

Caibe Alves Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DE METALOPROTEASES GP63 DE
*Trypanosoma rangeli***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Hermes Stoco

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Pereira, Caibe Alves
CARACTERIZAÇÃO DE METALOPROTEASES GP63 DE
Trypanosoma rangeli / Caibe Alves Pereira ;
orientadora, Patrícia Hermes Stoco, 2019.
83 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

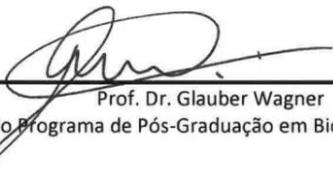
1. Biotecnologia e Biociências. 2. Trypanosoma
rangeli. 3. GP63. I. Stoco, Patrícia Hermes. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.
Título.

"Caracterização de metaloproteases GP63 de *Trypanosoma rangeli*"

Por

Caibe Alves Pereira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (018/2019/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof. Dr. Glauber Wagner

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dra. Patricia Hermes Stoco (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dr. Guilherme Razzera Maciel (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Ricardo Ruiz Mazzon (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 28 de maio de 2019.

Dedico este trabalho a todos
aqueles que ainda tentam e
tentarão fazer ciência no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente agradecer aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram a seguir a carreira científica, em especial aos meus tios Zé e Lourdes que logo cedo me acolheram em sua casa e sempre me incentivaram a estudar.

Gostaria também de agradecer à minha orientadora Patrícia, que me ensinou demais nesses dois anos, tanto cientificamente (muito pacientemente) quanto na vida. Nossas conversas sempre me foram muito esclarecedoras. Te admiro demais!!

Gostaria também de agradecer a todos os professores que me auxiliaram nesse período, prof Edmundo, prof Mário, prof Glauber, prof Gui Toledo e prof Gui Razzera, aprendi muito com vocês, tanto pelos ensinamentos didáticos quanto pelas ideias de rumos a seguir.

Agradeço imensamente à minha namorada Bruna, que sem ela eu provavelmente nem teria vindo para Floripa. Muito obrigado por todo esse tempo juntos e por ter me feito aproveitar demais dessa cidade maravilhosa. Te amo muito!!

Não posso deixar de agradecer aos meus bioinformatas favoritos, que sempre contribuíram muito para os melhores momentos tanto na UFSC quanto fora dela, em especial ao Gui que entrou comigo e tava sempre ali pro que desse e viesse, além é claro da Taty, que possui a risada mais massa dessa cidade!!

Ao pessoal do Lab, que me ensinaram demais, tanto os velhos quantos os novos. Todos os meus experimentos tiveram o apoio deles. Muito obrigado a Mi, que apesar das broncas me ensinou demais como tratar os parasitos com o carinho que eles merecem. A Carime, a Adri, ao Abadio, a Vanessa e a Bibi, que sempre me socorreram nas dúvidas e nos experimentos, me ensinaram demais, tanto no lab quanto fora dele.

Aos novinhos me encham de perguntas e sempre estão prontos a responder as minhas, Ana, Iasmin, Joao, Bia e Gabi. Aprendi muito com vocês também e muito obrigado por todos os géis, PCRs e tudo mais. Assim como as ics seniors, Nati e Thaís, que sempre me perguntam um monte de coisa e estão sempre dispostas aquela PCRzinha marota. E a Lary que sempre estava ali pra me ajudar com algo, fizemos um monte de experimento juntos, e sempre topava aquele role topzera. Tu me apresentou a vida na USFC fora do lab e a um monte de gente daora!! Muito obrigado a todos vocês que sempre deixaram os dias no lab sensoriais e me fizeram pensar muito além do que eu conseguiria sozinho!!

Agradeço também aos meus Squad da UNI, que apesar de longe estão presentes na minha vida ainda, um mais perto, Gabrizera, outras mais longes, Rafa, Dan e Vitin. Vocês são demais e creio que logo mais vamos nos reunir e dale muito nos PES da vida!!

Claro que também agradeço ao meus brods de Londrina, que estão sempre presentes quando para la eu volto. Gabs, Hugo, Marcos, vocês tao ai comigo desde sempre e espero que por muito tempo ainda!! Ao Jones e a Nath que trouxeram Londrina pra por um tempo e sempre nos acompanharam nas noites

Gostaria de agradecer a Banca que aceito avaliar este trabalho, tenho certeza que vocês contribuiram muito para que ele fique o melhor que pode!!

Agradeço ao CNPq, CAPES e UFSC pelo apoio financeiro e estrutural.

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram e eu não citei, de forma direta ou indireta, sem todos vocês este trabalho e a minha experiencia não teriam sido como foi!! Meu muito obrigado!!

A vida não cabe no Lattes.
Autor desconhecido.

RESUMO

Trypanosoma rangeli é um parasito da família Trypanosomatidae, e tem como hospedeiros diferentes espécies de mamíferos e triatomíneos em comum com o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. Esses parasitos possuem grande semelhança gênica e proteica, o que pode dificultar o diagnóstico da Doença de Chagas e gerar resultados falso-positivos. Entre as proteínas com alta similaridade compartilhadas entre esses parasitos está a GP63, uma metaloprotease pertencente ao grupo das metzincinas encontrada predominantemente na superfície dos parasitos. A GP63 de *T. rangeli* pode ser classificada em três grupos, que possuem diferenças principalmente na região do sítio catalítico, sugerindo diferenças na atividade desta enzima. Para melhor entender essas diferenças o objetivo deste trabalho foi caracterizar os diferentes grupos de GP63 de *T. rangeli*. Para isto foi realizada uma busca dos membros de GP63 no genoma de *T. rangeli*, por três diferentes abordagens, encontrando-se 131 sequências completas, sendo 109 de GP63_1, 18 de GP63_2 e 4 de GP63_3. Realizando uma análise filogenética das sequências observou-se que os membros de GP63_2 são agrupados em um mesmo clado, bem como para GP63_3. De modo esperado, a análise de conservação dos resíduos de aminoácidos relacionados ao motivo mostrou que os membros da GP63_1 são mais divergentes. Foi realizada a predição da localização celular e observou-se que 30 destas provavelmente possuem endereçamento para localização na superfície do parasito. A análise do transcrito de *T. rangeli* mostrou que membros de GP63 possuem transcrição diferencial, dependendo da forma evolutiva em que o parasito se encontra. Além disso, os três diferentes grupos de GP63 foram encontradas no secretoma de formas de cultura de epi e tripomastigotas de *T. rangeli*. Foi realizado também a modelagem tridimensional de um membro de cada grupo, observando que as diferenças no motivo podem resultar em diferenças na atividade catalítica destas proteínas. Por fim, foram realizadas clonagens em vetor de expressão e transfecção de parasitos para melhor entender a função dos diferentes grupos de GP63 de *Trypanosoma rangeli*.

Palavras chave: Modelagem estrutural. Metzincinas.

ABSTRACT

Trypanosoma rangeli is a parasite that belongs to the Trypanosomatidae family. Its hosts are different species of mammals and triatomines in common with *Trypanosoma cruzi*, etiological agent of Chagas Disease. These parasites share high genic and protein resemblance and it can complicate the Chagas Disease diagnostic with false-positives results. Among the high similar protein, it is the GP63, a metalloprotease that belongs to the metzincin group, found mainly in the parasites surface. The *T. rangeli* GP63 can be classified into three groups, which have differences mainly on the catalytic site region, suggesting different enzyme activity. In order to better understand those differences, the goal of this study was to characterize the different GP63 groups of *T. rangeli*. To reach this goal, it was performed a search for GP63 members on the *T. rangeli* genome by three different approaches, finding 131 complete sequences, in which 109 are GP63_1, 18 are GP63_2 and 4 are GP63_3. By a phylogenetic analysis of the sequences it was seen that the members of GP63_2 are grouped in the same clade, as well as the GP63_3 members. As expected, an analysis of the conserved amino acids residues related to the motif showed that the GP63_1 members are the most divergent. By the cellular localization prediction, it was observed that 30 of the proteins have a probable surface localization. The transcriptome analysis of *T. rangeli* showed that different GP63 have a differential transcription, regarding the evolution form of the parasite. Besides, the three groups were found on the secretome of culture epimastigotes and trypomastigotes of *T. rangeli*. It was done the tridimensional of one member of each group, observing that the differences on the motif can result in catalytic activity differences of these enzyme. Lastly, transfections of expression vectors cloned were done to better understand the function of the different groups of GP63 of *Trypanosoma rangeli*.

Key words: Structure modelling. Metzincins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografia das diferentes formas evolutivas de <i>Trypanosoma rangeli</i>	23
Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico de <i>Trypanosoma rangeli</i> no hospedeiro invertebrado.....	24
Figura 3. Distribuição geográfica do <i>T. cruzi</i> (doença de Chagas) e pontos de ocorrência do <i>T. rangeli</i>	25
Figura 4. Classificação das Metaloproteases mononucleares....	27
Figura 5. Mecanismo enzimático das Metaloproteases.....	28
Figura 6. Estruturas comuns a metzincinas.....	29
Figura 7. Alinhamento das sequências modelo de GP63_1, GP63_2 e GP63_3 de <i>T. rangeli</i>	42
Figura 8. Organograma das estratégias utilizadas para busca das sequências de GP63 no genoma de <i>T. rangeli</i>	43
Figura 9. Árvore filogenética das 131 sequências não redundantes de GP63 encontradas no genoma de <i>T. rangeli</i>	45
Figura 9. As probabilidades posteriores de cada nó estão mostradas. As sequências em vermelho representam o grupo de GP63_2. As sequências em verde representam o grupo de GP63_3. As demais sequências representam o grupo de GP63_1.....	45
Figura 10. Logo do motivo proteico de metaloproteases do grupo metzincinas obtido a partir das sequências não redundantes de GP63 encontradas no genoma de <i>T. rangeli</i>	46
Figura 11. Logos do motivo proteico de metaloproteases do grupo metzincinas obtido a partir do alinhamento das sequências não redundantes de cada grupo de GP63 (GP63_1, GP63_2 e GP63_3) encontradas no genoma de <i>T. rangeli</i>	47
Figura 12. Gráfico da Análise do Componente Principal do agrupamento de todos os transcritos encontrados nas diferentes bibliotecas referentes as diferentes formas biológicas de <i>T. rangeli</i>	52
Figura 13. Box plot da contagem dos transcritos dos Clusters e genes de GP63 nas diferentes formas evolutivas de <i>T. rangeli</i>	56
Figura 14. Modelagem tridimensional da representante de GP63_1 de <i>T. rangeli</i>	59
Figura 15. Modelagem tridimensional da representante de GP63_2 de <i>T. rangeli</i>	60
Figura 16. Modelagem tridimensional da representante de GP63_3 de <i>T. rangeli</i>	61
Figura 18. Representação esquemática das construções de pLEXSY_GP63_1 e pROCK_GP63_1.....	62

Figura 19. Confirmação da presença dos genes GP63_1 e GP63_2 de *T. rangeli* e verificação da expressão destas proteínas recombinantes nas culturas de *L. tarentolae* transfectadas. 63

Figura 20. Confirmação da superexpressão das GP63_1, 2 e 3 nas culturas transfectadas de *T. rangeli*. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes e clonagem nos vetores.	38
Tabela 2. Predição de peptídeo sinal, localização celular e presença de âncora de GPI nas diferentes isoformas de GP63 de <i>Trypanosoma rangeli</i>	48
Tabela 3. Sequências encontradas no secretomas das diferentes formas de cultura de <i>T. rangeli</i>	51
Tabela 4. Agrupamento das sequências de GP63 que apresentaram similaridade a um mesmo transcrito no transcrito de <i>T. rangeli</i>	52

abela 1 - Médias concentrações urbanas 2010-2011**Error! Bookmark not defined.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SIGLAS

MPs – metaloproteases
MSP – do inglês Major Surface Protein
GPI – glicosil fosfatidil inositol
kDa – kilo Daltons
CR3 – receptor de complemento 3
Sty XI – sinaptotagmina XI
IL-6 – interleucina 6
TNF – fator de necrose tumoral
HMM – do inglês Hidden Markov Models
LIT – do inglês Liver Infusion Tryptose
SBF – soro bovino fetal
BHI – do inglês Brain Heart Infusion
PCR – reação em cadeia da polimerase
LB – do inglês lysogen broth
PBS – do inglês Phosphate buffered saline
 μ - micro
n – nano
m - mili
g – grama
l – litro
cm – centímetro
min – minuto
G418 – gentamicina
SDS – dodecil sulfato de sódio
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
3D – tridimensional
Å – angstrom

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	<i>Trypanosoma rangeli</i>	23
1.2	METALOPROTEASES	26
1.3	GP63 EM TRIPANOSOMATÍDEOS	29
1.4	HIPÓTESE	32
2	OBJETIVOS	33
2.1	GERAL	33
2.2	ESPECÍFICOS	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE GP63 NO GENOMA DE <i>T. rangeli</i>	35
3.1.1	Busca das sequências	35
3.1.2	Análises das sequências	35
3.2	MODELAGEM ESTRUTURAL	36
3.3	BUSCA DAS SEQUÊNCIAS DE GP63 NO TRANSCRITOMA de <i>T. rangeli</i>	36
3.4	ANÁLISE DO SECRETOMA DE DIFERENTES FORMAS DE <i>T. rangeli</i>	37
3.5	SUPEREXPRESSÃO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE METALOPROTEASES	37
3.5.1	Cultivo de formas epimastigotas e promastigotas	37
3.5.2	Clonagem em vetor de expressão pLEXY-neo2 e pROCK	38
3.5.3	Transfecção dos vetores pLEXY_GP63 em <i>L. tarentolae</i> e pROCK_GP63 em <i>T. rangeli</i>	39
3.5.4	Western blot	40
4	RESULTADOS	41
4.1	BUSCA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	43
4.1.1	Análise filogenética	44
4.1.2	Análise do motivo de metzincinas	46

4.1.3	Predição de localização celular	48
4.2	ANÁLISE DO SECRETOMA	51
4.3	ANÁLISE DE TRANSCRITOS DE GP63	51
4.4	MODELAGEM ESTRUTURAL.....	58
4.5	EXPRESSÃO DAS GP63 DE <i>T. rangeli</i>	61
4.5.1	Clonagem dos genes de GP63 nos vetores pLEXY-neo2 e pROCK	61
4.5.2	Expressão heteróloga de GP63_1/2/3 em <i>L. tarentolae</i>	62
4.5.3	Superexpressão de GP63_1/2/3 em <i>T. rangeli</i>.....	63
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÃO.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma rangeli*

A família Trypanosomatidae, pertencente a ordem Kinetoplastida, é composta por parasitos flagelados que infectam uma grande variedade de animais e plantas (LUKES et al., 2014). Dentre estes parasitos, dois gêneros são de grande importância médica: *Trypanosoma* e *Leishmania*. Diferentes espécies do gênero *Leishmania* são responsáveis por causarem leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral ao redor do mundo. No gênero *Trypanosoma*, as espécies *Trypanosoma brucei*, e *Trypanosoma cruzi* são responsáveis por importantes doenças em seres humanos: a Tripanossomíase Africana (doença do sono) e a Tripanossomíase Americana (doença de Chagas), respectivamente (ASLETT et al., 2010; BANGS et al., 2001).

Outra espécie de interesse médico do gênero *Trypanosoma* é o *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, descrito por Tejera em 1920. Este parasito possui ciclo de vida heteroxênico e tem como hospedeiros invertebrados triatomíneos, principalmente do gênero *Rhodnius* e hospedeiros mamíferos das ordens Marsupialia, Carnivora, Edentata, Rodentia e Primata (GRISARD et al., 1999). *T. rangeli* possui duas formas evolutivas bem definidas: a forma epimastigota, proliferativa, com cerca de 45 a 56 μm encontrada nos hospedeiros invertebrados; e a forma tripomastigota, não proliferativa, apresentando de 26 a 35 μm , e encontrada nos hospedeiros vertebrados (Figura 1) (CUBA CUBA, 1998).

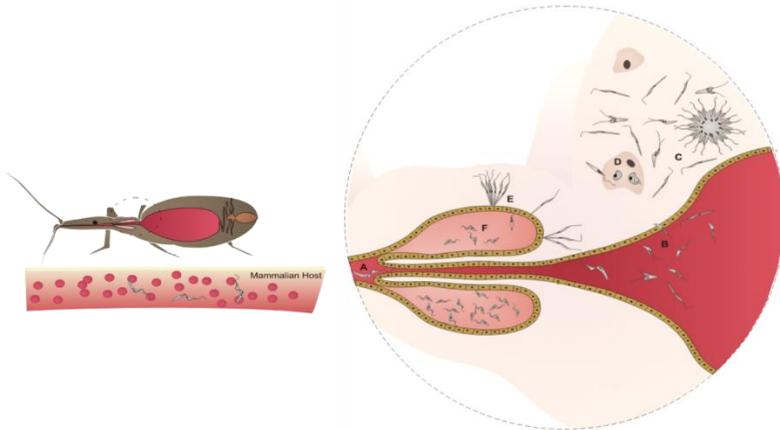
Figura 1. Microfotografia das diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma rangeli*.



(A) forma epimastigota e (B) forma tripomastigota, coradas por Giemsa. As barras em branco representam 10 μm . Fonte: LÜCKEMEYER, 2014.

