região do peso molecular esperado, correspondente à proteína codificada por LmjF36.5500, que possui 41kDa em fusão com o epitopo myc e a cauda de histidinas (aproximadamente 2kDa). Como controle negativo, utilizamos bactérias transformadas com o vetor pBADgIII sem nenhum inserto.

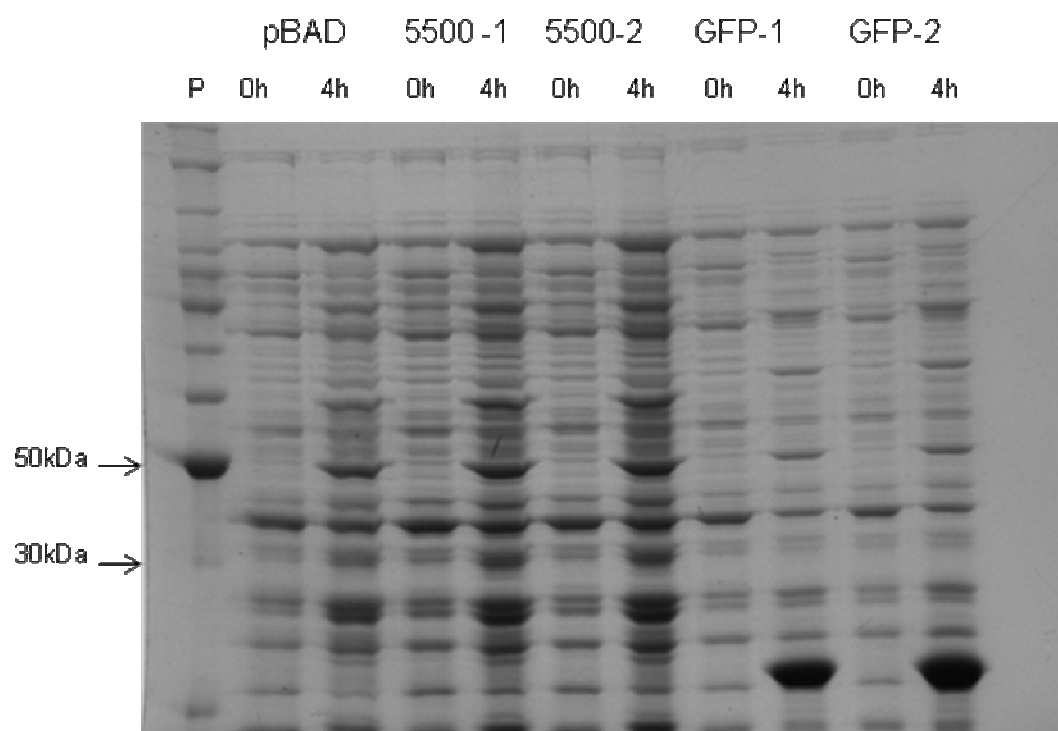


**Figura 16:** Amplificação das sequências anotadas como hemolisina III de *Leishmania major* para clonagem no vetor pBAD:gIII:

A- Mapa do vetor de expressão pBAD/gIII (Invitrogen), construído para a expressão regulada de proteínas tóxicas em *E. coli*. O gene sinal III envia a proteína recombinante para o espaço periplasmático e a cauda de histidina facilita a detecção e a purificação da proteína recombinante. B- Os produtos da amplificação por PCR das sequências anotadas como hemolisina III de *L. major* foram separados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Os fragmentos amplificados dos genes LmjF36.0750, LmjF36.5500, LmjF36.5510 e LmjF36.5520 possuem, respectivamente, 2000pb, 1092pb, 1524pb e 1014pb. PM= Peso Molecular 1Kb Plus DNA ladder (Invitrogen).



**Figura 1<sup>o</sup>:** Confirmação da clonagem da sequência LmjF36.5500 de *Leishmania major* no plasmídeo pBADgIII: A- PCR de colônia de 5 clones de pBADgIII B contendo a sequência do gene LmjF36.5500 utilizando os *primers* 5500pBAD reverso e 5500pBAD direto. B- Digestão dos plasmídeos pBADgIII B contendo GFP (2 clones: GFP 1 e 2) e a sequência LmjF36.5500 (5 clones: 1, 2, 3, 4 e 5) com as enzimas *Xho*I e *Xba*I. C- PCR utilizando DNA dos plasmídeos contendo a sequência LmjF36.5500 como DNA molde para amplificação. (C+) PCR a partir de DNA genômico de *L. major*. (C-) PCR utilizando DNA do plasmídeo vazio. Géis de agarose 1%, corado com Brometo de etídeo. PM= Peso Molecular 1Kb Plus DNA *ladder* (Invitrogen).