O ciclo biológico do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero ainda não está completamente estabelecido. Infecções por *T. rangeli* caracterizam-se por parasitemias de curta duração e normalmente baixas, e ainda não foram descritas formas replicativas desse parasito em infecções experimentais em mamíferos, independente do modelo animal utilizado (HERBIG-SANDREUTER, 1955; D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1999; GUHL e VALLEJO, 2003). O hospedeiro invertebrado se infecta ingerindo formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo. No trato digestivo, os parasitos se diferenciam em epimastigotas e iniciam a colonização do intestino do inseto. Os parasitos se aderem ao epitélio intestinal e o transpassam, chegando a hemolinfa, onde ocorre intensa replicação. Estas formas migram para as glândulas salivares, onde diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para os mamíferos (Figura 2) (STOCO et al., 2016).

Figura 2. Representação esquemática do ciclo biológico de *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado.



A infecção do triatomíneo ocorre pela ingestão de formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo (A), sendo as formas tripomastigotas e epimastigotas predominantes no intestino anterior (B). Formas epimastigotas curtas se dividem no intestino e podem invadir a hemocele (C), onde dividem-se de forma livre como epimastigotas longos. Alguns parasitos podem invadir hemócitos (D), sendo desconhecida a capacidade de multiplicação no interior desta célula. As formas epimastigotas longas aderem e penetram na glândula salivar (E) diferenciando-se em seu interior em tripomastigotas metacíclicas (F) infectantes que são inoculados com a saliva durante o repasto sanguíneo. Fonte: STOCO et al., 2016.

Embora o *T. rangeli* possa apresentar patogenicidade nos hospedeiros invertebrados, não há registros de patogenicidade em mamíferos. Apesar disso seu interesse se dá por esse possuir hospedeiros em comum e áreas de transmissão geográfica sobrepostas com o *T. cruzi*, incluindo a América Central e do Sul (Figura 3) (D’ALESSANDRO-BACIGALUPO e GORE-SARAVIA, 1992; CUBA CUBA, 1998; GRISARD et al., 1999; GUHL e VALLEJO, 2003; VASQUEZ et al., 2004).

Figura 3. Distribuição geográfica do *T. cruzi* (doença de Chagas) e pontos de ocorrência do *T. rangeli*.



Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da doença de Chagas humana (sombreado) e dos registros de ocorrência comprovada do *T. rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (*). Fonte: GRISARD; ROMANHA; STEINDEL, 2016.

Mesmo não causando patogenicidade, a infecção por *T. rangeli* induz uma resposta humoral em mamíferos, com produção de altos títulos de anticorpos que apresentam reatividade cruzada com antígenos de *T. cruzi* e que podem acarretar diagnósticos falso-positivos para a doença de Chagas. Neste contexto, sabe-se que as formas epimastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* compartilham cerca de 60% de proteínas antigênicas solúveis. Dentre essas proteínas encontram-se membros do grupo das proteases (AFCHAIN, et al., 1979; MORAES et al., 2008; GRISARD et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; ALVAREZ, NIEMIROWICZ, CAZZULO, 2012; WAGNER et al., 2013).

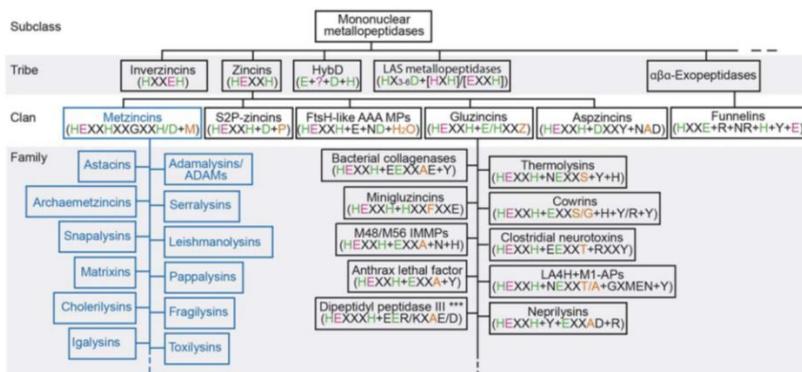
1.2 METALOPROTEASES

Proteases são proteínas que possuem como função a quebra de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos. Essa quebra pode ocorrer nas ligações entre os aminoácidos das extremidades N- ou C-terminal, classificando-as como exoproteases. Por outro lado, quando a quebra ocorre nas ligações peptídicas internas essas proteínas são denominadas endoproteases. Ademais, as endoproteases podem ser subdivididas em sete distintas categorias, baseadas em seus mecanismos de hidrólise: serinas, glutâmicas, aspárticas, cisteínas, treoninas, asparaginas e metaloproteases, sendo algumas metaloproteases classificadas como exoproteases (RAWLINGS; BARRETT, 2013).

As metaloproteases (MPs) são parte de um clã de proteases que utilizam um metal – geralmente zinco, menos comumente níquel, cobalto, cobre ou manganês – para realizar a hidrólise do substrato. Elas possuem um motivo de ligação ao metal, conservado entre as diferentes famílias, composto por duas histidinas e um ácido glutâmico (HExxH) – presentes em uma α -hélice localizada no sítio ativo das enzimas (STOCKER et al., 1995; RAWLINGS; BARRETT, 2013).

As metaloproteases podem ser divididas em duas grandes subclasses: as que utilizam somente um átomo de metal e as que utilizam mais de um. As enzimas que requerem apenas um metal são subdivididas em invertizincinas, cujo motivo se encontra invertido (HxxEH), zincinas, $\alpha\beta$ -exopeptidases, LAS (do inglês, lysostaphin, D-Ala-D-Ala carboxypeptidase and sonic hedgehog) MPs e parentes do fator de maturação de hidrogenase (HybD). As zincinas são classificadas em cinco grupos, sendo um dos mais estudados o grupo das metzincinas, cujo nome vem de uma zincina que possui uma curva de metionina (Met-turn). O motivo característico das metzincinas é estendido, composto por HExxHxxGxxH/Dx+M (Figura 4) (BODE, GOMIS-RÜTH, STÖCKLER, 1993; CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2013).

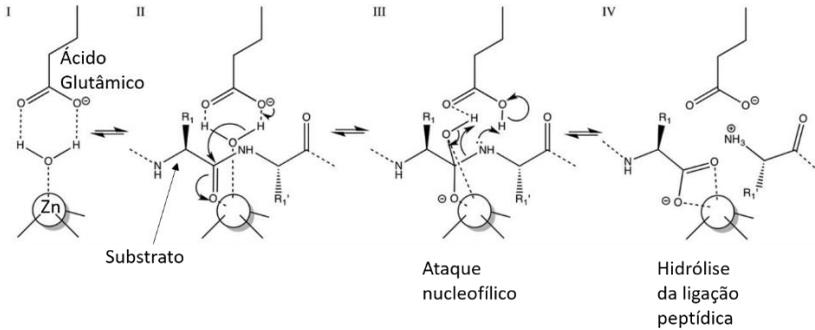
Figura 4. Classificação das Metaloproteases mononucleares.



Dentro da classe das Metaloproteases a subclasse de MPs mononucleares está dividida em tribos, atualmente caracterizadas ao nível estrutural: invertizincinas, zincinas, parentes do fator de maturação de hidrogenase (HybD), LAS MPs, e $\alpha\beta$ -exopeptidases. As tribos se subdividem em clãs e então em famílias. As metzincinas estão demonstradas em azul. Resíduos de aminoácidos que se ligam ao metal estão em verde, resíduos básicos/ácidos em rosa e resíduos/moléculas ocupando a posição da Met-turn ou Ser/Gly-turn abaixo do sítio do metal estão em laranja. Outros resíduos estão em preto. X representa qualquer aminoácido, Z = A/F/S/G/T. Fonte: Adaptado de CERDÀ-COSTA E GOMIS-RÜTH, 2013

Dos aminoácidos conservados no motivo das metzincinas, as Histidinas/Ácido Aspártico fazem a ligação com o zinco, assim como uma molécula de H_2O ligada ao Ácido Glutâmico, formando uma ligação tetraédrica com o zinco. Para ocorrer a hidrólise do substrato, é essencial que a molécula de H_2O esteja presente, pois é a partir dela que o zinco faz o ataque nucleofílico à ligação peptídica (Figura 5). A Glicina é essencial nesta posição devido ao seu tamanho, uma vez que qualquer outro aminoácido afastaria a terceira histidina de sua posição. A Metionina não faz contato com o metal, porém ela se encontra abaixo do sítio ativo, formando um “travesseiro” hidrofóbico, que se mantém conservado entre as diferentes classes de metzincinas (TALLANT, MARRERO, GOMIS-RÜTH, 2010).

Figura 5. Mecanismo enzimático das Metaloproteases.



(I) A molécula solvente (H₂O) se encontra ligada ao metal (esfera cinza) e ao ácido glutâmico no sítio ativo na ausência do substrato peptídico. Assim que o substrato é acomodado à fenda do sítio ativo (se ligando a βIV) é formado o complexo de Michaelis (II). O solvente polarizado ataca o grupo carbonil da ligação peptídica, formando a reação tetraédrica intermediária (III). Essa reação termina com a quebra da ligação peptídica, a transferência do próton ao grupo amino formando o complexo do produto (IV). Fonte: Adaptado de CERDÀ-COSTA E GOMIS-RÜTH, 2013.

As metzincinas estão presentes em todos os reinos, por exemplo, em venenos de animais peçonhentos, realizando processos essenciais para o desenvolvimento de organismos animais e vegetais, participando da degradação de parede celular em algas e podendo auxiliar na virulência de patógenos (MARINO-PUERTAS; GOULAS; GOMIS-RÜTH, 2017; NOWAK et al., 2017). Geralmente possuem duas regiões, N e C-terminal, das quais a região N-terminal é onde se encontra o motivo e possui conservação estrutural entre as diferentes enzimas, enquanto a região C-terminal é variável (CERDÀ-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2013).

A estrutura comum entre as proteínas é composta por 5 folhas β (βI a βV), sendo alinhadas de forma paralela, exceto por βIV que se posiciona de forma antiparalela, e 3 α-hélices (αA a αC), estando o motivo HExxH presente em αB. O terceiro ligante do metal se encontra em uma região de *loop*, assim como a metionina (Figura 6). Entre as diferentes estruturas existem algumas diferenças dependendo do grupo em que está inserido a enzima. No grupo das astacinas, por exemplo, uma tirosina está presente entre a terceira histidina e a metionina, fazendo uma quarta ligação ao zinco, enquanto que no grupo das leishmanolisinas (GP63), existe uma inserção de aproximadamente 63

resíduos de aminoácidos entre a glicina e a terceira histidina, assim como a folha β II é ausente (CERDA-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2013).

Figura 6. Estruturas comuns a metzincinas.

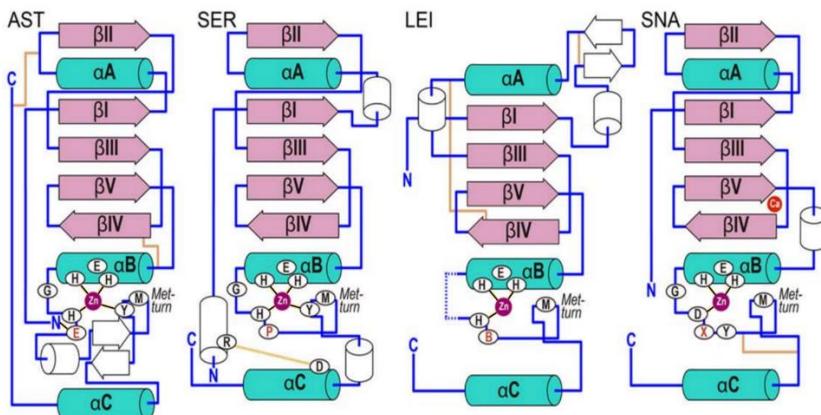


Imagem ilustrativa de 4 representantes de metzincinas em estruturas 2D: AST (astacinas), SER (serralisinas), LEI (leishmanolisinas) e SNA (snapalisinas). As setas indicam folhas β , cilindros indicam α -hélices – as regiões em comum estão coloridas de verde (α -hélices) e rosa (folhas β). Ligações dissulfeto estão em marrom, ligações ao zinco em preto. Os resíduos de aminoácidos exclusivos de cada família estão em vermelho, sendo X qualquer aminoácido e B resíduos hidrofóbicos volumosos. Fonte: Adaptado de CERDÀ-COSTA E GOMIS-RÜTH, 2013.

1.3 GP63 EM TRIPANOSOMATÍDEOS

A GP63, glicoproteína de 63 kDa, é também conhecida como Leishmanolisina ou MSP (*Major Surface Protease*). A GP63 é uma metaloprotease zinco dependente presente em membros da ordem Kinetoplastida, frequentemente ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), com massa molecular de 58-65 kDa. Essa proteína foi primeiramente descrita em *Leishmania major*, para a qual representa a maior parte das proteínas de superfície desse parasito na forma promastigota – cerca de 1% do total de proteínas (BOUVIER, ETGES, BORDIER, 1985; CHAUDHURI et al., 1989). Dependendo do estágio em que o parasito se encontra, diferentes isoformas dessa glicoproteína são expressas, auxiliando na infecção. Estão em *Leishmania* sp. diretamente envolvidas na opsonização do parasito pelo sistema complemento, evitando a sua lise, e auxiliando na defesa do parasito dentro do fagolisossomo nos macrófagos (CHAUDHURI et al., 1988; CHAUDHURI et al., 1989; SEAY, HEARD, CHAUDHURI, 1996).

Desta forma, em *Leishmania* sp. diferentes isoformas contribuem para a sobrevivência tanto das formas promastigotas quanto amastigotas, assim como também são encontradas formas de GP63 não ligadas a GPI, encontradas em vesículas extracelulares secretadas pelos parasitos (HSIAO et al., 2008; ATAYDE et al., 2016; PARASHAR; MUKHOPADHYAY, 2017).

Mais especificamente, as GP63 são expressas em promastigotas para auxiliar na sobrevivência dos parasitos no hospedeiro mamífero logo no começo da infecção. Uma vez na matriz extracelular, GP63 degrada diversos componentes da matriz, favorecendo a migração do parasito nos tecidos (MCGWIRE, CHANG, ENGMAN, 2003). GP63 auxilia na inativação do componente C3b do sistema complemento, evitando a lise mediada por complemento (BRITTINGHAM et al., 1995). O iC3b pode opsonizar o parasito, auxiliando a interação parasito-macrófago e na fagocitose, através dos receptores para complemento 3 (CR3) presentes no macrófago (MOSSER, EDELSON, 1985). Também já foi demonstrado que a GP63 interage com o receptor de fibronectina, também auxiliando na aderência do parasito ao macrófago (BRITTINGHAM et al., 1999).

Uma vez fagocitados, a GP63 auxilia os parasitos na inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo a partir da clivagem de VAMP8 (MATHEOUD et al., 2013; MATTE et al., 2016) e da degradação de Sinaptotagmina (Sty XI). Consequentemente, IL-6 e TNF tem sua liberação modulada, o que leva a um aumento no recrutamento de células inflamatórias para o local (ARANGO-DUQUE et al., 2014; RIBEIRO-GOMES et al., 2014). Além disso, a GP63 também parece também estar envolvida em alterações nucleares no macrófago, como hidrólise de fatores de transcrição, porinas nucleares e proteínas envolvidas na regulação da tradução (CONTRERAS et al., 2010; ISNARD et al., 2015).

A proteína GP63 também é encontrada em outras espécies de tripanosomatídeos. Apesar de não infectarem mamíferos, tripanosomatídeos que infectam plantas como *Phytomonas* sp., e ainda espécies monoxênicas que desenvolvem-se somente em insetos como *Leptomonas* sp., *Herpetomonas* sp., *Angomonas* e *Crithidia*, também expressam GP63 em suas superfícies, o que sugere uma ação dessa protease na defesa do parasito contra o sistema imune do hospedeiro invertebrado, visto que a GP63 também consegue hidrolisar peptídeos antimicrobianos produzidos por insetos (SANTOS, BRANQUINHA e D'ÁVILA-LEVY, 2006).

Para os tripanosomas de importância médica, como *T. brucei*, a GP63 é predominantemente expressa quando o parasito se encontra na corrente sanguínea do hospedeiro (EL-SAYED, DONELSON, 1997) e sua atividade está relacionada ao desprendimento das glicoproteínas variáveis de superfície (LACOUNT et al., 2003; GRANDGENETT, et al., 2007), o que auxilia na sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero.

Em *T. cruzi*, a GP63 auxilia na internalização do parasito em macrófagos e mioblastos de mamíferos e possui expressão das isoformas de maneira diferenciada em formas epimastigotas e tripomastigotas (CUEVAS; CAZZULO; SÁNCHEZ, 2003; KULKARN et al., 2009). Llewellyn e colaboradores (2015) mostraram que as diferentes substituições nucleotídicas no gene TcGP63-1 pode ter relação com pacientes portadores da Doença de Chagas adquirida de forma congênita.