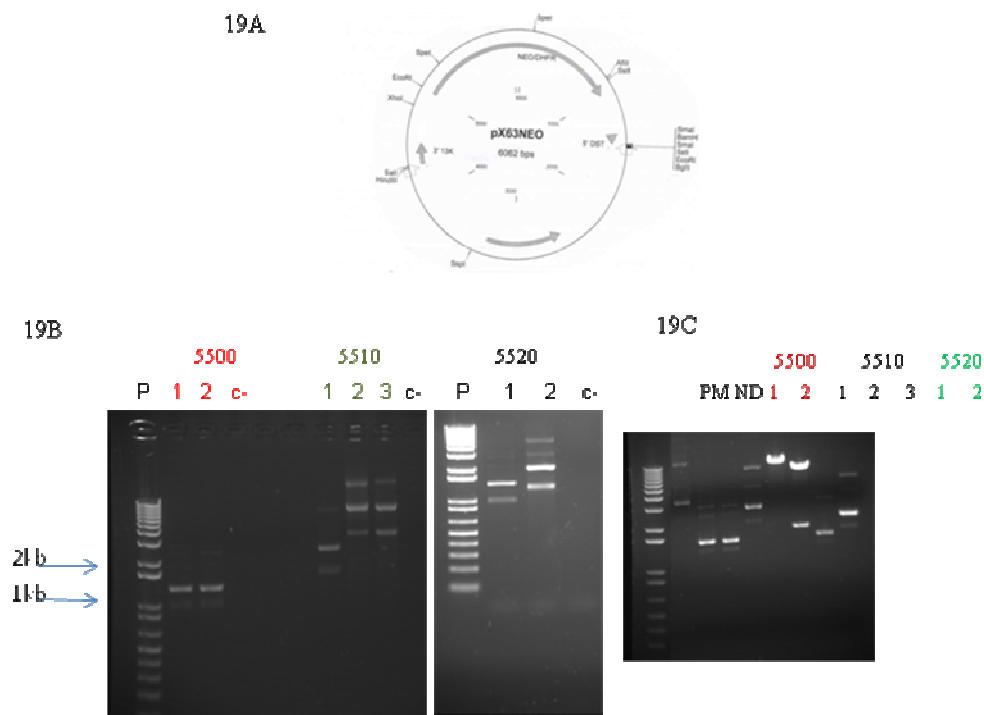


**Figura 18: Indução da expressão da proteína codificada por LmjF36.5500 de *Leishmania major*.** As proteínas recombinantes tiveram sua expressão induzida com 0,2% de arabinose quando as culturas de bactérias transformadas alcançaram a OD<sub>600</sub> 0,5. Amostras foram coletadas antes da adição de arabinose (0h) e após 4 horas de indução (4h), mantendo-se sempre o mesmo número de células. As amostras foram centrifugadas, os *pellets* de bactéria ressuspensos diretamente em 100µl de tampão de amostra 1x e fervidos por 5 min, e 10µl desta suspensão foram aplicados em SDS-PAGE 12,5%, posteriormente corado por azul de Coomassie. pBAD = controle negativo (vetor pBADgIII vazio), GFP 1 e 2 = indução da expressão de GFP inserida no vetor pBADgIII. 5500 1 e 2 = indução da expressão da proteína recombinante codificada pelo gene LmjF36.5500 inserido no vetor pBADgIII. PM= Padrão de peso molecular *Benchmark* (Invitrogen).

## 11. Clonagem das sequências das supostas hemolisinas III de *Leishmania major* no vetor de expressão pX63NEO:

Também foi nosso objetivo tentar superexpressar as proteínas codificadas pelas sequências das supostas hemolisinas III de *L. major* em promastigotas, uma vez que não obtivemos sucesso com a expressão em sistemas procariotos. Para isso foram desenhados iniciadores específicos utilizados para amplificação por PCR das quatro sequências de hemolisinas III, com adaptadores para as enzimas *Bam*HI e *Bgl*III. Com os fragmentos obtidos foi realizada uma tentativa de inserção dos mesmos no vetor pX63NEO (**Figura 19A**) (Lebowitz *et al.*, 1990) este vetor foi construído para expressão em *Leishmania* utilizando a região que do gene da diidrofolato redutase de *L. major*. Esta região contém todos os elementos gênicos normalmente necessários para a expressão e replicação. O vetor pode ser introduzido de forma estável em promastigotas de *Leishmania* com alta eficiência, pois possui o gene de resistência a G418. Uma PCR utilizando o DNA dos plasmídeos contendo as sequências LmjF36.5500, LmjF36.5510 e LmjF36.5520 como molde para amplificação e *primers* específicos para estas sequências foi realizada para confirmar a inserção dos genes (**Figura 19B**). Entretanto, a PCR produziu fragmentos de tamanhos não esperados nos clones obtidos. Como controle negativo, utilizamos o vetor vazio como molde para a reação de PCR. Além disso, realizamos uma digestão do DNA plasmidiano com as mesmas enzimas utilizadas na clonagem (*Bgl*III e *Bam*HI) (**Figura 19C**) e, mais uma vez, fragmentos de tamanhos não esperados foram liberados. Assim, não conseguimos ainda confirmar a clonagem dos insertos mencionados. Não obtivemos clones da sequência LmjF06.0750.





**Figura 19: Confirmação da clonagem das sequências LmjF36.5500, LmjF36.5510 e LmjF36.5520 no vetor pX63NEO.** 19A – mapa de restrição do plasmídeo pX63NEO, 19B– PCR dos plasmídeos contendo os genes LmjF36.5500 (1000pb), LmjF36.5510 (1500pb) e LmjF36.5520 (1000pb) utilizando *primers* específicos para cada sequência. 19C- digestão do plasmídeo contendo os genes LmjF36.5500 (1000pb), LmjF36.5510 (1500pb) e LmjF36.5520 (1000pb) com as enzimas *BglII* e *BamHI*. Gel de agarose 1%, corado com Brometo de etídeo. Peso Molecular 1kb *ladder* (invitrogen). ). C- → PCR com o plasmídeo vazio. ND= plasmídeo não-digerido.

## **DISCUSSÃO:**

Proteínas formadoras de poros (PFPs) já foram descritas em vários microrganismos patogênicos, incluindo protozoários, sendo que várias delas já foram implicadas na patogênese das doenças causadas pelos mesmos (Horta, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2002; Ishino *et al.*, 2005; Kafsack *et al.*, 2009,(**Tabela 1**).

A caracterização da leishporina como uma PFP de *L. amazonensis* nos leva a indagar sobre a função desta citolisina, tanto no ciclo de vida do parasita quanto na patogênese da leishmaniose. O fato de a leishporina ter atividade lítica ótima em pH 5,5 e a 37°C (Noronha *et al.*, 1996; Noronha *et al.*, 2000), condições encontradas dentro do fagolisossomo sugere que ela possa agir dentro desta organela e fez o nosso grupo propor o seu envolvimento com o rompimento do fagolisossomo, como já demonstrado para *Listeria monocytogenes* (Bielecki *et al.*, 1990), *Shigella flexneri* (Hybiske, 2008) e sugerido para *T. cruzi* (Andrews *et al.* 1990) e, posteriormente, do macrófago infectado pelo parasita (Horta, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2002), como já demonstrado para a *Legionella pneumophila* (Alli *et al.*, 2000). Assim, é objetivo do nosso grupo investigar a(s) função(ões) da leishporina, tarefa que depende da caracterização molecular do seu gene.

Trabalhos simultâneos realizados em nosso laboratório tentam purificar e identificar a proteína que co-purifica com a atividade hemolítica de extratos de promastigotas. Para isto, duas abordagens têm sido utilizadas. Uma delas baseia-se no fato de a leishporina se ligar diretamente a fosfolípides (Castro-Gomes *et al.*, 2009). Neste sentido, nosso grupo tem utilizado lipossomos compostos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) na tentativa de remover seletivamente a citolisina de extratos de promastigotas de *L. amazonensis*. Já foram identificadas quatro proteínas de extrato rico em membranas de promastigotas que se ligam a lipossomos, a saber, gp63,  $\beta$ -tubulina, GAPDH, GP46 e uma proteína de 80kDa ainda não identificada (resultados não publicados). A segunda abordagem é a purificação por cromatografia líquida da proteína citolítica. Trabalhos anteriores levaram à purificação de uma proteína de 50-60 kDa que co-purificava com a atividade hemolítica do extrato de promastigotas (Noronha, 1996). No entanto, na época, pelo baixo rendimento, não foi possível identificar a proteína e estudar a sua função no

parasita. No momento, nosso grupo está tentando alterar as condições de purificação para melhorar o rendimento, sendo que, atualmente, os recursos para a identificação molecular são mais sensíveis. Nesse sentido, já foi possível reproduzir os resultados anteriores e a proteína mencionada acima está em fase de identificação por espectrometria de massa (resultados não publicados).

Neste trabalho, utilizamos duas outras abordagens para tentar identificar esta proteína. Uma delas consistiu no *screening* funcional de uma biblioteca de cDNAs de amastigotas de *L. amazonensis* na tentativa de identificar clones com fenótipo hemolítico e a outra na busca no genoma de *L. major* de genes que codificassem proteínas potencialmente hemolíticas.