Em *T. cruzi* são observados até quatro grupos de genes para GP63 (TcGP63-1, TcGP63-2, TcGP63-3 e TcGP63-4), todos em grande número de cópias gênicas. Nas proteínas codificadas por esses grupos, ambos os resíduos de histidina e ácido glutâmico estão conservados no motivo HExxH (GRANDGENETT et al., 2000; CUEVAS, CAZZULO e SÁNCHEZ, 2003; MA et al., 2011; ALVAREZ, NIEMIROWICZ e CAZZULO, 2012), associado com o domínio catalítico da proteína. Porém, em *T. rangeli*, Pereira (2014), baseando-se no genoma previamente sequenciado (STOCO et al., 2014) identificou três grupos em grande número de cópias gênicas nesta espécie: Gp63_1 – 3. O grupo GP63_1 apresenta os resíduos de histidina e ácido glutâmico conservados no motivo HExxH, enquanto GP63_2 apresenta uma substituição do ácido glutâmico por uma alanina (HAXxH), e o terceiro grupo de *T. rangeli*, GP63_3, entretanto, apresenta o motivo totalmente diferenciado, apresentando substituição das histidinas e do ácido glutâmico por arginina, glicina e tirosina (RGxxY). Laghi (2016), analisou a estrutura terciária *in silico* da GP63_2 de *T. rangeli*, de forma comparativa ao cristal de GP63 de *L. major* (SCHALANGENHAUF, ETGES e METCALF, 1998), e observou que a alteração do motivo pode alterar a função da protease.

Uma vez que o ciclo biológico do *T. rangeli* ainda não é completamente elucidado ainda são necessários mais estudos para melhor entender a biologia da interação entre *T. rangeli* e seus hospedeiros. A GP63 é uma proteína que em outros tripanosomatídeos tem conhecida função na interação parasito-hospedeiro, atuando de diferentes formas nos parasitos para os quais já foi caracterizada, porém

sua função no parasito não patogênico *T. rangeli* ainda não está estabelecida. Desta forma, entender a função dessa proteína no parasito poder auxiliar na compreensão do porquê *T. rangeli* não causa patogenia para o hospedeiro mamífero.

1.4 HIPÓTESE

As isoformas da metaloprotease GP63_2 e GP63_3 de *Trypanosoma rangeli* não possuem atividade protease.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar as diferentes isoformas da metaloprotease GP63 de *Trypanosoma rangeli*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar e analisar as sequências codificantes de GP63 de *T. rangeli*;
- Verificar a presença de GP63 no secretoma de formas de cultura *T. rangeli*;
- Avaliar as diferenças na transcrição de GP63 em diferentes formas de *T. rangeli*;
- Modelar e analisar *in silico* as diferentes isoformas de GP63 de *T. rangeli*;
- Expressar e purificar as metaloproteases GP63 de *T. rangeli*;
- Obter culturas de *T. rangeli* superexpressando as diferentes isoformas de GP63.

3 METODOLOGIA

3.1 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE GP63 NO GENOMA DE *T. rangeli*

3.1.1 Busca das sequências

As sequências utilizadas como *query* nas buscas genômicas foram as três reportadas por Pereira (2014) referências dos grupos GP63_1, GP63_2 e GP63_3. No presente trabalho, as sequências foram obtidas por três diferentes estratégias, todas utilizando a base de dados da última montagem do genoma da cepa SC-58 de *T. rangeli*, gerado pelo grupo de pesquisa:

- 1) Busca por sequências similares, utilizando BLASTn, BLASTp e tBLASTn, com valor limítrofe de *e-value* 1×10^{-5} .
- 2) Busca por sequências com o domínio de peptidase M08 (Pfam 01457), através do perfil de HMM, utilizando o programa HMMer (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011).
- 3) Busca por motivo utilizando o programa Patmatdb (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/patmatdb>), utilizando como *query* os motivos de ligação ao Zinco da GP63_1 (HExxH), GP63_2 (HAxxH) e GP63_3 (RGLAY).

Após a obtenção das sequências foi retirada a redundância para que houvesse somente sequências com identificador único no arquivo final. Posteriormente, as sequências foram classificadas entre as que possuíam ORFs completas e as sequências parciais.

3.1.2 Análises das sequências

3.1.2.1 Análise filogenética

As sequências aminoacídicas não redundantes obtidas a partir da tradução das ORFs completas identificadas foram alinhadas com a ferramenta T-coffee (<http://tcoffee.crg.cat/>). As regiões pobremente alinhadas e muito divergentes foram removidas com o programa Gblocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html), gerando um arquivo final com cerca de 300 resíduos de aminoácido por sequência. A história evolutiva foi inferida pelo método de inferência bayesiana utilizando o programa MrBayes (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) com o modelo de substituição JTT+G com 2 corridas simultâneas, a partir de 2.000.000 de gerações com frequência de amostra de 10.000 e *burn in* de 25%.

3.1.2.2 Análise do motivo

Para observar a variação da região do motivo de metzincinas entre as sequências aminoacídicas das diferentes isoformas de GP63 utilizou-se o programa SkyLign (<http://skylign.org/>) para obtenção dos logos das sequências. As sequências dos motivos de todas as GP63 identificadas na busca genômica foram alinhadas pela ferramenta T-coffee. O motivo utilizado inclui desde a primeira histidina que se liga ao zinco, ou a arginina no caso da GP63_3, até a metionina – H/RxxxH/YxxG_x_nHx₁₀₋₁₁M.

3.1.2.3 Predição de localização celular

Afim de verificar a presença de peptídeos sinais para endereçamento celular e presença de âncora GPI nas proteínas utilizou-se as ferramentas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), e PredGPI (<http://gpcr2.biocomp.unibo.it/predgpi/pred.htm>), nos padrões para organismos eucariotos.

3.2 MODELAGEM ESTRUTURAL

Os modelos 3D das isoformas referências de GP63_1 a 3 de *T. rangeli* foram construídos no programa I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) utilizando os parâmetros padrões. Como modelo utilizou-se a estrutura da Leishmanolisina de *L. major*, cuja estrutura já foi determinada por cristalografia (PDB 1LML). As modelagens com *Tm-score* maior que 0,5 (*Tm-score* de 0 a 1) foram selecionadas para as análises. Para realização dos modelos foram retiradas as regiões de peptídeo sinal e âncora de GPI das sequências.

3.3 BUSCA DAS SEQUÊNCIAS DE GP63 NO TRANSCRITOMA de *T. rangeli*

Os dados do transcrito de *T. rangeli* utilizados neste trabalho foram gerados pelo nosso grupo de pesquisa e serão objeto de outra publicação. Resumidamente, os transcritomas de formas tripomastigotas sanguíneas obtidas de camundongos infectados, bem como de formas epimastigotas de *T. rangeli* obtidas de hemolinfa e de formas tripomastigotas metacíclicas obtidas de glândulas salivares de *Rhodnius prolixus* infectados foram obtidos a partir de 3 réplicas biológicas distintas de cada grupo. Foram construídas nove bibliotecas de cDNA que foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq 2500 no Instituto Karolinska. A montagem do transcrito foi realizada na plataforma

Trinity v2.2.0 (GRABHERR et al., 2011) e a quantificação dos níveis de transcritos foi realizada pelo programa Kallisto.

As sequências de GP63 encontradas no genoma foram utilizadas como *query* em uma busca por similaridade por BLASTn nas sequências dos transcritomas. Como diferentes sequências do GP63 identificadas no genoma apresentaram alta similaridade com um mesmo transcrito, essas sequências foram agrupadas em diferentes *Clusters*. Os transcritos, previamente anotados, foram reanotados com relação aos *Clusters* aos quais eles pertenciam ou aos identificadores das GP63 no genoma.

Posteriormente, foi gerada uma matriz com os identificadores dos transcritos, a anotação do gene e as diferentes contagens absolutas das réplicas dos diferentes grupos e analisada utilizando o programa START (<https://kcvl.shinyapps.io/START/>).

3.4 ANÁLISE DO SECRETOMA DE DIFERENTES FORMAS DE *T. rangeli*

Os dados do secretoma de *T. rangeli* utilizados neste trabalho foram gerados pela doutoranda Carime Lessa Mansur Pontes. Resumidamente, formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura foram utilizadas para a obtenção de proteínas secretadas, sendo preparadas de acordo com Bayer-Santos e colaboradores (2013). Após a digestão proteolítica com tripsina (Promega), todos os peptídeos obtidos foram submetidos a espectrometria de massas no *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/USA).

Os dados brutos (raw) de MS/MS foram processados utilizando o programa MASCOT Distiller® (Matrix Science) e a busca na base de dados do genoma do *T. rangeli* foi realizada utilizando o programa MASCOT (Matrix Science). Após estas etapas, o programa *Scaffold* foi utilizado para compilar e validar as proteínas identificadas pelos programas de busca. Foram consideradas proteínas válidas aquelas que apresentaram pelo menos dois peptídeos, com FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) menor que 1% e com probabilidade de acerto dos peptídeos superior a 95% e 99% para a proteína.

3.5 SUPEREXPRESSÃO, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE METALOPROTEASES

3.5.1 Cultivo de formas epimastigotas e promastigotas

Foi utilizada a cepa Choachí de *T. rangeli* (SCHOTTELIUS, 1987). A cultura de formas epimastigotas foi realizada em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10 % de soro bovino fetal

(SBF, Gibco), 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) a 27 °C através de passagens semanais.

O cultivo da forma promastigota de *L. tarentolae* foi realizado em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado com hemina, 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina (Cultilab) a 27 °C através de passagens semanais.

As cepas utilizadas encontram-se depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB/UFSC).

3.5.2 Clonagem em vetor de expressão pLEXSY-neo2 e pROCK

Foram desenhados iniciadores específicos para os três genes das diferentes isoformas da GP63 (1, 2 e 3) que já estavam previamente clonados no vetor pGEM T-easy (Promega) (PEREIRA, 2014). Os iniciadores (Tabela 1) delimitaram os fragmentos dos genes a partir do códon inicial até o códon do sítio ômega do peptídeo sinal para âncora de GPI, nos genes que possuíam. Os genes amplificados por PCR e os plasmídeos foram digeridos pelas enzimas *Xho*I e *Kpn*I (para sub-clonagem no vetor pLEXSY-2-neo) ou *Xba*I e *Kpn*I (para sub-clonagem no vetor pROCK_Flag3x_mNeonGreen_GPI). Após a digestão dos produtos de PCR e vetores conforme as condições ideais descritas pelos fabricantes, os produtos de digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % para posterior purificação dos fragmentos digeridos pelo kit *QIAquick® Gel Extraction Kit 250* (Qiagen), segundo as especificações do fabricante.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes e clonagem nos vetores.

Sentido	Nome do Iniciador	Sequência (direção 5'-3')
Sentido	pLEXSY_GP63_1F	<u>CTCGAGAATGCCTTCAATGCGCCCCGCC</u>
	pROCK_GP63_1F	<u>TCTAGAATGCCTTCAATGCGCCCCGCC</u>
	pLEXSY_GP63_2F	<u>CTCGAGAATGCGCCGTCAACTTCACG</u>
	pROCK_GP63_2F	<u>TCTAGAATGCGCCGTCAACTTCACG</u>
	pLEXSY_GP63_3F	<u>CTCGAGAATGCACGCCATGCGCCGTC</u>
	pROCK_GP63_3F	<u>TCTAGAATGCACGCCATGCGCCGTC</u>
Antissenso	GP63_1R	<u>GGTACCTCGTTCACGGGACCTTTGC</u>
	GP63_2R	<u>GGTACCAACAGCCCTACAGCCATCGTG</u>
	GP63_3R	<u>GGTACCGGAGAGAGCAACACCAGACG</u>

Os sítios específicos para as enzimas de restrição estão sublinhados.

A ligação dos insertos nos vetores ocorreu na presença da enzima T4 DNA ligase (Promega) em tampão do fabricante, por 20 horas a 16

°C, e os produtos da ligação foram utilizados para transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5 α .

Após a transformação, os clones com os vetores recombinados (pLEXY_SG63_1/ pLEXY_SG63_2/ pLEXY_SG63_3 e pROCK_SG63_1/ pROCK_SG63_2/ pROCK_SG63_3) foram crescidos em meio LB (Lysogen broth) suplementado com Ampicilina 100 μ g/ml durante 18 horas a 37 °C e submetidos a extração plasmidial pelo kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Brevemente, 10 ml de cultura foi centrifugada e as células foram suspendidas em tampão. As bactérias foram então lisadas, e adicionou-se a solução de neutralização. O lisado foi centrifugado e o sobrenadante transferido para uma coluna de sílica, para ligação com os plasmídeos. Após lavagem para remoção de impurezas e contaminantes, os plasmídeos foram eluídos em água ultrapura autoclavada e quantificados por espectrofotometria a 260 nm em equipamento Picodrop.

Os plasmídeos purificados foram sequenciados, pelo método de Sanger, utilizando o kit *BigDYE 3.1* (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. Foram utilizados tanto os iniciadores específicos para os genes GP63_1, GP63_2 e GP63_3 quanto iniciadores complementares as regiões flanqueadoras nos vetores, sendo a leitura dos fragmentos realizada em um equipamento *abi3500* (Applied Biosystems) para confirmação da fase correta de leitura. O sequenciamento das amostras foi realizado no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC (LAMEB).

3.5.3 Transfecção dos vetores pLEXY_SG63 em *L. tarentolae* e pROCK_SG63 em *T. rangeli*

A transfecção dos parasitos foi realizada utilizando 5 x 10⁷ parasitos, lavados em PBS pH 7,4 e adicionado 100 μ l do tampão de eletroporação e 10 μ g de DNA plasmidial. Em cada transfecção realizada, a mistura de parasitos e plasmídeo foi transferida para cubetas de 0,2 cm de abertura e submetidas a eletroporação em condições estabelecidas pelo programa U-033 no equipamento Nucleofector (Lonza). Então, os parasitos foram transferidos para tubos contendo meio LIT suplementado com 20% SBF para *T. rangeli* ou BHI suplementado com hemina para *L. tarentolae*, cultivados a 27 °C por 24 horas e então acrescentado G-418 (Geneticin) para seleção dos parasitos contendo o vetor.

Os parasitos foram mantidos em fase exponencial de crescimento a 27 °C através de riquês semanais em meio LIT suplementado com

SBF e crescentes concentrações de G-418 para *T. rangeli* e com BHI suplementado com 50 ug/ml de G-418 para *L. tarentolae*. Os fenótipos dos parasitos transfectados foram comparados a cepa selvagem.

A confirmação da transfecção foi observada pela técnica de *Western blot* utilizando o anticorpo primário contra a cauda de histidina (anti-HisTag) ou contra a Flag3x (anti-FLAG M2) produzida com a proteína, conforme será descrito no item 3.5.4. Para *L. tarentolae* também se realizou a extração do DNA total pelo método de fervura, no qual 1 ml da cultura contendo os parasitos foi fervida a 70 °C por 10 min, centrifugada e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O DNA presente no sobrenadante foi utilizado para reação de PCR utilizando os iniciadores senso P1442 e antissenso A264 do vetor pLEXY, amplificando um fragmento de aproximadamente 1.900 pb.

3.5.4 Western blot

Os parasitos foram lavados duas vezes com PBS pH 7,4 e tiveram seus extratos proteicos totais extraídos utilizando tampão de lise (50 mM NaCl; 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 1% Triton X-100) a 95°C. A concentração dos extratos proteicos obtidos foi avaliada em um equipamento Spectramax (Molecular Devices) através de microdosagem pelo método de Bradford, utilizando como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA) (BRADFORD, 1976). 50 µg dos extratos de *T. rangeli* e *L. tarentolae*, nas condições a serem analisadas, foram solubilizados em tampão de amostra desnaturante (20 % glicerol, 0,5 % azul de bromofenol, 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 4,4 % SDS, 2 % β-mercaptoetanol), aquecidos a 95 °C durante cinco minutos e resolvidos em eletroforese em géis SDS-PAGE 10 % e transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL, GE Healthcare) durante 12 horas a 25 V, conforme descrito por Towbin e colaboradores (1979). As membranas foram bloqueadas em solução de 150 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl pH 7,4, 1 % de Tween 20 e 5 % de leite desnatado por uma hora a temperatura ambiente e a membrana adicionada a solução contendo os anticorpos primários anti-HisTag ou anti-FlagM2. Após lavagens para a retirada dos anticorpos excedentes foi adicionada solução contendo o anticorpo secundário anti-IgG, de camundongo, conjugado a peroxidase. As membranas foram novamente lavadas, adicionadas ao reagente ECL (Pierce), expostas em filmes radiográficos e reveladas utilizando o equipamento SRX-101A (Konica Minolta). O tamanho das proteínas identificadas foi estimado comparando-as a um padrão de peso molecular conhecido.