Com relação à primeira abordagem, não obtivemos clones hemolíticos pelo *screening* funcional. A biblioteca (cedida pelas Dras. Clara Barbieri e Márcia Regina Machado dos Santos), que possuía insertos de cDNAs com um tamanho médio de 1,3 Kb, foi plaqueada em placas contendo ágar-sangue. A técnica de plaquear biblioteca de expressão em ágar-sangue já havia sido utilizada na identificação da hemolisina III de *Bacillus cereus* (Baida e Kuzmin, 1995). Por esta técnica, bactérias transformadas com vetores de expressão com as sequências desejadas são plaqueadas em meio contendo ágar-sangue e os clones capazes de induzir a formação de um halo de hemólise que, portanto, indicariam o fenótipo desejado, seriam selecionados. Entretanto, ao utilizar esta mesma técnica, não obtivemos formação de halos hemolíticos (**Figura 3**), embora tenhamos plaqueado quase 120.000 clones, o que cobre mais de 3 vezes o genoma de 32.8 Mb de *L. major*. Concluimos posteriormente que, após a amplificação da biblioteca, uma vez que esta se encontrava com o título muito baixo, a mesma deve ter perdido a sua representatividade. Sendo assim, cDNAs correspondentes a mRNAs que codificam proteínas hemolíticas poderiam não estar sendo representados na biblioteca amplificada.

Ainda nesta linha de buscar genes que codificam proteínas hemolíticas de *L. amazonensis*, resolvemos construir uma biblioteca de cDNAs de promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*, fase onde se encontra o pico de atividade hemolítica (Almeida-Campos, 2001). Fragmentos correspondentes a sequências de mRNAs foram obtidos por RT-PCR utilizando como iniciadores da reação parte da sequência de *Spliced*

*leader* de *L. major* e Oligo d(T) (**Figura 4**). Nosso próximo objetivo é inserir estes fragmentos já purificados em vetores de expressão regulada e iniciar um novo *screening*.

A segunda abordagem utilizada neste trabalho valeu-se do fato de o genoma da *L. major* ter sido completamente sequenciado (Ivens *et al.*, 2005). O projeto genoma da *L. major* revelou a sequência de 36 cromossomos do genoma haplóide do parasita com aproximadamente 32.8 megabases. Foram preditos 8272 genes codificadores de proteínas, 911 genes de RNA e 39 pseudogenes (Ivens *et al.*, 2005). Uma busca na lista de Pfam do banco de dados GeneDB por genes que pudessem codificar proteínas citolíticas, resultou na identificação de 4 sequências anotadas como supostas hemolisinas do tipo III, pela presença de um domínio característico de proteínas pertencentes a esta família, denominado PF03006. Esta anotação é baseada no grau de homologia destas sequências com a sequência de hemolisina III de *B. cereus*, onde este tipo de hemolisina foi primeiramente descrito. Foi demonstrado por Kuzmin e colaboradores (1996) que a hemolisina do tipo II de *B. cereus* é uma PFP, podendo romper membranas de eritrócitos e de outras células eucarióticas. O poro formado tem um diâmetro de 3 a 3,5nm e a hemólise ocorre em pelo menos 3 etapas: ligação dos monômeros na membrana do eritrócito, formação do poro oligomérico transmembrana e lise do eritrócito (Baida e Kuzmi, 1996). Vários subtipos de hemolisinas já foram caracterizadas como a cereolisina AB, hemolisinas I, II e III, hemolisina BL e outras, sendo consideradas fatores de virulência para este patógeno (Baida e Kuzmin, 1995). Ressaltamos, contudo, que uma vez que estas proteínas foram anotadas automaticamente, com base em similaridade de sequência, estas podem não apresentar a mesma função desempenhada pelas proteínas da família a qual pertencem. Alguns genes de *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, possuem o domínio PF03006 e codificam uma proteína que tem um papel no metabolismo de lipídeos (Karpichev *et al.*, 2002). Assim, embora cientes que o produto gênico codificado por estas sequências poderia não apresentar função de hemólise, esta era uma abordagem que não poderia ser desconsiderada.

As 4 sequências de *L. major* anotadas como supostas hemolisinas III possuem a região codificadora completa e foram analisadas sob diversos aspectos (Tabela 3): número de cópias no genoma, presença de peptídeo sinal e âncora GPI, presença de hélices transmembrana, tamanho e posição do domínio que caracteriza o Pfam PF03006, dentre outros. A presença de hélices transmembrana é um indício de que são proteínas que

interagem com a bicamada lipídica, uma característica das proteínas formadoras de poro.

A busca por ortólogos destas sequências nos outros tripanossomatídeos sequenciados revelou dados interessantes (Figura 7). O gene LmjF36.5520 possui ortólogos em todos os tripanossomatídeos analisados, enquanto a sequência LmjF36.5500 é exclusiva de *L. major*. Em *L. brasiliensis* parece ter ocorrido um evento de duplicação gênica, uma vez que este parasita apresenta duas cópias do gene LmjF36.5520. Os genes LmjF36.5500, LmjF36.5510 e LmjF36.5520 estão arrançados em tandem no cromossomo 36, enquanto a sequência LmjF06.0750 está no cromossomo 6.

Após confirmarmos que extratos de da fração rica em membranas de promastigotas de *L. major* possuem, como a *L. amazonensis*, atividade hemolítica (**Figura 5**), iniciamos a caracterização destas sequências avaliando se as mesmas pertenceriam a mRNAs expressos no parasita. O resultado obtido foi importante pois mostramos que as 4 sequências de *L. major* anotadas como hemolisina III faziam parte de mRNAs transcritos em promastigotas em fase estacionária (**Figura 8**), que também é o pico de expressão da atividade da leishporina. Portanto, mostramos que estas sequências correspondem a genes expressos em *L. major*. Mostramos também, por PCR em Tempo Real, que o gene LmjF36.5520 é o mais expresso dentre os quatro estudados e que o LmjF36.0750 é o menos expresso (**Figura 9**). Pretendemos ainda analisar a cinética de expressão dessas sequências para verificar se há alguma correlação com a cinética de expressão da atividade hemolítica em promastigotas.

O gene LmjF36.5520 foi o escolhido para iniciarmos os experimentos de clonagem e expressão de proteína recombinante. Esta escolha baseou-se no alinhamento dos domínios característicos do Pfam PF03006 de cada uma das 4 sequências anotadas como hemolisina III de *L. major* com a sequência da hemolisina III de *B. cereus* (**Figura 11**), protótipo desta família de proteínas e no E-value (**Tabela 3**), que indica a proximidade das sequências comparadas. Além disso, um BLASTp no banco de dados de *L. major* utilizando a sequência codificadora do gene de *B. cereus* como *query*, revelou que a sequência LmjF36.5520 apresenta 25% de identidade e 45% de similaridade com a sequência da hemolisina III de *B. cereus* (dados não mostrados). Recentemente, Chen et al. (2004) clonaram e expressaram o gene que codifica uma hemolisina III de *Vibrio vulnificus*, uma bactéria marinha altamente virulenta, agente causador de septicemia fatal em várias partes do mundo. Este organismo possui o gene que codifica a hemolisina do

tipo III com 48% de identidade com a hemolisina do tipo III de *Bacillus cereus*. A hemolisina de *V. vulnificus* é considerada o fator de virulência deste patógeno, uma vez que organismos *knockout* são considerados não patogênicos com relação ao tipo selvagem quando administrados em camundongos. Os autores mostraram que extratos de bactérias que expressam a proteína recombinante apresentam atividade hemolítica semelhante aos extratos de *B. cereus*.

Baseando-se neste e em outros exemplos de clonagem de genes que codificam hemolisinas, amplificamos a região codificadora do gene LmjF36.5520, e inserimos primeiramente em no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup>. Os 25 clones analisados ou possuíam mutações que alteravam a janela de leitura do gene, ou os produtos da PCR haviam sido inseridos na posição invertida. Era possível que essa frequência tivesse sido alta uma vez que a Taq DNA polimerase utilizada na PCR não possuía atividade corretora 3'→5, o que nos fez utilizar uma enzima com atividade corretora 3'→5 para amplificação desta sequência (**Figura 13**). Com a nova enzima, apenas 8 clones foram obtidos, e destes, 4 possuíam a sequência completa de LmjF36.5520, sem mutações, estando duas inseridas na posição invertida. A partir deste resultado, começamos a pensar na hipótese de a proteína recombinante ser nociva para a bactéria, uma vez que a maioria dos clones obtidos ou possuíam alguma mutação, ou o inserto na posição invertida. Esta suposição foi reforçada pelo fato de que o número de clones obtidos foi significativamente menor quando utilizamos a DNA polimerase com atividade corretora na reação de PCR, considerando que o mesmo lote de bactérias competentes foi utilizado na clonagem anterior.

Para facilitar a detecção e purificação da proteína recombinante, os quatro clones de bactérias que possuíam a sequência completa de LmjF36.5520 inserida no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> tiveram seus insertos extraídos e reclonados no vetor de expressão pGEX 4T1, em fusão com GST. No entanto, apenas um dos clones obtidos apresentou a sequência na orientação correta. Mesmo assim, este clone possuía uma deleção no códon de terminação, indicando mais uma vez a instabilidade desses genes em bactérias. Esse fato, no entanto, não atrapalharia a expressão da proteína recombinante uma vez que existe um códon de terminação no vetor, logo após o sítio múltiplo de clonagem.