4 RESULTADOS

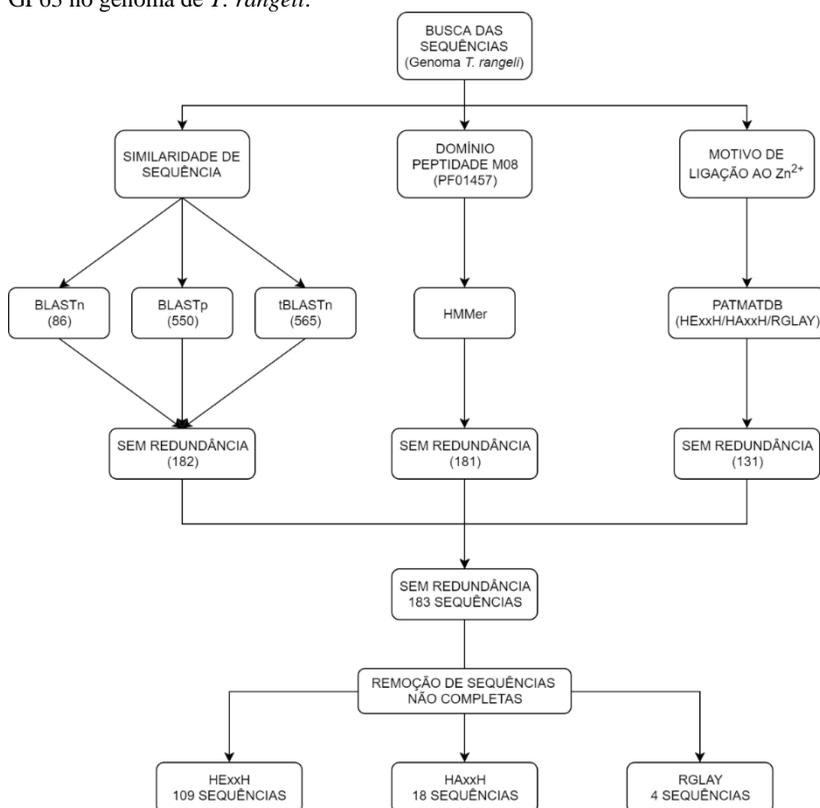
As sequências representantes dos grupos GP63-1, GP63-2 e GP63-3 foram previamente descritas por Pereira (2014) e neste trabalho foram utilizadas para realizar as modelagens tridimensionais e buscas de sequências similares. A Figura 7 mostra o alinhamento destas três diferentes isoformas utilizadas como modelos, apresentando os peptídeos sinais para endereçamento celular, âncora de GPI, os sítios de n-glicosilação, os aminoácidos relacionados ao sítio catalítico, assim como o suposto pro-peptídeo.

representam o sítio catalítico da enzima. A cabeça de seta aponta para a provável cisteína que realiza a clivagem do pró-peptídeo.

4.1 BUSCA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As buscas de genes que codificam para GP63 no genoma do *T. rangeli* foram realizadas utilizando diferentes estratégias. Considerando os resultados das 3 estratégias foram obtidas 131 sequências completas e não redundantes das três diferentes isoformas, sendo 109 de GP63_1, 18 de GP63_2 e 4 de GP63_3 (Figura 8).

Figura 8. Organograma das estratégias utilizadas para busca das sequências de GP63 no genoma de *T. rangeli*.



Entre parênteses estão descritos o número de sequências de GP63 identificadas em cada etapa.

4.1.1 Análise filogenética

Na análise filogenética das 131 sequências aminoacídicas das GP63 completas identificadas no genoma, observa-se que as sequências referentes aos grupos GP63_2 e GP63_3 encontram-se em ramos distantes umas das outras, porém juntas entre si, como mostrado na Figura 9.

Figura 9. Árvore filogenética das 131 seqüências não redundantes de GP63 encontradas no genoma de *T. rangeli*.

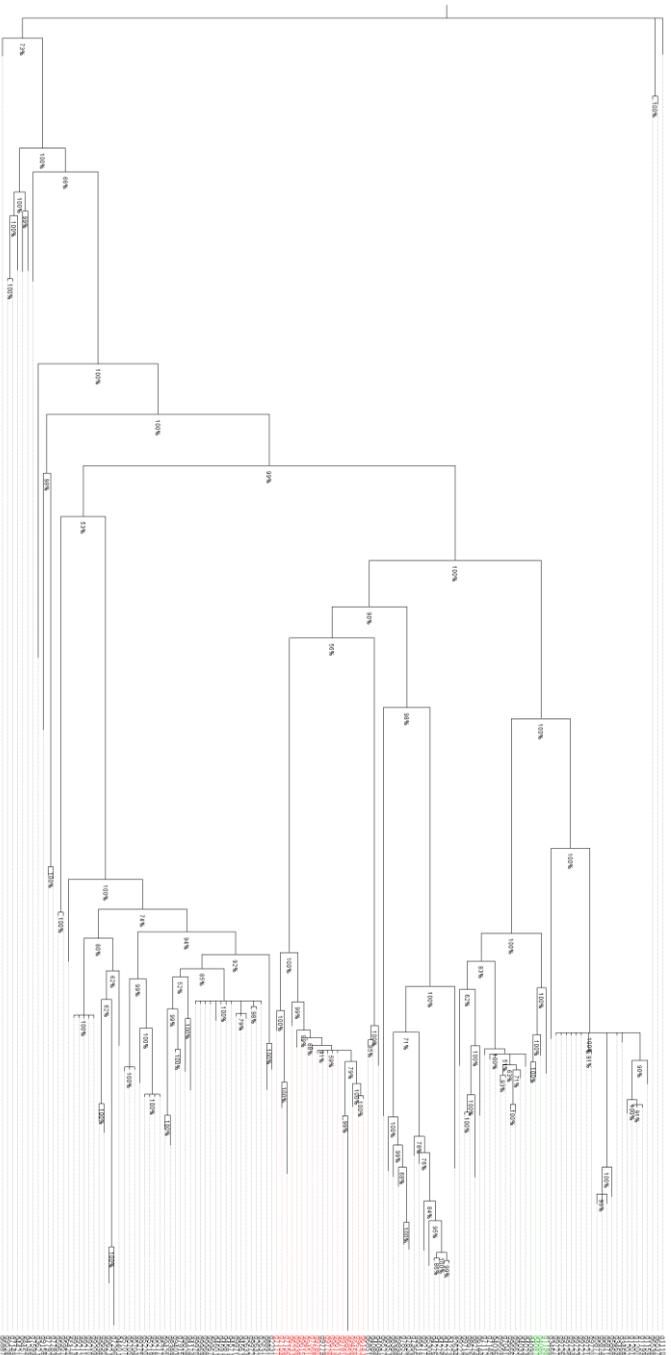
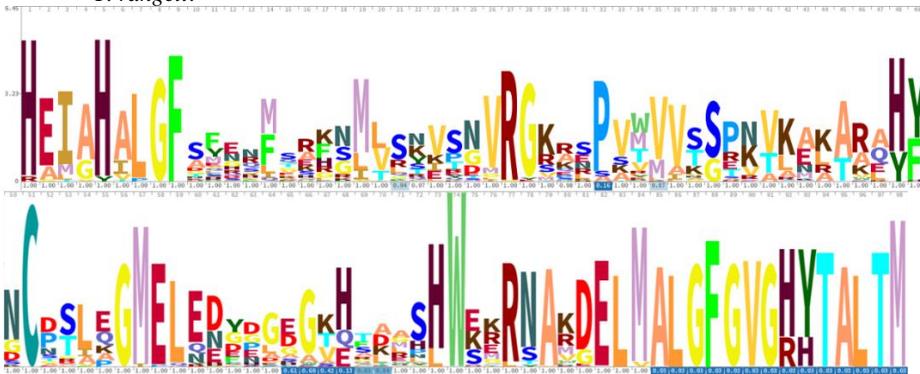


Figura 10. As probabilidades posteriores de cada nó estão mostradas. As seqüências em vermelho representam o grupo de GP63_2. As seqüências em verde representam o grupo de GP63_3. As demais seqüências representam o grupo de GP63_1

4.1.2 Análise do motivo de metzincinas

O alinhamento dos resíduos de aminoácidos correspondentes a região do motivo das metzincinas mostrou uma grande conservação dos aminoácidos característicos do motivo nas diferentes isoformas, assim como a presença de outros resíduos de aminoácidos compartilhados entre as sequências (Figura 10). Entre os aminoácidos mais conservados encontram-se as histidinas nas posições 1, 5 e 73, a glicina 9 e fenilalanina 10, assim como a metionina na posição 84. Observa-se também que a partir da glicina 9 até a histidina 73, existe uma região que varia em tamanho de 55 a 64 resíduos de aminoácidos.

Figura 11. Logo do motivo proteico de metaloproteases do grupo metzincinas obtido a partir das sequências não redundantes de GP63 encontradas no genoma de *T. rangeli*.

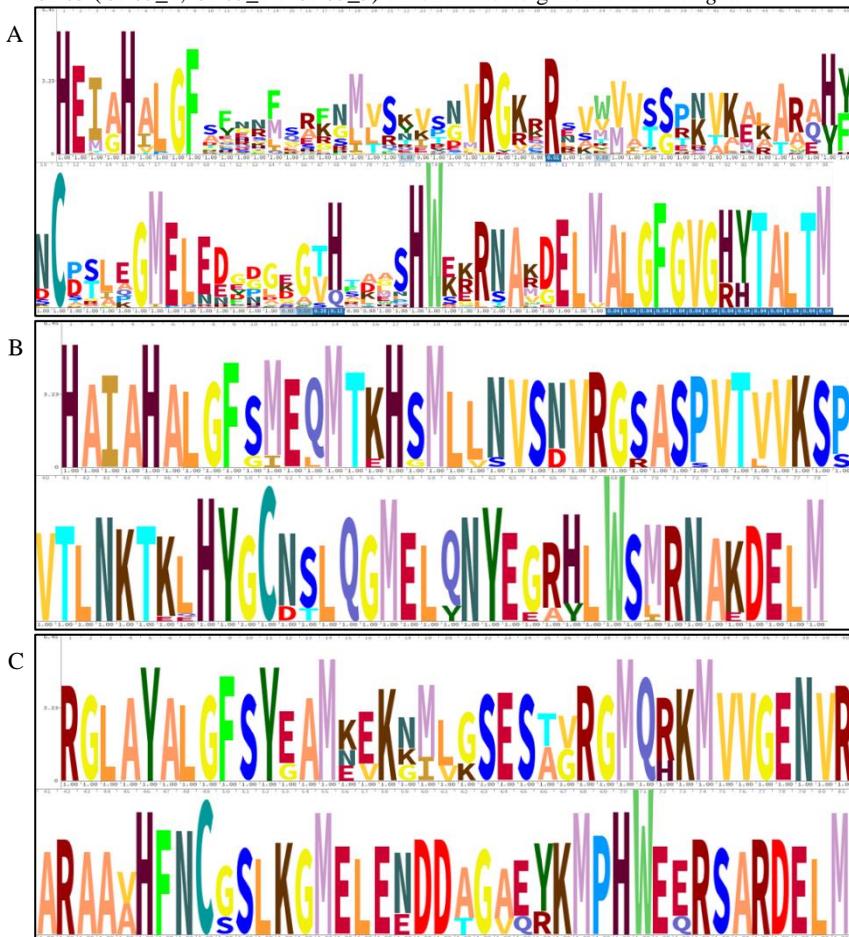


Representação dos diferentes aminoácidos em suas respectivas posições. As posições dos aminoácidos são mostradas na barra acima e abaixo está a respectiva probabilidade de ocorrência daquela posição – quanto mais escuro a cor da posição, em menos sequências ela está presente. A altura de cada aminoácido representa o seu grau de conservação.

Dentre as sequências de GP63_1, percebe-se bastante variação entre os resíduos de aminoácidos que não são essenciais para a hidrólise, assim como maior variação no tamanho do motivo (Figura 11A), porém mantendo-se a conservação das histidinas, ácido glutâmico, glicina e metionina presentes no motivo de metzincinas. Em relação as GP63_2 e GP63_3, não se observa muita variação entre as sequências, sendo a maioria dos resíduos de aminoácidos conservados, nos seus respectivos motivos (Figura 11B e C). Nota-se que a maioria das sequências de GP63_1 possuem o motivo composto por até 84 aminoácidos,

semelhante aos 78 e 81 aminoácidos de GP63_2 e GP63_3, respectivamente.

Figura 12. Logos do motivo proteico de metaloproteases do grupo metzincinas obtido a partir do alinhamento das sequências não redundantes de cada grupo de GP63 (GP63_1, GP63_2 e GP63_3) encontradas no genoma de *T. rangeli*.



Representação dos diferentes aminoácidos em suas respectivas posições. As posições dos aminoácidos são mostradas acima e abaixo está a respectiva probabilidade daquela posição – quanto mais escuro a cor da posição, em menos sequências ela está presente. A altura de cada aminoácido representa sua conservação. (A) logo do alinhamento das sequências não redundantes de GP63_1. (B) logo do alinhamento das sequências não redundantes de GP63_2. (C) logo do alinhamento das sequências não redundantes de GP63_3.

4.1.3 Predição de localização celular

Utilizou-se diferentes ferramentas de predição de localização celular nas sequências de GP63, a fim de designar o possível endereçamento das diferentes proteínas. Conforme era esperado para a maior parte das sequências de GP63, 31 proteínas provavelmente se localizam na superfície celular do parasito fixadas à membrana através de âncora de GPI (24 de GP63_1, 3 de GP63_2 e 3 de GP63_3). 34 proteínas possuem predição para âncora de GPI, porém não possuem peptídeo sinal e de maneira oposta, 24 proteínas possuem peptídeo sinal, mas não possuem predição para âncora de GPI (22 de GP63_1, 1 de GP63_2 e 1 de GP63_3). Outras 36 proteínas (30 de GP63_1 e 6 de GP63_2) não possuem predição para nenhuma localização celular específica, sendo provável que permaneçam no citosol dos parasitos e cinco sequências possuem predição de localização superficial/secretória, porém não possuem peptídeo sinal e ou predição para âncora de GPI (Tabela 2).

Tabela 2. Predição de peptídeo sinal, localização celular e presença de âncora de GPI nas diferentes isoformas de GP63 de *Trypanosoma rangeli*.

Grupos	ID	Peptídeo sinal	Localização celular	Âncora de GPI
		Signal P	Target P	PredGPI
	g362.t1	MLRLCRVATGLLLVLLCWVRCSLG	S	643
	g440.t1	-	-	1065
	g456.t1	-	-	-
	g457.t1	-	-	-
	g458.t1	-	-	-
	g459.t1	-	-	-
	g460.t1	-	-	-
	g835.t1	MLHFCCPPSQAWilliamVAVAVCCSGCLA	S	824
	g962.t1	-	-	-
	g1110.t1	MRHTPHIPLLVLLCCFTGCF	S	-
	g1159.t1	MRRPRCLAPFLPLALLLLAMHCAGGCLA	S	635
	g1199.t1	MRRPRSSAPLLPLALLLLLAMHCAGGCLA	S	576
GP63_1	g1200.t1	MRRPSSAPLLPLALLLLLAMHCAGGCLA	S	576
	g1201.t1	MRRPRSSAPLLPLALLLLLAMHCAGGCLA	S	576
	g1202.t1	MRRPRSFAPLLPLALLLLLAMHCAGGCLA	S	570
	g2231.t1	-	-	549
	g2631.t1	-	-	721
	g2632.t1	-	-	-
	g2633.t1	-	-	-
	g2634.t1	-	-	-
	g3466.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	576
	g3468.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
	g3469.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
	g4023.t1	MRQSIQTPFLSSPPLLLLLVAMCCAGGCLA	S	675
	g4033.t1	MARRLLQTPFLSSPPLLLLLVAMCCAGGCLA	S	-
g4036.t1	-	-	464	

g4084.tl	-	-	-
g4088.tl	-	-	-
g4174.tl	-	-	573
g4249.tl	MRHTPHIPLLLLLCCCTGAF	S	-
g4273.tl	MLRFLRAPSQSARLLMVIMVAVCCGSGYVAA	S	657
g4274.tl	-	-	590
g4275.tl	-	-	587
g4276.tl	MLRFLRAPSQSARLLMVIMVAVCCGSGYVAA	S	662
g4421.tl	-	-	-
g5217.tl	-	-	548
g5218.tl	-	-	548
g5219.tl	-	-	548
g5220.tl	-	-	548
g5309.tl	MLRFLRVPLQSARLLMVIVVAVCCGCGCVA	S	805
g5704.tl	-	-	491
g5705.tl	-	-	491
g5707.tl	-	-	-
g5868.tl	-	-	-
g5871.tl	-	-	-
g5874.tl	-	-	-
g5877.tl	-	-	-
g5957.tl	MELRAKAAVTVPRHAVILLHLLLLATMYCAVGCIA	S	540
g5963.tl	MELRAKAAVTVPRHAVILLHLLLLATMYCAVGCIA	S	540
g6144.tl	MTCRLLOPTPFLPLALALLAMCCAAGCLA	S	763
g6425.tl	-	-	650
g6527.tl	MRRPLHTTLPLLLLLFLTIHCAGGCLA	S	604
g6537.tl	MRHTPHIPLLLLLCCFSGCFA	S	-
g6538.tl	MRHTPHIPLLLLLCCFSGCFA	S	-
g6851.tl	-	-	-
g6887.tl	MRHTPHIPLLLLLCCFTGCFA	S	-
g7041.tl	-	S	675
g7112.tl	MEQSIQPTPFLSPPPLLLLLVVVAMCCAGGCLA	S	-
g7145.tl	-	-	576
g7149.tl	MRHTVHHLRLLLLCCCAGVFA	S	-
g7296.tl	-	-	-
g7366.tl	-	S	841
g7599.tl	MRHTPYVLLLLLLCCCTGSFA	S	539
g7783.tl	MLHLLCCALLFVLCGGVSPVIA	S	671
g7792.tl	MLHLLCCALLFVLCGGVSPVIA	S	691
g7824.tl	-	S	-
g7852.tl	MLLFCRPPSQFAWLLMVIVVAVCCGSGCLA	S	-
g7915.tl	-	-	-
g8274.tl	MTCRLLOPTPFLPLALLLLAMCCAAACLA	S	-
g8388.tl	-	S	617
g8389.tl	-	-	-
g8457.tl	MRHTPHIPLLVLLCCFTGCFA	S	-
g8676.tl	MTCRLLOPTPFLPLALLLLAMCCAAACLA	S	704
g8891.tl	-	-	386
g9158.tl	MPITLPLFLLLWLWLAGGPCVIA	S	-
g9209.tl	-	-	-
g9210.tl	-	-	791
g9211.tl	-	-	791
g9212.tl	-	-	791
g9213.tl	-	-	791