Condizente com a hipótese de a proteína recombinante ser nociva para a bactéria, os experimentos de indução da expressão da proteína codificada pelo gene LmjF36.5520 não tiveram sucesso, uma vez que não foi possível evidenciar uma banda de peso

molecular esperado correspondente a expressão desta proteína (**Figura 13**). Verificamos que esta era uma dificuldade específica do gene em questão, pois no controle positivo, onde um clone que expressa apenas GST foi utilizado, uma banda correspondente a GST estava bastante evidente. (**Figura 13b**). Além disso, não obtivemos êxito através da tentativa de evidenciar a expressão da proteína recombinante em ensaio de *Western Blot*, utilizando anticorpo anti-GST, devido ao aparecimento de várias bandas inespecíficas (resultado não mostrado).

Uma vez que uma quantidade mínima da proteína recombinante poderia ter sido expressa, mas não detectada em um gel de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie, realizamos um ensaio hemolítico utilizando *pellet* e sobrenadante do extrato de bactérias transformadas com o vetor pGEX 4T1 portando o gene LmjF36.5520. A atividade lítica do extrato das bactérias utilizadas como controles negativos foi semelhante a obtida com o clone recombinante. Este resultado indica que a proteína recombinante realmente não foi expressa.

Esses resultados corroboraram nossa hipótese de que esta proteína poderia ser tóxica para *E. coli*, o que impediria sua expressão. Baida e Kuzmin (1995), em seu trabalho com a hemolisina III de *B. cereus*, já haviam salientado a dificuldade de trabalhar com proteínas hemolíticas devido a sua toxicidade. Sendo assim, passamos a utilizar um vetor próprio para expressão de proteínas tóxicas, o pBAD gIII (Invitrogen) que possui um promotor regulado pelo operón ara, que permite a expressão regulada da proteína recombinante, e um gene sinal que direciona para a secreção da proteína recombinante para o espaço periplasmático. A expressão funciona sob o controle do promotor araBAD, derivado do operón ara. O operón ara codifica três enzimas necessárias para o metabolismo da arabinose: *araA* (arabinose isomerase) *araB* (ribulokinase) e *araD* (Ribulose-5-phosphate epimerase). Estes três genes estruturais estão arranjados em um operón que é positivamente ou negativamente regulado pelo produto de gene *araC*, que forma um complexo com a L-arabinose. Na ausência de arabinose o dímero *araC* inibe a transcrição formando um grampo que impede a transcrição dos três genes estruturais. Quando a arabinose está presente, ela se liga ao dímero *araC*, desfaz o grampo e permite o início da transcrição.

Nesta etapa do trabalho, decidimos iniciar a caracterização dos 4 putativos genes de *L. major* anotados como hemolisinas do tipo III, clonando a região codificadora dos mesmos no vetor pBAD gIII para verificar a expressão e a atividade das proteínas recombinantes. Não obtivemos sucesso com a clonagem e a expressão dos 4 genes de *L. major* no vetor pBADgIII. Por outro lado, conseguimos clonar e expressar a proteína GFP utilizando este mesmo vetor (**Figuras 17 e 18**). Esta seria mais uma evidência da toxicidade destas proteínas para a bactéria hospedeira.

Na tentativa obter parasitas com expressão aumentada destas proteínas para que fosse possível a caracterização funcional das mesmas, utilizamos o vetor pX63NEO (LeBowitzz, 1990), desenvolvido pelo grupo do Dr. Stephen Beverley para expressão de genes em *Leishmania* cedidos para teste pela Dra. Angela Cruz. Com isto seria possível realizar parte da caracterização funcional destas proteínas por ensaios hemolíticos comparando a porcentagem de hemólise do extrato do parasita superexpressando as proteínas com a do extrato de parasitas selvagens. Esta também foi uma tentativa que não resultou em resultados positivos (**Figura 19**). Neste momento, estamos trabalhando na busca de alternativas que possam solucionar este problema. Uma das opções seria a expressão *in vitro* destes genes utilizando o EasyXpress Protein Synthesis Kit (Qiagen), que possui um sistema de acoplamento da transcrição-tradução permitindo a expressão de proteínas a partir de um plasmídeo contendo o gene de interesse ou de um DNA linear como o produto de PCR, ou ainda a utilização de um sistema de expressão em levedura. Após a expressão destas sequências, elas poderão ser analisadas quanto à sua atividade citolítica e de formação de poros. Além disso, as sequências que possuem ortólogos em *L. brasiliensis* poderão ser silenciadas pela técnica de RNAi para análise do fenótipo do parasita, uma vez que a maquinaria de RNAi está presente neste tripanossomatídeo (Peacock et al., 2008).

Além disso, outras abordagens têm sido trabalhadas concomitantemente em nosso laboratório na tentativa de identificar a leishporina. Dois exemplos atuais de técnicas utilizadas para a identificação de PFPs em parasitas são a descoberta das proteínas Spect 2 de *Plasmodium* (Ishino, 2005) e a TgPLP1 de *Toxoplasma gondii* (Kafsack, 2009). A proteína Spect2 de *Plasmodium* foi descoberta através de análises de homologia de um banco de EST de *Plasmodium* com outras PFPs já caracterizadas. Ela possui 15% de identidade e 21% de similaridade com o complexo de ataque a membranas (MACPF) Pfam



01823 e 56,7% de similaridade com o componente do complemento humano C9. Esta molécula está presente em micronemas, organelas envolvidas na invasão da célula hospedeira e os parasitas nocautes para esta proteína são incapazes de sair dos capilares sinusóides e invadir os hepatócitos. A proteína TgPLP1 de *Toxoplasma gondii* possui domínios importantes em sua sequência como a assinatura característica de algumas PFPs: (Y/W)-X6-(F/Y)GTH(F/Y)-X6-GG, além de um alto nível de similaridade com as MACPF, não só de sequência como de estrutura, o que foi obtido através de modelagem estrutural da TgPLP1 e sua comparação com a estrutura das MACPF. Parasitas nocautes para TgPLP1 não conseguem escapar do vacúolo parasitóforo, resultando na morte do parasita e na diminuição de quase 5 vezes da magnitude da infecção.

Tendo em vista as abordagens atualmente utilizadas para a identificação de PFPs em outros parasitas, nosso grupo está produzindo um banco de dados com PFPs funcionalmente caracterizadas para investigar homologia com genes de *L. major* e identificar possíveis candidatos à leishporina. Como perspectivas desta parte do trabalho, os genes candidatos poderão ser nocauteados para análise do fenótipo do parasita, ensaios de infecção *in vivo* e *in vitro* e ainda localização das proteínas no parasita através da produção de anticorpos contra as mesmas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; NORONHA, F. S. M.; HORTA, M. F. Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 111, p.363-375, 2000.

ALMEIDA-CAMPOS, F. R.; NORONHA, F. S. M.; HORTA, M. F. The multitalented pore-forming proteins of intracellular pathogens: Review. **Microbes And Infection**, v. 4, p.741-750, 2002.

AMINO, R.; MARTINS, R. M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I. Y.; JULIANO, M. A.; SCHENKMAN, S. Trialysin, a novel pore-forming proteins from saliva of hematophogous insects activated by limited proteolysis. **The Journal of biological Chemistry**. Vol. 277, No. 8, P. 6207-6213, 2002.

ANDREEVA-KOVALEVSKAYA, Zh. I.; SOLONIN, A.S.; SINEVA1, E. V.; TERNOVSKY, V. I. Pore-Forming Proteins and Adaptation of Living Organisms to Environmental Conditions. **Biochemistry**, v. 73, n. 13, p.1473-1492, 2008.

ANDREWS, N. W. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**. Aug, Vol. 71(2) P. 241-4, 1990.

BAIDA, G. E.; KUZMIN, N. P. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from Bacillus. **Biochimica Et Biophysica Acta**, n.1264 , p.151-154, 06 jul. 1995.

BAIDA, G. E.; KUZMIN, N. P. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, n. 1284, p.122-124, 14 ago. 1996.

BIELECKI J.; YOUNGMAN P.; CONNELLY P.; PORTNOY D.A. Bacillus subtilis expressing a haemolysin gene from Listeria monocytogenes can grow in mammalian cells. **Nature**. May 10; 345(6271):175-6, 1990.

- CASTRO-GOMES, T., ALMEIDA-CAMPOS, F.R., CALZAVARA-SILVA C.E., SILVA R.A., FRÉZARD F., HORTA, M.F. Membrane binding requirements for the cytolytic activity of *Leishmania amazonensis* leishporin. **FEBS Letters**. (2009).
- CHEN, Yu-chung; CHANG, Ming-chung; CHUANG Yin-ching; JEANG Chii-ling. Characterization and Virulence of Hemolysin III from *Vibrio vulnificus*. **Current Microbiology**, v. 49, p. 175-179, 2004.
- DAROCHA, WD, et. al. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 2, p. 113-120, 2004.
- DE ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. Vol 98(7), P. 861-870, 2003.
- GENTIL, L. G.; LASAKOSVITSCH, F.; SILVEIRA J.F.; SANTOS, M.R.M.; BARBIÈRI, C.L. Analysis and chromosomal mapping of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote expressed sequence tags. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 5, p.707-711, 2007.
- GRIMALDI Jr., G. & TESH, R.B. Leishmaniasis of the world current concepts and implications for future research. **Clinical and Microbiology**. Vol. 6, P. 230-250, 1993.
- HERBST, R.; MARCIANO-CABRAL, F.; LEIPPE, M. Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. **J. Biol. Chem.** Vol. 279(25), P. 25955-25958, 2004.
- HORTA, M. F. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites: Review. **Trends In Microbiology**, v. 5, n. 9, p.363-366, 1997.
- HYBISKE, K.; STEPHENS, R.S. Exit strategies of intracellular pathogens. **Nature Review. Microbiol.** V. 6, p. 99–110, 2008.
- ISHINO, T., CHINZEI, Y.; YUDA, M. A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 2, p.199-208, 2005.