g9217.t1	MLRFLRAPSQSARLLMVIVVAVCCCCGYVAA	S	858
g9222.t1	MACRLLQPTFLFLLLAQALLLAVCCAAA	S	703
g9275.t1	-	-	624
g9403.t1	-	-	744
g9425.t1	-	-	-
g9519.t1	MLHFCRFPSQSARLLMVIVVAVCCGCGSVA	S	-
g9528.t1	MRHTVHVLRLLLLCCAGVFA	S	-
g9659.t1	-	S	-
g9662.t1	-	S	-
g9666.t1	-	S	-
g9695.t1	-	-	-
g9698.t1	-	S	646
g9714.t1	MTCRLLQPTPFLPLALLLLAMCCAAACLA	S	704
g9720.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	416
g9721.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	416
g9722.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
g9723.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
g9724.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
g9725.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
g9726.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
g9727.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	-
g9828.t1	-	-	522
g9894.t1	-	-	535
g9967.t1	-	-	-
g9968.t1	-	-	-
g9969.t1	-	-	-
g9970.t1	-	-	-
g9971.t1	-	-	-
g9972.t1	-	-	-
<hr/>			
g614.t1	-	S	-
g623.t1	-	-	547
g6853.t1	-	-	-
g7156.t1	-	-	-
g7159.t1	-	-	-
g7177.t1	MRRPRCLAPFFPLALLLLLLAVHCAA	S	544
g7568.t1	-	-	367
g9451.t1	MRRQLHATPFLSLAVFLLLLMHGAGGCLA	S	555
GP63_2 g9458.t1	-	-	-
g9613.t1	MRRQLHATPFLSLAVFLLLLMHGAGGCLA	S	-
g9614.t1	MRRQLHATPFLSLAVFLLLLMHGAGGCLA	S	555
g9615.t1	-	-	427
g9622.t1	-	S	-
g9778.t1	-	-	427
g9779.t1	-	-	432
g9780.t1	-	-	-
g9781.t1	-	-	-
g9938.t1	-	-	432
<hr/>			
g1198.t1	MRRPRSFAPLLPLALLLLLLAMHCAGGCLA	S	707
GP63_3 g4086.t1	MRRRFHATSFLSLAVFLLLLMYGAGGCLA	S	-
g4087.t1	MRRRFHATSFLSLAVFLLLLMYGAGGCLA	S	704
g4090.t1	MSRFLHATSFLSLAVFLLLLMYGAGGCLA	S	617

As seqüências indicadas por S possuem predição de localização na superfície celular/secretórias, as seqüências indicadas por - não possuem peptídeo sinal,

localização identificada ou âncora GPI identificados *in silico*. Os números representam a posição do sítio ômega na sequência aminoacídica.

4.2 ANÁLISE DO SECRETOMA

Das 30 proteínas preditas *in silico* como contendo peptídeo sinal e sinalização para endereçamento secretório, três proteínas correspondentes aos identificadores g3466.t1, g9217.t1 (GP63_1) e g4090.t1 (GP63_3) foram encontradas nos dados do secretoma de formas de culturas de *T. rangeli*. A proteína correspondente a g623.t1 (GP63_2) também foi encontrada, mesmo apresentando predição *in silico* apenas para existência de âncora GPI. As proteínas g623.t1 e g4090.t1 foram observadas tanto no secretoma de epimastigotas quanto de tripomastigotas, enquanto g3466.t1 e g9217.t1 foram encontradas somente no secretoma de tripomastigotas (Tabela 3). As massas moleculares teóricas destas proteínas são de 61, 65, 93 e 69 kDa, respectivamente.

Tabela 3. Sequências encontradas no secretomas das diferentes formas de cultura de *T. rangeli*.

Grupo	ID	Peptídeo sinal	Localização celular	Âncora de GPI	Forma Evolutiva	
		Signal P	Target P	PredGPI	epi	tripo
GP63_1	g3466.t1	MRRSRSSALFLPLALFLLLLAMHCAGGCLA	S	576		x
	g9217.t1	MLRFLRAPSQSARLLMVIVVAVCCCCGYVAA	S	858		x
GP63_2	g623.t1	-	-	547	x	x
GP63_3	g4090.t1	MSRFLHATSFLSLAVLLLLMYGAGGCLA	S	617	x	x

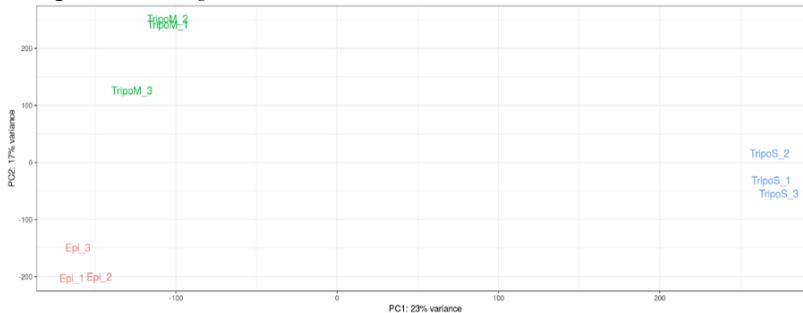
As sequências indicadas por S possuem predição de localização na superfície celular/secretórias, as sequências indicadas por - não possuem peptídeo sinal ou localização identificados *in silico*. Epi – forma epimastigota; tripo – forma tripomastigota. Os números representam a posição do sítio ômega na sequência aminoacídica.

4.3 ANÁLISE DE TRANSCRITOS DE GP63

O transcrito global de *T. rangeli* obtido a partir de 3 formas distintas do parasito, apresenta 8.995 diferentes transcritos. A análise do transcrito global revelou um agrupamento das 3 bibliotecas de cada forma do parasito, mas com uma clara separação entre as bibliotecas de formas distintas, permitindo a distinção do transcrito de epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos (Figura 12). Uma vez que a intenção era apenas de investigar os transcritos correspondentes aos genes de GP63 não redundantes

identificados no genoma foi realizada uma busca por similaridade destes genes no transcrito geral via BLASTn. Uma vez que se utilizou *cut-off* de 90 % de similaridade diferentes genes apresentaram similaridade com o mesmo transcrito e foram agrupados em clusters. A Tabela 4 apresenta quais sequências foram agrupadas em cada *Cluster*. Pode-se observar que o *Cluster* 18 é composto somente por sequências de GP63_3, enquanto o *Cluster* 17 é composto de membros de GP63_2 e o *Cluster* 7 é majoritariamente composto por membros de GP63_2, sendo apenas uma das sequências classificada como GP63_1.

Figura 13. Gráfico da Análise do Componente Principal do agrupamento de todos os transcritos encontrados nas diferentes bibliotecas referentes as diferentes formas biológicas de *T. rangeli*.



Os transcritos de tripomastigotas metacíclicos provenientes das 3 diferentes réplicas biológicas de *T. rangeli* estão anotados como TripoM. Os transcritos de epimastigotas estão anotados como Epi e de tripomastigotas sanguíneos como TripoS. Os eixos mostram a porcentagem de variação dos componentes principais.

Tabela 4. Agrupamento das sequências de GP63 que apresentaram similaridade a um mesmo transcrito no transcrito de *T. rangeli*.

Clusters	ID Gene	ID Transcrito
1	g6144.t1	TRINITY_GG_101_c14_g1_i2
	g9222.t1	
	g1159.t1	
	g1199.t1	
	g1200.t1	
	g1201.t1	
2	g1202.t1	TRINITY_GG_11_c8_g1_i1
	g3466.t1	
	g3468.t1	
	g3469.t1	
	g5868.t1	

	g9720.tl	
	g9721.tl	
	g9722.tl	
	g9723.tl	
	g9724.tl	
	g9725.tl	
	g9726.tl	
	g9727.tl	
3	g5871.tl g5874.tl g5877.tl	TRINITY_GG_12_c1_g3_i1
4	g4273.tl g4274.tl g4276.tl g5309.tl	TRINITY_GG_12_c21_g1_i3
5	g5957.tl g5963.tl g362.tl	TRINITY_GG_12_c68_g1_i1
6	g8389.tl g9425.tl	TRINITY_GG_163_c2_g1_i4
7	g614.tl† g623.tl† g7568.tl† g9451.tl† g9458.tl† g9613.tl† g9614.tl† g9615.tl† g9622.tl† g9778.tl† g9779.tl g9780.tl† g9781.tl† g9938.tl†	TRINITY_GG_2_c4_g1_i1
8	g9695.tl g9698.tl	TRINITY_GG_25_c1_g1_i2
9	g5217.tl g5218.tl g5219.tl g5220.tl g5704.tl	TRINITY_GG_27_c15_g1_i2

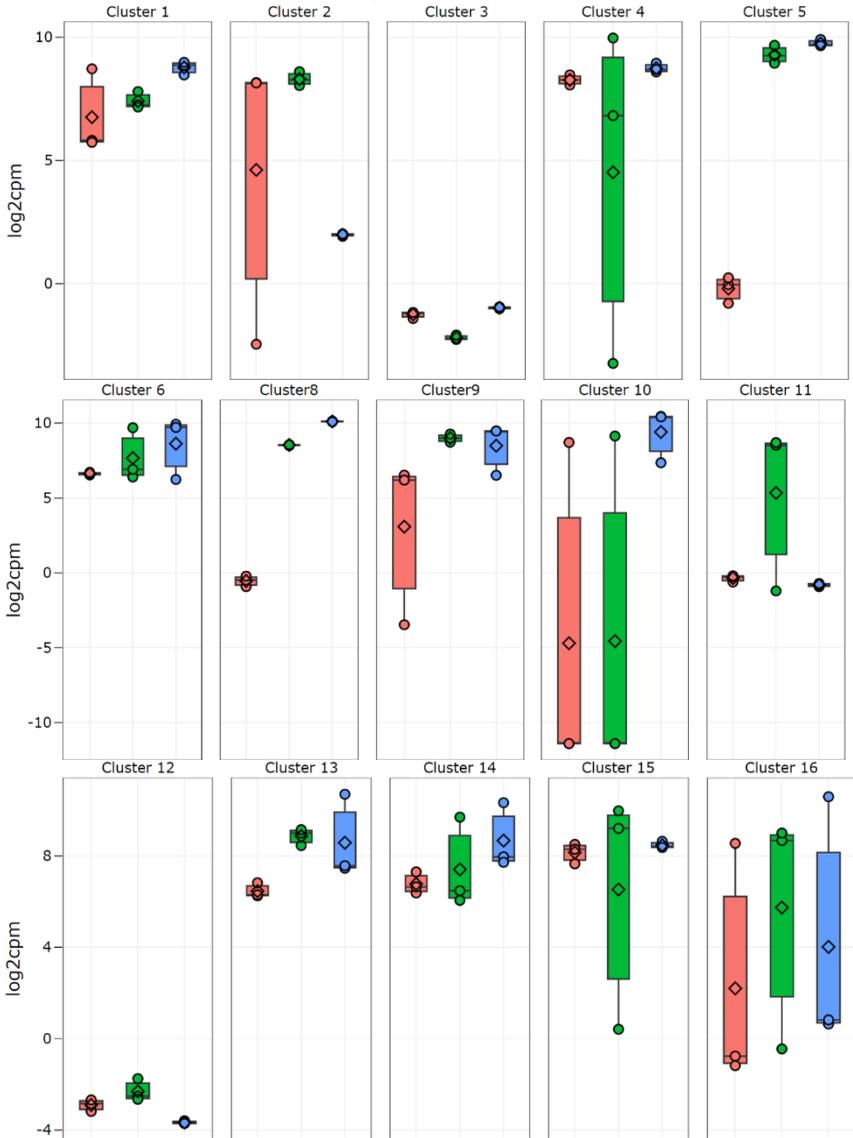
	g5705.tl	
	g5707.tl	
	g9275.tl	
	g456.tl	
	g457.tl	
	g458.tl	
	g459.tl	
	g460.tl	
	g2631.tl	
	g2632.tl	
	g2633.tl	
	g4174.tl	
	g7915.tl	
	g9209.tl	
10	g9210.tl	TRINITY_GG_28_c10_g1_i1
	g9211.tl	
	g9212.tl	
	g9213.tl	
	g9403.tl	
	g9828.tl	
	g9967.tl	
	g9968.tl	
	g9969.tl	
	g9970.tl	
	g9971.tl	
	g9972.tl	
11	g2231.tl	TRINITY_GG_29_c20_g1_i2
	g8891.tl	
12	g7783.tl	TRINITY_GG_39_c57_g1_i1
	g7792.tl	
	g1198.tl*	
13	g8274.tl	TRINITY_GG_56_c20_g1_i3
	g8676.tl	
	g9714.tl	
	g835.tl	
14	g2634.tl	TRINITY_GG_65_c123_g1_i1
	g7852.tl	
	g1110.tl	
15	g6537.tl	TRINITY_GG_66_c33_g1_i4
	g6538.tl	
	g4084.tl	
16	g4088.tl	TRINITY_GG_66_c49_g1_i2

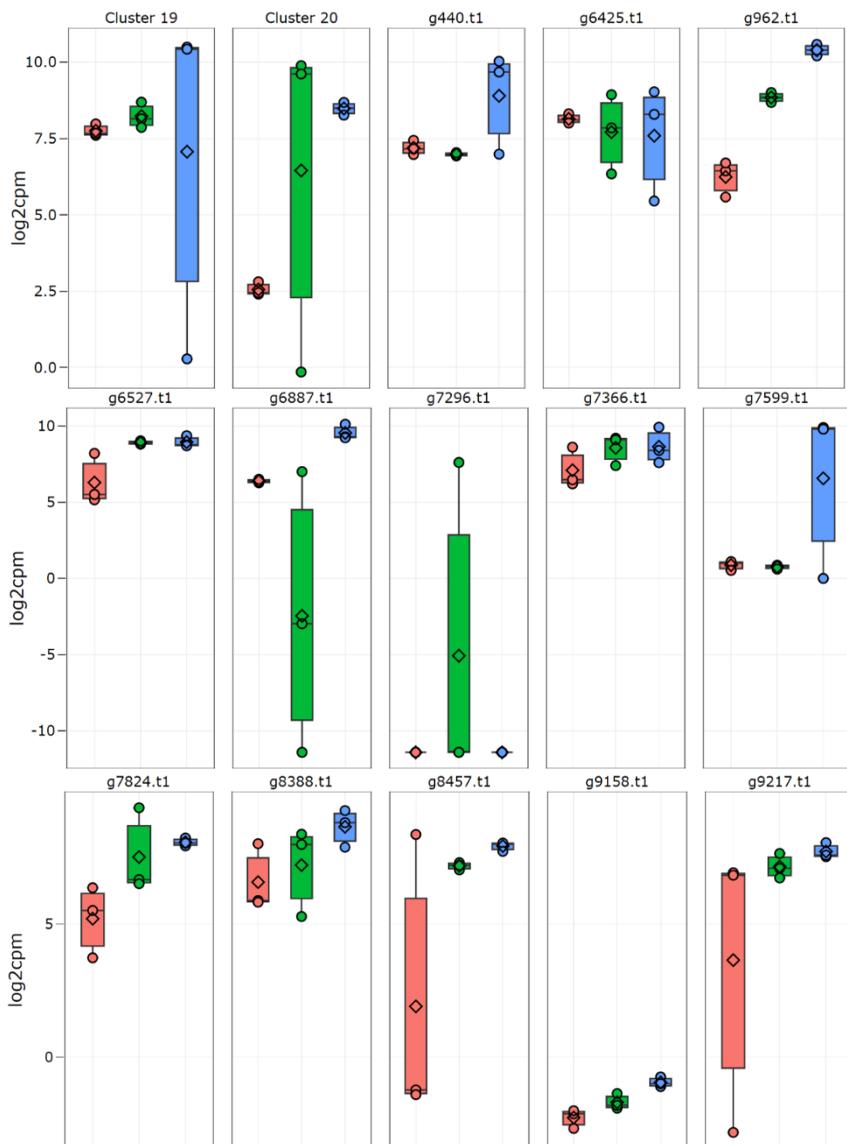
	g6851.t1	
17	g7159.t1† g7177.t1†	TRINITY_GG_76_c16_g1_i6
18	g4086.t1* g4087.t1* g4090.t1*	TRINITY_GG_76_c7_g1_i1
19	g4023.t1 g4033.t1 g4036.t1 g7041.t1 g7112.t1 g7145.t1 g9659.t1 g9662.t1 g9666.t1	TRINITY_GG_76_c7_g1_i3
20	g4249.t1 g4421.t1 g7149.t1 g9528.t1	TRINITY_GG_76_c7_g2_i1

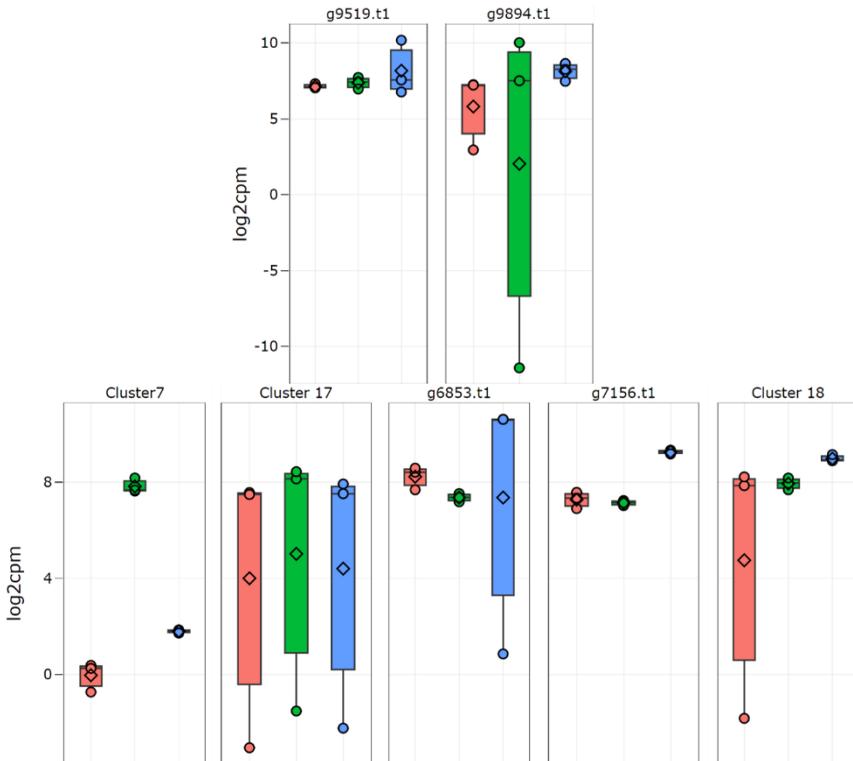
† - sequências de GP63_2. * - Sequências de GP63_3.

Na Figura 13 podemos observar que alguns representantes de GP63 são diferencialmente transcritos nas diferentes formas dos parasitos, enquanto alguns mantém transcrição em nível constante. Alguns genes são mais transcritos em formas tripomastigotas em relação a forma epimastigota, como observado para os *Clusters* 5 e 8. Também ocorre a transcrição diferencial das formas tripomastigotas, como representado pelos *Clusters* 2 e 7 e pelos genes g962.t1 e g7156.t1. A contagem de alguns transcritos teve grande variação nas réplicas, o que dificultou a observação da transcrição de alguns genes, como representado pelos *Clusters* 16 e 20, por exemplo.

Figura 14. Box plot da contagem dos transcritos dos Clusters e genes de GP63 nas diferentes formas evolutivas de *T. rangeli*.







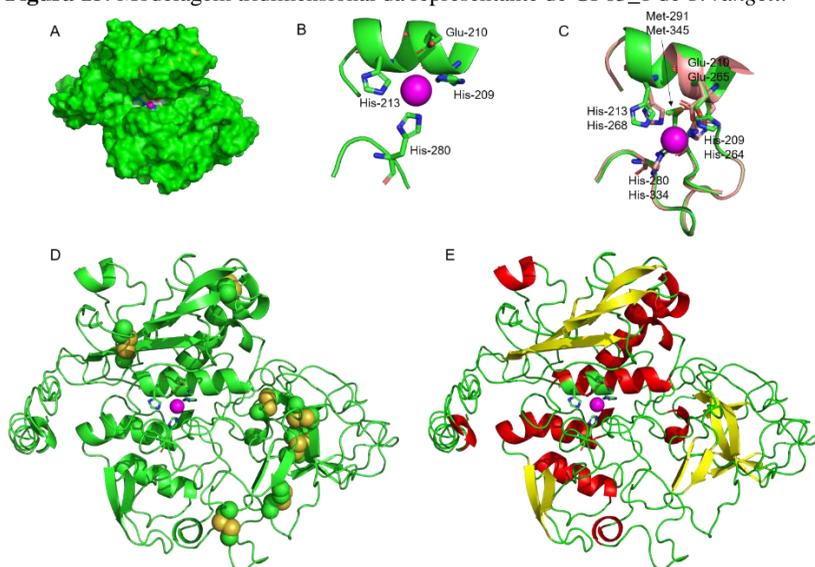
Box plot do log₂ das contagens por milhão (eixo y) pelos diferentes grupos (eixo x). As contagens estão representadas pelas médias (losango) mais os intervalos interquartis. Em rosa estão representados os transcritos de epimastigotas, em verde de tripomastigotas metacíclicos e em azul tripomastigotas sanguíneos.

4.4 MODELAGEM ESTRUTURAL

Utilizando o programa I-TASSER obteve-se as estruturas modeladas em 3D de cada um dos três diferentes representantes das isoformas GP63_1, GP63_2 e GP63_3 (Figuras 14, 15 e 16). A melhor modelagem de GP63_1 obteve um *Tm-score* de 0,807, indicando que a estrutura teve um bom alinhamento com o modelo usado (Leishmanolisina PDB 1LML). O *C-score* (-5 a 2) obtido foi de -1,73, indicando que o modelo teve uma boa topologia global. A estrutura apresenta as quatro folhas β na região N-terminal, assim como as duas α -hélices características de zincinas. Observa-se também oito ligações dissulfetos, duas na região N-terminal e seis na região C-terminal. As histidinas e o ácido glutâmico se mantêm alinhados com os aminoácidos correspondentes no modelo, assim como a metionina. Pela superfície é

possível observar a região catalítica com a presença do zinco (Figura 14). As distâncias computadas entre as histidinas 209, 213 e 280 e o zinco é de 2,5, 3,6 e 2,5 Å, respectivamente.

Figura 15. Modelagem tridimensional da representante de GP63_1 de *T. rangeli*.

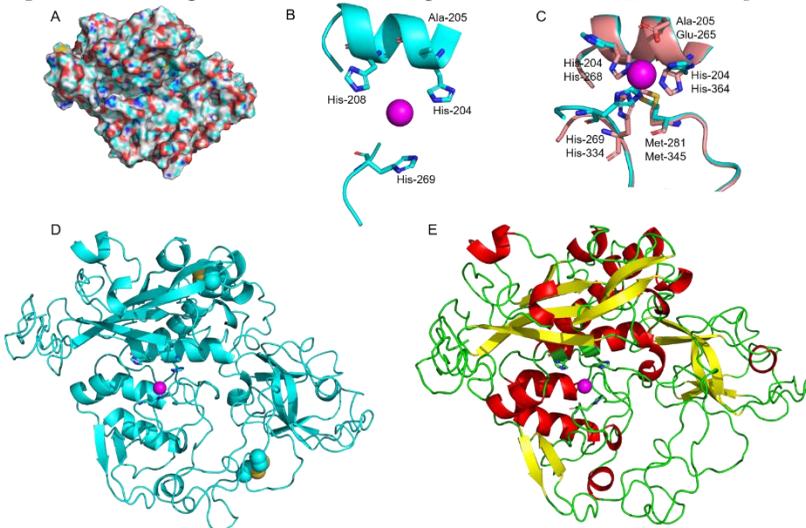


(A) representação da superfície da enzima GP63 evidenciando a fenda aonde o substrato se liga ao sítio de clivagem; (B) região do sítio catalítico indicando as histidinas e ácido glutâmico; (C) sobreposição do sítio catalítico da GP63_1 (verde) com o modelo de Leishmanolisina (1LML) (Laranja); (D) *cartoon* representando as regiões de estruturas secundárias e ligações dissulfeto – representadas em esferas amarelas e verdes; (E) *cartoon* diferenciando regiões de α -hélice em vermelho, folhas β em amarelo e alças em verde. Esfera magenta representa o Zn; representações em palito: verde em B e C: = carbono, vermelho = oxigênio, azul = nitrogênio. As imagens foram obtidas com o uso da ferramenta PyMOL.

Para GP63_2, o melhor modelo teve um *Tm-score* de 0,819 e um *C-score* de -1,15. A estrutura apresenta as quatro folhas β na região N-terminal, assim como as duas α -hélices características de zincinas. Observa-se duas ligações dissulfetos, uma na região N-terminal e uma na região C-terminal. As histidinas mantêm-se alinhadas com os aminoácidos correspondentes no modelo, assim como a metionina. Pela superfície não é possível observar a região catalítica, sendo o zinco encoberto dentro da molécula (Figura 15). As distâncias computadas

entre as histidinas 204, 208 e 269 e o zinco é de 5,4, 8,4 e 6,7 Å, respectivamente.

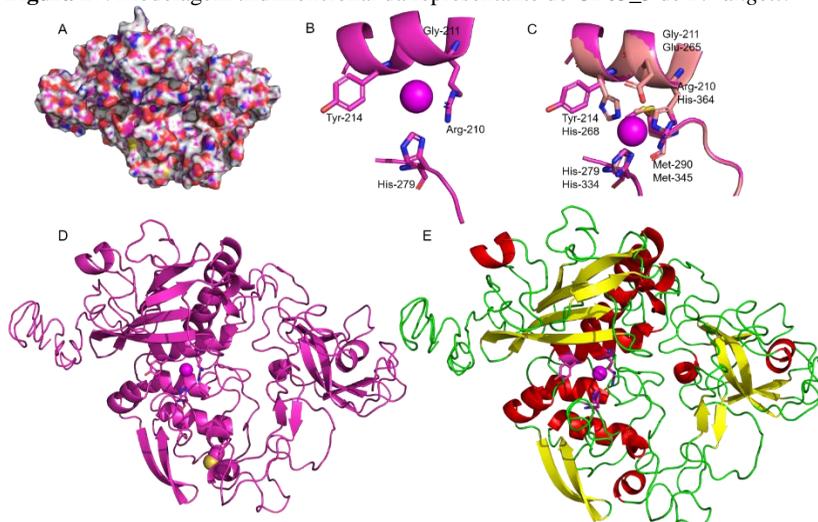
Figura 16. Modelagem tridimensional da representante de GP63_2 de *T. rangeli*.



(A) representação da superfície da enzima. (B) aproximação da região do sítio catalítico indicando as histidinas e ácido glutâmico. (C) sobreposição do sítio catalítico da GP63_2 com o modelo de Leishmanolisina (1LML). (D) *cartoon* representando as regiões de estruturas secundárias e ligações dissulfeto – representadas em esferas amarelas e azuis. (E) *cartoon* diferenciando regiões de α -hélice em vermelho, folhas β em amarelo e alças em verde. Esfera magenta representa Zn; representações em palito: azul em B e C = carbono, vermelho = oxigênio, azul = nitrogênio, amarelo = enxofre. As imagens foram obtidas com o uso da ferramenta PyMOL.

O modelo de GP63_3 teve como valores de *Tm-score* e *C-score* 0,820 e -1,02, respectivamente. A estrutura também apresenta quatro folhas β na região N-terminal, assim como as duas α -hélices características de zincinas. Apresenta apenas uma ligação dissulfeto na região C-terminal. A arginina, histidina e metionina da estrutura se encontram alinhadas as histidinas e metionina do modelo. Pela superfície não é possível observar a região catalítica, somente o zinco, porém este se encontra levemente encoberto por outra região (Figura 16). As distâncias computadas entre a arginina 210, tirosina 214 e histidina 279 e o zinco é de 2,9, 8,2 e 4,1 Å, respectivamente.

Figura 17. Modelagem tridimensional da representante de GP63_3 de *T. rangeli*.



(A) representação da superfície da enzima. (B) aproximação da região do sítio catalítico indicando as histidinas e ácido glutâmico. (C) sobreposição do sítio catalítico da GP63_1 com o modelo de Leishmanolisina (1LML). (D) *cartoon* representando as regiões de estruturas secundárias e ligação dissulfeto – representadas em esferas rosas e amarelas. (E) *cartoon* diferenciando regiões de α -hélice em vermelho, folhas β em amarelo e alças em verde. Esfera magenta representa Zn; representações em palito: rosa = carbono, vermelho = oxigênio, azul = nitrogênio, amarelo = enxofre. As imagens foram obtidas com o uso da ferramenta PyMOL.

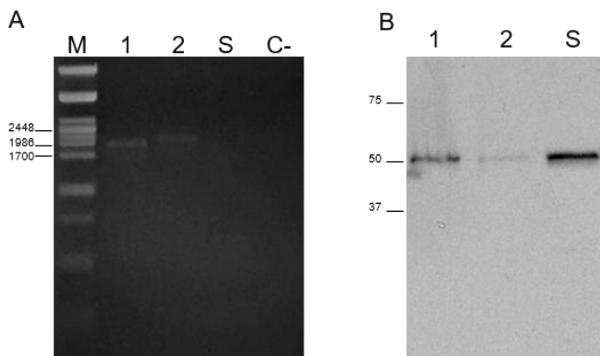
4.5 EXPRESSÃO DAS GP63 DE *T. rangeli*

4.5.1 Clonagem dos genes de GP63 nos vetores pLEXSY-neo2 e pROCK

A clonagem dos genes de GP63_1, GP63_2 e GP63_3 nos vetores de expressão para *L. tarentolae* e *T. rangeli* foi realizada como descrito em 3.4.1. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR e sequenciamento dos genes. A Figura 18 mostra dois exemplos esquemáticos das diferentes construções realizadas.

seria de cerca de 64 kDa. Além disso, uma banda de mesmo tamanho foi verificada nos parasitos controle não transfectados.

Figura 19. Confirmação da presença dos genes GP63_1 e GP63_2 de *T. rangeli* e verificação da expressão destas proteínas recombinantes nas culturas de *L. tarentolae* transfectadas.



(A) Eletroforese em gel de agarose 1 % dos produtos de PCR realizados a partir dos parasitos transfectados com os plasmídeos pLEXSY_GP63_1 e 2 e selecionados com G-418. O PCR foi realizado com os iniciadores senso P1442 e antissenso A264 direcionado ao vetor pLEXSY-2-neo. M – Marcador de massa molecular, DNA Fago Lambda digerido com enzima *Pst*I; os valores estão em pares de base. C- – controle negativo da reação. (B) *Western Blot* utilizando anti-HisTag para verificação da expressão de GP63_1/2 recombinante nas culturas transfectadas. Valores representam a massa molecular das respectivas proteínas em kDa. S – *L. tarentolae* selvagem; 1- *L. tarentolae* transfectada com pLEXSY_GP63_1; 2 – *L. tarentolae* transfectada com pLEXSY_GP63_2.

4.5.3 Superexpressão de GP63_1/2/3 em *T. rangeli*

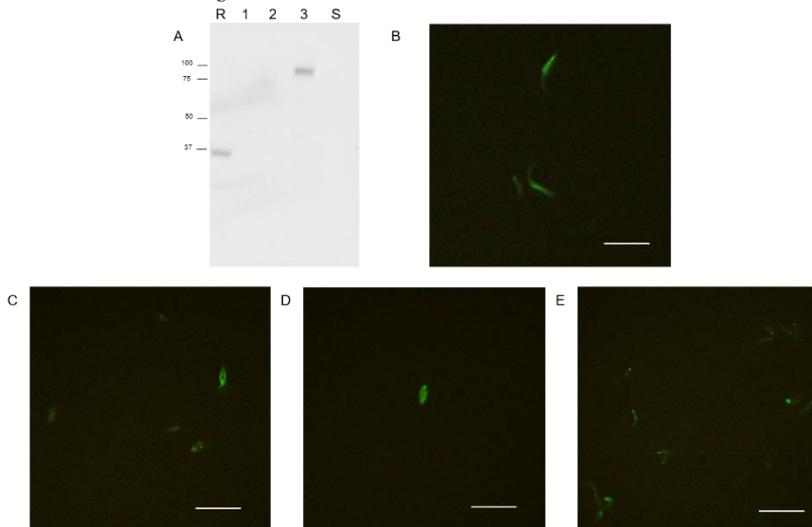
Foram realizadas quatro diferentes transfecções utilizando os três genes clonados no vetor de expressão pROCK. Para as culturas de *T. rangeli* as seleções dos parasitos foram realizadas com crescentes concentrações do antibiótico G-418 (10-300 µg/ml). As primeiras transfecções foram realizadas com 10 µg de cada plasmídeo e a seleção começou com 25 µg/ml de G-418, porém os parasitos logo morriam, então optou-se por abaixar a concentração de antibiótico e aumentar a concentração dos plasmídeos para 40 µg.