- IVENS AC, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*.
- KADOTA, K., et al. Essential role of membrane-attack protein in malarial transmission to mosquito host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 46, p.16310-16315, 16 nov. 2004.
- KAFSACK, B.F.C., et al. Rapid Membrane Disruption by a Perforin-Like Protein Facilitates Parasite Exit from Host Cells. **Science**, v. 323, n. , p.530-533, 2009.
- KAISER, K., et al. A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 133, p.15-26, 25 ago. 2003.
- KARPICHEV, et al. Multiple regulatory roles of a novel *Saccharomyces cerevisiae* protein, encoded by YOL002c, in lipid and phosphate metabolism. **The journal of Biological Chemistry**. v. 277(22):19609-17. 2002.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (eds.) *The leishmaniasis in biology and medicine-biology and epidemiology*. **London Academic Press**. Vol 1, chap.1, P. 1-120, 1987.
- LEBOWITZT, J. H., et al. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Usa, v. 87, n. , p.9736-9740, dez. 1990.
- LEIPPE M.; EBEL S.; SCHOENBERGER O.L.; HORSTMANN R.D.; MULLER-EBERHARD H.J. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of national academy os sciencies U S A**. Vol. 88(17), P. 7659-63, 1991.
- LEIPPE, M. Amoebapores. **Parasitology Todday**. Vol. 13, No. 5, 1997.
- LUDWIG, A. Cytolytic toxins from gram-negative bacteria. **Microbiologia**. Vol. 12(2), P. 281-96, 1996.
- LUNDBERG, U.; VINATZER, U.; BERDNIK, D.; VON GABAIN, A.; BACCARINI, M. Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. **J Bacteriol**. Vol. 181(11), P. 3433-7, 1999.

MANNING-CELA, R., et al. LYT1 Protein Is Required for Efficient In Vitro Infection by *Trypanosoma cruzi*. **Infection And Immunity**, v. 69, n. 6, p.3916-3923, 2001.

NORONHA, F. S. M. Identificação, caracterização e purificação de uma proteína formadora de poros de *Leishmania amazonensis*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 1996.

NORONHA, F. S. M., et al. Macrophage Damage by *Leishmania amazonensis* Cytolysin: Evidence of Pore Formation on Cell Membrane. **Infection And Immunity**, v. 68, n. 8, p.4578-4584, ago. 2000.

NORONHA, F. S. M.; RAMALHO-PINTO, F. J.; HORTA, M. F. Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Vol. 27 P. 477-482, 1994.

NORONHA, F. S. M.; RAMALHO-PINTO, F. J.; HORTA, M. F.. Cytolytic Activity in the Genus *Leishmania*: Involvement of a Putative Pore-Forming Protein. **Infection And Immunity**, v. 64, n. 10, p.3975-3982, out. 1996.

ORTIZ-GOMEZ, A., et al. Farnesyl Diphosphate Synthase Is a Cytosolic Enzyme in *Leishmania major* Promastigotes and Its Overexpression Confers Resistance to Risedronate. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 7, p.1057-1064, jul. 2006.

PEACOCK, C. S., et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39(7) p. 839–847, 2008.

ROIKO, M. S.; CARRUTHERS, V. B. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 10, p.1444-1452, 2009.  
**Science**. V. 309(5733), p. 436-42, 2005

SINEVA, E. V., et al. Expression of *Bacillus cereus* hemolysinII in *Bacillus subtilis* renders the bacteria pathogenic for the crustacean *Daphnia magna*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 299, p.110-119, 2009.

UECHI, G., et al. Molecular cloning and functional expression of hemolysin from the sea anemone *Actinaria villosa*. **Protein Expression And Purification**, n. 40, p.379-384, 23 dez. 2004.

YOUNG, J. D. -E.; YOUNG, T.M.; LU, L. P.; UNKELESS, J. C.; COHN, Z. A. Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*. **The Journal of Experimental Medicine**, Vol. 156(6), P. 1677-90, 1982

YULDASHEVA, L. N.; CARVALHO, E. B.; CATANHO M.-T.J.A.; KRASILNIKOV, O. V. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Vol. 38, P. 1061-1070, 2005.