O aumento da concentração dos plasmídeos mostrou-se prejudicial para os parasitos, com baixa sobrevivência após as transfecções, dificultando as seleções. No entanto, quando a transfecção foi realizada com a concentração menor de plasmídeo, mas diminuindo a concentração do antibiótico para o início da seleção, foi possível o

crescimento gradual das culturas de *T. rangeli* transfectadas. Como os genes da GP63 são expressos fusionados com a proteína fluorescente mNeonGreen foi possível observar o aumento nas expressões das GP63 a partir do crescente aumento na fluorescência emitida pelos parasitos (Figura 20).

A expressão das GP63-3 pelos parasitos também foi confirmada por *western blot* utilizando anti-Flag3x. No momento da extração das proteínas dos parasitos, as culturas transfectadas com os plasmídeos pROCK_GP63_1 e pROCK_GP63_2 estavam ainda em processo de seleção, sendo que os parasitos apresentam baixa emissão de fluorescência, bem como não houve detecção por *western blot*. As massas moleculares das proteínas detectadas por anti-Flag3x correspondem as massas preditas *in silico* de aproximadamente 30 e 92 kDa para as proteínas mNeonGreen e GP63_3_mNeonGreen, respectivamente.

Figura 20. Confirmação da superexpressão das GP63_1, 2 e 3 nas culturas transfectadas de *T. rangeli*.



(A) *Western blot* utilizando o anticorpo anti-Flag3x dos extratos proteicos totais das culturas de *T. rangeli* transfectadas com: R – o plasmídeo pROCK; 1 – pROCK_GP63_1; 2 – pROCK_GP63_2; 3 – pROCK_GP63_3; S – extrato proteico da cepa selvagem. Os valores representam a massa molecular das respectivas proteínas em kDa. (B-E) Parasitos das diferentes culturas transfectadas com o plasmídeo pROCK expressando apenas a proteína fluorescente mNeonGreen (B); e as proteínas GP63-1 (C), 2 (D) e 3 (E) fusionadas a mNeonGreen. As barras em branco representam 50 μm .

5 DISCUSSÃO

Tripanosomatídeos utilizam de estratégias variadas para sobreviverem em seus hospedeiros mamíferos, como evasão e/ou modulação do sistema imune. Primeiramente é necessário impedir a lise mediada pelas vias alternativa e da lecitina do sistema complemento, que são as primeiras formas de defesa do sistema imune (CESTARI et al., 2013). Após impedir a ação do sistema complemento, *T. cruzi* e algumas espécies do gênero *Leishmania* infectam células e conseguem modular o sistema imune, permitindo sua sobrevivência (GEIGER et al., 2016; SOARES-SILVA et al., 2016). *T. rangeli*, apesar de não ter o seu ciclo no hospedeiro mamífero elucidado, possui resistência ao sistema complemento (SCHOTTELIUS, 1982), contribuindo para evasão da lise mediada por complemento e sua sobrevivência durante a infecção.

Para realizarem a evasão e modulação do sistema imune, esses parasitos geralmente utilizam de uma variedade de enzimas proteolíticas, sendo uma delas a GP63. Diferentes isoformas desta proteína podem ser encontradas nas diferentes formas evolutivas dos parasitos, como já demonstrado para *T. cruzi* e *Leishmania* (YAO; DONELSON; WILSON, 2003; CUEVAS; CAZZULO; SÁNCHEZ, 2003).

Os parasitos passam por nichos distintos em seu ciclo de vida e precisam rapidamente se adaptar, para tanto, a expressão diferencial de suas proteínas é essencial. Schneider e colaboradores (1992) demonstraram que durante a diferenciação *in vitro* de formas amastigotas para promastigotas o mRNA de GP63 é transcrito em quantidade crescentes com o passar do tempo, e que esse aumento na transcrição ocasiona o aumento na expressão de GP63 em promastigotas. Ramamoorthy e colaboradores (1992) observaram que também ocorre uma mudança na transcrição de diferentes mRNAs codificantes para GP63 de promastigotas para promastigotas metacíclicas, mudança esta que também foi observada em nível proteico. De modo semelhante, Belew e colaboradores (2017), observaram diferenças no padrão de transcrição de GP63 por meio da análise do transcrito das cepas CL14 e CLBrenner de *T. cruzi*. Além disso, Kulkarni e colaboradores (2009) demonstraram que as isoformas de TcGP63 são diferencialmente expressas entre as formas evolutivas do parasito, e que essas isoformas também apresentam diferenças na localização celular e em suas modificações pós-traducionais. No presente trabalho, observou-se diferenças na transcrição de algumas isoformas de GP63 de *T. rangeli*, especialmente de membros dos grupos

GP63_1 e GP63_2. Adicionalmente, também foi possível observar que nas formas tripomastigotas a transcrição de GP63 é geralmente maior que nas formas epimastigotas, sugerindo maior relação dessa proteína na interação parasito-hospedeiro no hospedeiro mamífero.

Em *Leishmania* ocorre de maneira similar, sendo que nas formas promastigotas metacíclicas a expressão de GP63 na superfície do parasito é geralmente maior, isso porque a GP63 é essencial para a sobrevivência do parasito frente ao sistema complemento. Ocorre a opsonização do parasito por C3b e a GP63 cliva este componente em iC3b, impedindo a formação da C3-convertase e do complexo de ataque a membrana, porém o parasito mantém-se opsonizado para auxiliar sua fagocitose pelas células do hospedeiro, onde o parasito irá se multiplicar. (BRITTINGHAM et al., 1995; DA SILVA et al., 1989). De maneira oposta, resultados de imunofluorescência do nosso grupo de pesquisa, mostraram que *T. rangeli* não é opsonizado por C3b em presença de soro fresco ou inativado (PONTES et al., 2017). Entretanto, como já observado (SCHOTTELIUS, 1982), tanto as formas epimastigotas quanto as tripomastigotas de *T. rangeli* são resistentes à lise mediada por complemento, sendo o mecanismo envolvido nessa resistência objeto de estudo de outro trabalho do nosso grupo (dados não publicados).

Além das proteínas presentes em sua superfície, os parasitos secretam vesículas contendo moléculas que irão favorecer sua sobrevivência e que podem aumentar sua patogenicidade. Através de uma análise inicial do secretoma de *T. rangeli*, foi possível identificar quatro diferentes GP63s dos três diferentes grupos. Duas delas pertencentes ao grupo 1 estão presentes no secretoma de tripomastigotas, enquanto as outras duas, uma do grupo 2 e uma do grupo 3, foram encontradas tanto no secretoma das formas epimastigotas quanto tripomastigotas. De maneira similar, também foram encontradas GP63 nos secretomas de *T. cruzi* e de todas as espécies de *Leishmania* avaliadas (BAYER-SANTOS et al., 2012; ATAYDE et al., 2016; BROSSAS et al., 2017).

Para espécies de *Leishmania*, a secreção de GP63 é fundamental, sendo um dos principais componentes das vesículas e cujo sem a qual o parasito não é capaz de modular de maneira efetiva o sistema imune do hospedeiro (HASSANI et al., 2014; MARSHALL et al., 2018). Segundo Atayde e colaboradores (2015), *Leishmania* secreta as vesículas no intestino do flebotomíneo que são inoculadas juntamente com os parasitos durante o repasto sanguíneo. Tendo em vista a presença de GP63 no secretoma de formas tripomastigotas, o mesmo pode acontecer

para *T. rangeli*, visto que a transmissão de ambos os parasitos pelos seus respectivos vetores é similar. Em se tratando de *T. rangeli*, ainda não se sabe se o modo de secreção das proteínas é por meio de vesículas e quais são os principais componentes desse secretoma.

Na análise preliminar, interessantemente, foram encontradas GP63s dos três grupos, sendo que apenas na sequência g623.t1 não foi identificado um peptídeo sinal para endereçamento celular. Geiger e colaboradores (2010), avaliaram o secretoma de três diferentes cepas de *T. brucei*, e observaram que muitas das proteínas secretadas também não possuíam peptídeos sinais, sendo secretadas de maneiras não convencionais, indicando que ainda existem modos de endereçamento celular utilizados pelos parasitos não abrangidos pelos programas de bioinformática atualmente utilizados.

Das 131 sequências de GP63 encontradas neste trabalho, 31 sequências possuem predição com peptídeo sinal e âncora GPI, sendo três delas presentes no secretoma, as outras possivelmente se encontram localizadas na superfície do parasito. 36 sequências não possuem qualquer tipo de endereçamento celular predito, provavelmente desempenhando seu papel de modo intracelular.

As 183 sequências de GP63 de *T. rangeli* encontradas, incluindo as redundantes, representam um número menor do que o descrito por Stoco e colaboradores (2014) (444 sequências) e por Ferreira e colaboradores (2010) (222 sequências). Porém, pela anotação dos transcritos no transcrito do *T. rangeli*, foram encontradas outras 151 sequências que não tiveram similaridade com as sequências encontradas no genoma, totalizando 334 sequências, número mais próximo do encontrado por Stoco e colaboradores (2014), que também observaram muitos pseudogenes, ao contrário do observado neste trabalho.

A metodologia utilizada por Ferreira e colaboradores (2010) pode ter excluído sequências curtas de GP63, visto que os autores sequenciaram sequências de 2000 a 4000 pares de base, o que poderia aumentar o número de sequências encontradas, e a variação também pode ser relacionada a cepa utilizada (P07). Dentre as sequências descritas por esses trabalhos, a maioria foi relacionada às sequências de *T. cruzi*, de modo similar a quantidade de sequências, maior do que encontrada para *Leishmania* e *T. brucei* para esta família gênica (STOCO et al., 2014).

As 131 sequências foram alinhadas e realizou-se uma análise filogenética, a qual mostrou que a maioria das sequências se agrupam em dois grandes clados. Dentro de um dos clados estão agrupados os genes de GP63_2 e 3. As sequências de GP63_2 apresentam

proximidade evolutiva, assim como as de GP63_3, porém estão filogeneticamente mais relacionadas com diferentes isoformas de GP63_1, provavelmente das quais se derivam. Pelo logo dos motivos, fica evidente que as diferentes sequências dos grupos GP63_2 e 3 são bastante conservadas dentro dos seus respectivos grupos, provavelmente devido ao menor número de sequências. Dentre os aminoácidos conservados, além dos característicos do motivo, se encontram uma fenilalanina na posição 9, arginina na posição 27, cisteína na posição 51, metionina na posição 57, triptofano na posição 74 e ácido glutâmico e leucina nas posições 82 e 83, respectivamente, sendo estes aminoácidos também conservados entre GP63s de outras espécies de tripanosomatídeos, provavelmente contribuindo para manter a estrutura adequada da proteína (FERREIRA et al., 2010; MA et al., 2011).

Para melhor entender as estruturas das diferentes isoformas de GP63, foram realizadas as modelagens tridimensionais das proteínas. A determinação das estruturas terciárias das proteínas pode auxiliar no entendimento da sua possível função e mecanismo celular. Os métodos de determinação de estruturas estão cada vez mais acurados, pois a maioria dos dobramentos já foram elucidados experimentalmente, e proteínas similares geralmente se dobram de maneira similar (ROCHE; MCGUFFIN, 2016). Levando isso em consideração as modelagens tiveram como modelo a estrutura previamente cristalizada de GP63 de *Leishmania major* (PDB: 1LML) por Schlagenhauf, Etges e Metcalf (1998).

Os três modelos de GP63 de *T. rangeli* tiveram bons índices de modelagem, tendo as estruturas topologias parecidas entre si, assim como com o modelo de Leishmanolisina, como observado nas Figuras 8, 9 e 10. GP63_1 apresenta o motivo de ligação ao zinco conservado (HExxHxxG_{x_n}Hx_nM). Pelo alinhamento, observa-se que as histidinas e ácido glutâmico estão em posições parecidas e poderiam realizar as ligações com o átomo de zinco. As distâncias do nitrogênio presente no anel que fariam a ligação com zinco estão parecidas ao que já foi descrito para outras metzincinas (STÖCKER; BODE, 1995), apesar da distância da His-213 estar em 3,6 Å, deve-se atentar ao fato de que a modelagem mostra a proteína estática, e esses valores podem mudar com os movimentos que a proteína realiza, como descrito por Carvalho e colaboradores (2015).

O zinco presente no sítio catalítico de GP63_1 se encontra acessível, assim como no modelo de *Leishmania*, indicativo que de a interação com o substrato é possível. A estrutura possui oito ligações dissulfeto, o que confere rigidez a molécula, também observada em

Leishmania, diferente dos modelos de GP63_2 e 3, os quais possuem somente duas e uma ligação dissulfeto, respectivamente, sugestivo de moléculas menos rígidas, como alguns membros das metzincinas (RAWLINGS; SALVESEN, 2012).

Todos os modelos possuem as quatro folhas β e duas α -hélices presentes nas diferentes metzincinas (CERDA-COSTA; GOMIS-RÜTH, 2013), mostrando uma conservação entre as proteínas. Porém, a conservação do motivo também é essencial para a ação hidrolítica. Como demonstrado por McGwire e Chang (1995), para correta atividade catalítica, o ácido glutâmico presente no motivo é indispensável, sendo que trocando-o por ácido aspártico – aminoácido também de carga negativa e com potencial para ligação com uma molécula de H_2O –, a atividade catalítica é altamente reduzida. De modo semelhante, substituições das duas primeiras histidinas do motivo também reduziriam a atividade da enzima, mostrando que esses aminoácidos são essenciais para a sua função.

Além de não possuírem o motivo conservado, as distâncias entre os nitrogênios e oxigênio são bem maiores que o comum para interagirem com o zinco. Pela análise da superfície de GP63_2 e 3 podemos observar que o motivo com o zinco não está acessível aos possíveis substratos, e sendo o zinco o átomo responsável pela hidrólise do substrato, sem sua correta ligação ao motivo ou sua acessibilidade a superfície da molécula, é provável que essas isoformas não possuam atividade catalítica, podendo sua atividade estar atrelada a outra função.

Analisando a sequência aminoacídica das três isoformas pode-se observar que GP63_2 e 3, apesar de possuírem duas e uma ponte dissulfeto, possuem as 15 cisteínas conservadas entre GP63s de diferentes espécies, porém não possuem a cisteína provavelmente responsável pela autohidrólise do pró-peptídeo, característico de metaloproteases de matriz, mas também bastante encontrada em outras metzincinas (MA et al., 2011; CALIXTO et al., 2013). A enzima é produzida de modo inativo e após a clivagem do pró-peptídeo é ativada, mostrando função catalítica (BALABAN; RUDAKOVA; SHARIPOVA, 2011).

Para avaliar a atividade das diferentes isoformas decidiu-se expressar as proteínas de forma heteróloga em *L. tarentolae*, modelo escolhido devido à similaridade entre esse organismo e *T. rangeli*. Esses dois organismos apresentam similaridades quanto ao reconhecimento de peptídeos sinais e sítios de glicosilações, além do rápido crescimento desses parasitos. Para realizar a expressão, os genes foram clonados no vetor pLEXSY-neo2, que possui promotor ribossomal de *Leishmania*

para expressão das proteínas, assim como a proteína é produzida contendo seis histidinas em sequência na região C-terminal, para posterior purificação em coluna de NiNTA.

Para que as histidinas estivessem na proteína expressa, as sequências que possuíam peptídeo para âncora de GPI tiveram o peptídeo removido, para que durante o processamento das proteínas a sequência de histidinas não fosse substituída pela âncora de GPI. Para que as modificações pós-traducionais, como correto dobramento e glicosilações, ocorressem, os peptídeos sinais das proteínas foram mantidos nas sequências.

Foram realizadas diferentes transfecções com os vetores pLEXYSY_GP63_1/2/3 em culturas de *L. tarentolae* e durante as seleções dos parasitos observou-se crescente aumento na densidade populacional das culturas na presença do antibiótico de seleção, indicando que os parasitos estavam expressando o gene de resistência presente no vetor. Entretanto, o crescimento logo cessava e os parasitos morriam, sugerindo que as proteínas estavam sendo tóxicas para as culturas. Porém, depois de ajustados alguns parâmetros na seleção, foi possível selecionar as culturas transfectadas com pLEXYSY_GP63_1/2.

Problemas de toxicidade com GP63 de *T. rangeli* já haviam sido relatados por Pereira (2014), que tentou realizar a expressão de GP63 em diferentes modelos bacterianos, mas após as transformações com os vetores de expressão contendo os genes, não ocorria o crescimento de clones positivos. Adicionalmente, Pereira (2014) também realizou a expressão em modelo de célula mamífera, e mesmo obtendo células expressando as proteínas, a expressão foi basal e não foi possível a purificação destas.

Após a seleção das culturas de *L. tarentolae* transfectadas com os vetores pLEXYSY_GP63_1/2, foram realizados PCR e *Western Blot* para confirmação da presença dos genes inseridos nos plasmídeos e da expressão das proteínas. Para a PCR foram utilizados os iniciadores que flanqueiam os genes no vetor, e por eletroforese em gel de agarose observou-se a amplificação de fragmentos de tamanho esperado e somente nas culturas transfectadas. Contudo, pela realização do *western blot* observou-se bandas reconhecidas por anti-HisTag tanto nas culturas transfectadas quanto na cultura selvagem, provavelmente por uma reação inespecífica do anticorpo.

Por análises *in silico*, a massa esperada para as proteínas era de aproximadamente 60 kDa e as proteínas reconhecidas possuíam massa molecular de aproximadamente 50 kDa. Calixto e colaboradores (2013) analisaram uma sequência de GP63_1 de *T. rangeli* e observaram a

presença de um pró-peptídeo na região N-terminal da proteína, também encontrado nas sequências de GP63 usadas como referência neste trabalho. Todavia, somente a sequência de GP63_1 possui a provável cisteína envolvida na clivagem do pró-peptídeo, porém não se pode descartar a possibilidade de ocorrer a clivagem do pró-peptídeo por outra cisteína presente na sequência ou por outro mecanismo.

A GP63 de *L. major*, cujo cristal foi resolvido (SCHALANGENHAUF; ETGES; METCALF, 1998), é expressa como uma pró-enzima e tem sua função proteolítica inibida até ocorrer a clivagem do pró-peptídeo, mecanismo comum entre metaloproteases, provavelmente para impedir a hidrólise inespecífica de proteínas celulares (GOMIS-RÜTH, 2009). Como a função de GP63 é geralmente ocorre na superfície do parasito, a presença de GP63 no interior da célula em grande quantidade, como no caso da expressão heteróloga, pode ocasionar em uma maturação antecipada da enzima, o que a tornaria tóxica para a célula, e pela observação do *western blot* os parasitos selecionados não expressam ou expressam pouca quantidade da proteína, o que pode estar favorecendo sua sobrevivência.

Além de realizar a caracterização individual das enzimas, também é imprescindível entender sua função no parasito, visto que a GP63 está relacionada a interação parasito-hospedeiro em outros tripanosomatídeos. As primeiras transfecções das culturas de *T. rangeli* foram realizadas com os vetores pLEXS_Y_GP63_1/2/3, porém como ocorreu para as culturas de *L. tarentolae* os parasitos não sobreviveram a seleção dos clones expressando as proteínas de interesse. Portanto, decidiu-se realizar as clonagens dos genes no vetor pROCK, que possui promotor ribossomal de *T. cruzi*, também reconhecido por *T. rangeli*. A proteína expressa é fusionada ao peptídeo Flag3x e a proteína fluorescente mNeonGreen e ao final possui um peptídeo sinal para âncora GPI, portanto a proteína expressa mantém a sinalização para ancoragem via âncora GPI como o já existente na sequência das proteínas originalmente.

Assim como para as culturas transfectadas com pLEXS_Y_GP63_1/2/3, após as primeiras transfecções das culturas com os vetores pROCK_GP63_1/2/3 os parasitos logo morriam durante a seleção, provavelmente devido a toxicidade combinada do antibiótico e das proteínas sendo altamente expressas. Após mudanças no protocolo da transfecção e nos métodos de seleção dos parasitos foi possível a visualização da fluorescência emitida pelas proteínas. Conforme os parasitos eram selecionados com crescentes concentrações do antibiótico, observou-se um aumento na fluorescência por microscopia.

A confirmação da expressão das proteínas também foi realizada por *western blot* utilizando o anticorpo anti-FlagM2, porém no momento da extração das proteínas dos parasitos as culturas transfectadas com pROCK_GP63_1/2 estavam no começo do processo de seleção, podendo estar expressando as proteínas, mas em níveis não detectáveis pela técnica. No entanto, os parasitos transfectados com o plasmídeo pROCK_GP63_3 tiveram confirmada a expressão da proteína fusionada por microscopia e *western blot*.

6 CONCLUSÃO

A GP63 de *Trypanosoma rangeli* é uma família gênica de metaloproteases composta por diversas cópias. Esta família pode ser classificada em três grupos com relação ao motivo catalítico, GP63_1/2/3. Os membros de GP63_1 possuem o motivo conservado, enquanto os membros de GP63_2/3 possuem modificações no motivo. Através da análise *in silico* observou-se que as mutações no motivo de ligação ao zinco de GP63_2 e 3 sugerem perda da função metaloproteases. Entretanto, essas isoformas continuam sendo transcritas, possuindo ainda transcrição diferencial em diferentes formas evolutivas do parasito. Adicionalmente, membros dos três grupos de GP63 de *T. rangeli* são secretados em diferentes formas evolutivas do parasito.

A fim de confirmar essas análises, decidiu-se realizar a expressão e purificação das proteínas, entretanto no modelo de expressão heteróloga as proteínas se mostraram tóxicas. Contudo, foi possível obter culturas de *T. rangeli* superexpressando as isoformas de GP63, visando o melhor entendimento das suas funções na relação parasito-hospedeiro.

Portanto, o conjunto dos dados obtidos reforçam a hipótese proposta inicialmente neste trabalho de que as isoformas de GP63_2/3 não possuem função de metaloproteases.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. G. et al. The Serine Protease Pic From Enteroaggregative *Escherichia coli* Mediates Immune Evasion by the Direct Cleavage of Complement Proteins. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 212, p. 106-115, 2015.
- P. Schneider, J.P. Rosat, J. Bouvier, J. Louis, C. Bordier, *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages, *Exp. Parasitol.* 75 (1992) 196e206.
- P.F. Pimenta, E.M. Saraiva, D.L. Sacks, The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*, *Exp. Parasitol.* 72 (1991) 191e204.
- PONTES, C. L. M.; COSTA-JUNIOR, A. O.; MORAES, M. H.; WAGNER, G.; GRISARD, E. C.; STOCO, P. H. *Trypanosoma rangeli* resistance to complement system: Evidences of protein-protein interaction and C3 convertase inhibition. In: XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, 2017.
- SCHOTTELIUS, J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by their different complement sensitivity. **Trop Med Parasitol**, v. 33, p. 147–150, 1982.
- AFCHAIN, D.; LE RAY, D.; FRUIT, J.; CAPRON, A. Antigenic make-up of *Trypanosoma cruzi* culture forms: identification of a specific component. **J Parasitol**, v. 65, n. 4, p. 507-14, 1979.
- ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: Digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 195-206, 2012.
- ANDREWS, S. FastQC a Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010.
- ARANGO-DUQUE, G.; FUKUDA, M.; TURCO, S. J.; STÄGER, S.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* Promastigotes Induce Cytokine

Secretion in Macrophages through the Degradation of Synaptotagmin XI. **The Journal of Immunology**, v. 193, p. 2363-2372, 2014.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, v. 38, 2010.

ATAYDE, V. D. et al. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v.309 p. 7–18, 2016.

ATAYDE, V. D.; ASLAN, H.; TOWNSEND, S.; HASSANI, K.; KAMHAWI, S. OLIVIER, M. Exosome Secretion by the Parasitic Protozoan *Leishmania* within the Sand Fly Midgut. **Cell Reports**, v. 13, p. 957-967, 2015.

BALABAN, N. P.; RUDAKOVA, N. L.; SHARIPOVA, M. R. Structural and Functional Characteristics and Properties of Metzincins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 77, n. 2, p. 149-159, 2012.

BANGS, J. D. et al. In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 114, 2001.

BAYER-SANTOS, E.; AGUILAR-BONAVIDES, C.; RODRIGUES, S. P. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* secretome: characterization of two populations of extracellular vesicles and soluble proteins. **J Proteome Res**, v. 12, 883-897, p. 2013.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STÖCKLER, W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BOUVIER, J.; ETGES, R. J.; BORDIER, C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. **J Biol Chem**, v. 260, p. 15504-9, 1985.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J Immunol**, v. 155, n. 6, p. 3102-11, 1995.

BRITTINGHAM, A.; CHEN, G.; MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Interaction of *Leishmania* GP63 with cellular receptors for fibronectin. **Infect. Immun**, v. 67, 1999.

CALIXTO, P. H. M.; BITAR, M.; FERREIRA, K. A. M.; ABRAHÃO, O.; LAGES-SILVA, E.; FRANCO, G. R.; RAMÍREZ, L. E.; PEDROSA, A. L. Gene identification and comparative molecular modeling of a *Trypanosoma rangeli* major surface protease. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, p. 3053-3064, 2013.

CERDÀ-COSTA, N.; GOMIS-RÜTH, F. Architecture and function of metallopeptidase catalytic domains. **Protein Science**, v. 23, p. 123-144, 2013.

CESTARI, I.; EVANS-OSESSEB, I.; SCHLAPBACH, L. J.; MESSIAS-REASON, I.; RAMIREZ, M. I. Mechanisms of complement lectin pathway activation and resistance by trypanosomatid parasites. **Molecular Immunology**, v. 53, p. 328-334, 2013.

CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Mol Biochem Parasitol**, v. 27, n. 1, p. 43-52, 1988.

CHAUDHURI, G.; CHAUDHURI, M.; PAN, A.; CHANG, K. P. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **J Biol Chem**, v. 264, n. 13, p. 7483-9, 1989.

CONTRERAS, I.; GÓMEZ, M.; NGUYEN, O.; SHIO, M.; MCMMASTER, R.; OLIVER, M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. **PLoS Pathogens**, v. 6, 2010.

CUBA CUBA, A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n. 2, p. 207-20, 1998.

CUERVO, P. et al. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Acta Trop**, v. 106, n. 3, p. 143-8, 2008.

CUEVAS, I. C.; CAZZULO, J. J.; SANCHEZ, D. O. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. **Infect Immun**, v. 71, n. 10, p. 5739-49, 2003.

D'ALESSANDRO-BACIGALUPO, A.; GORE-SARAVIA, N. *Trypanosoma rangeli* **Parasitic Protozoa VW**, v. 98, 1992.

D'ALESSANDRO, A.; SARAVIA, N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: H. Gilles (Ed.). **Protozoal diseases**. London: Arnold Press, 1999. 398-41.

DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR *in vitro*. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2014.

EL-SAYED, N. M.; DONELSON, J. E. A survey of the *Trypanosoma brucei* rhodesiense genome using shotgun sequencing. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 84, p. 167-78, 1997.

FERREIRA, K. A. et al. Genome survey sequence analysis and identification of homologs of major surface protease (gp63) genes in *Trypanosoma rangeli*. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 10, n. 9, p. 847-53, 2010.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 29-37, 2011.

GEIGER, A.; BOSSARD, G.; SERENO, D.; PISSARRA, J.; LEMESRE, J. L.; VINCENDEAU, P.; HOLZMULLER, P. Escaping Deleterious Immune Response in Their Hosts: Lessons from Trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 2016.

GEIGER, A.; HIRTZ, C.; THIERRY, B.; BELLARD, E.; CENTENO, D.; GARGANI, D.; ROSSIGNOL, M.; CUNY, G.; PELTIER, J. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 20, 2010.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M. et al. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nat Biotechnol**, v 29, p. 644-652, 2011.

GRANDGENETT, P. M. et al. Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 110, n. 2, p. 409-15, 2000.

GRANDGENETT, P. M. et al. A Function for a Specific Zinc Metalloprotease of African Trypanosomes. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 10, p. 1432-1445, 2007.

GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 203-209, 1999.

GRISARD, E. C. et al. Transcriptomic analyses of the avirulent protozoan parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 174, n. 1, p. 18-25, 2010.

GRISARD, E. C.; ROMANHA, A. J.; STEINDEL, M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. In: **Parasitologia Humana**. 13ª Edição. ed. São Paulo: Atheneu, 2016.

GUHL, F.; VALLEJO, G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 435-42, 2003.

HASSANI, K.; SHIO, M. T.; MARTEL, C.; FAUBERT, D.; OLIVIER, M. Absence of Metalloprotease GP63 Alters the Protein Content of Leishmania Exosomes. **PLoS ONE**, v. 9; n. 4, 2014.

HERBIG-SANDREUTER, A. Experimental study of the life cycle of *Trypanosoma rangeli* Tejera 1920 in warm-blooded animals and in *Rhodnius prolixus*. **Acta Tropica**, 12:261-264, 1955.

HSIAO, C. H.; YAO, C.; STORLIE, P.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 157, p. 148-159, 2008.

ISNARD, A. Impact of leishmania infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity. **PLoS Pathogens**, 2015.

KOERICH, L. B. et al. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective Trypomastigote forms in vitro. **Parasitol Res**, v. 88, n. 1, p. 21-5, 2002.

KULKARNI, M. M. et al. *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection, **Infect. Immun**, v. 77, p. 2193–2200, 2009.

LACOUNT, D. J. et al. Expression and Function of the *Trypanosoma brucei* Major Surface Protease (GP63). **Genes**, v. 278, n. 27, 2003.

LAGHI, V. S. **GP63 de *Trypanosoma rangeli*: um comparativo in-silico da variabilidade e estrutura proteica destas metaloproteases com outros tripanosomatídeos.** Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2016.

LLEWELLYN, M.; MESSENGER, L.; LUQUETTI, A.; GARCIA, L.; TORRICO, F.; TAVARES, S.; CHEAIB, B.; DEROME, N.; DELEPINE, M.; BAULARD, C.; DELEUZE, J.; SAUER, S.; MILES, M. Deep Sequencing of the *Trypanosoma cruzi* GP63 Surface Proteases Reveals Diversity and Diversifying Selection among Chronic and Congenital Chagas Disease Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, 2015.

LÜCKEMEYER, D. D. **AVALIAÇÃO DO PERFIL PROTEICO DE *Trypanosoma rangeli***

LUKES, J. et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

MA, L. et al. An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. **Parasitol Res**, v. 109, p. 1075-1084, 2011.

MARINO-PUERTAS, L.; GOULAS, T.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases outside vertebrates. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, p. 2026-2035, 2017.

MARSHALL, S.; KELLY, P. H.; SINGH, B. K.; POPE, R. M.; KIM, P.; ZHANBOLAT, B.; WILSON, M. E.; YAO, C. Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasit Vectors**, v. 11, 2018.

MATHEOUD, D.; MORADIN, N.; BELLEMARE-PELLETIER, A.; SHIO, M. T.; HONG, W. J.; OLIVIER, M.; GAGNON, E.; DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen crosspresentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host Microbe**, v. 14, p. 15-25, 2013.

MATTE, C.; CASGRAIN, P.; SÉGUIN, O.; MORADIN, N.; HONG, W.; DESCOTEAUX, A. Leishmania major Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis through the Action of GP63. **PLoS Pathogens**, v. 12, 2016.

MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P. Posttranslational Regulation of a Leishmania HEXXH Metalloprotease (gp63). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 14, p. 7903-7909, 1996.

MCGWIRE, B. S.; CHANG, K.; ENGMAN, D. M. Migration through the Extracellular Matrix by the Parasitic Protozoan Leishmania Is Enhanced by Surface Metalloprotease gp63. **Infection and Immunology**, v. 71, p. 1008-1010, 2003.

MORAES, M. H. et al. Different serological cross-reactivity of *Trypanosoma rangeli* forms in Trypanosoma cruzi-infected patients sera. **Parasites & Vectors**, v. 1: 20. 2008.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes, **J. Immunol**, v. 135, 1985.

PARASHAR, S.; MUKHOPADHYAY, A. GTPase Sar1 regulates the trafficking and secretion of the virulence factor gp63 in *Leishmania*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 12111-12125, 2017.

PEREIRA, T. K. S. **Caracterização de genes codificantes para metaloproteases (GP63) de *Trypanosoma rangeli***. Trabalho de

conclusão de curso - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Handbook of Proteolytic Enzymes. 3rd Ed. **Academic Press**, v. 1, 325-370, 2013.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; ROMA, E. H.; CARNEIRO, M. B.; DORIA, N. A.; SACKS, D. L.; PETERS, N. C. Site-dependent recruitment of inflammatory cells determines the effective dose of *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 2713-2727, 2014.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; & D'ÁVILA-LEVY, C. M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v. 78, p. 687-714, 2006.

SCHALANGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, v. 6, n. 8, 1998.

SCHOTTELIUS, J. Neuraminidase fluorescent test for differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 38, p. 323-327, 1987.

SCHWENDE, H.; FITZKE, E.; AMBS, P.; DIETER, P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Leukocyte Biology**, 59: 555-561, 1996.

SEAY, M. B.; HEARD, P. L.; CHAUDHURI, G. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5129-37, 1996.

SOARES-SILVA, M.; DINIZ, F. F.; GOMES, G. N.; BAHIA, D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; MCKAY, D.; BODE, W. The metzincins -Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, of zinc-peptidases. **Protein Science**, v. 4, p. 823-840, 1995.

STOCO, P. H. et al. Genome of the avirulent human-infective trypanosome – *Trypanosoma rangeli*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. 1-17, 2014.

STOCO, P. H.; MILETTI, L. C.; PICOZZI, K.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. Other Major Trypanosomiasis. In: **Arthropod Borne Diseases**. Springer International, 2016.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1803, p. 20-28, 2010.

VASQUEZ, A. M. et al. Eco-epidemiological aspects of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and their vector (*Rhodnius pallescens*) in Panama. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 4, p. 217-22, 2004.

VICKERMAN K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int J Parasitol**, v. 24, p. 1317– 1331, 1994.

WAGNER, G, YAMANAKA, L. E.; MOURA, H.; LÜCKEMEYER D. D.; SCHLINDWEIN A. D.; STOCO, P. H.; FERREIRA H. B.; BARR, J. R.; STEINDEL, M.; GRISARD, E.C. The *Trypanosoma rangeli* trypomastigote surfaceome reveals novel proteins and targets for specific diagnosis. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 52-63, 2013.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Mol Biochem Parasitol**, v. 132, p. 1-16, 2003.