

CLONAGEM E EXPRESSÃO DO FRAGMENTO DA PROTEÍNA GIGANTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* PARA ESTUDOS DE INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO

Aylla Salomão Krebs von Ermland^{1*}, Lays A. Mendonça Trajano-Silva², Munira Muhammad Abdel Baqui³

1. Estudante de Biologia na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP-USP
2. Pesquisadora de Pós-doutorado – Departamento de Parasitologia - ICB-USP
3. Professora Doutora do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP-USP

Resumo

Nos tripanossomatídeos, incluindo o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, foi demonstrada a presença de uma família de proteínas gigantes (PGs), localizada na Zona de Adesão Flagelar (FAZ). Uma dessas PGs é a calpaína-like cisteína peptidase (ClpGP), ainda não caracterizada funcionalmente. O objetivo deste projeto é investigar o papel da ClpGP em formas epimastigotas de *T. cruzi*, por meio de sua localização por imunofluorescência e da identificação de seus parceiros moleculares no citoesqueleto do parasita. Para isso, um fragmento da ClpGP foi clonado, expresso em *E. coli* BL21 Arctic e purificado para a obtenção da GST-ClpGP, que foi utilizada para produzir o anticorpo policlonal anti-ClpGP e realizar ensaios de interação de *pull-down*. Neste trabalho, produzimos novas ferramentas para o estudo desta PG e revelamos a sua localização no FAZ e seus parceiros moleculares, contribuindo para elucidar sua função e potencial como alvo terapêutico contra esta doença.

Autorização legal: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- FMRP/USP) - Protocolo nº 021/2018.

Palavras-chave: *E. coli* BL21 Arctic; FAZ; anticorpo policlonal

Apoio financeiro: FAPESP -2019/11047-4

Trabalho selecionado para a JNIC: Universidade de São Paulo (USP)

Introdução

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário da família Trypanosomatidae, é o agente etiológico da Doença de Chagas, uma Doença Tropical Negligenciada que afeta cerca de 8 milhões de pessoas no mundo ^[1]. Atualmente, não há vacinas e as drogas disponíveis são ineficazes na fase crônica da doença ^[2]. Nos tripanossomatídeos, a região responsável pela adesão do flagelo ao corpo celular é chamada de Zona de Adesão Flagelar (FAZ), e sua estrutura desempenha um papel importante para a integridade do parasita ^[3,4]. Uma família de proteínas gigantes (PGs) (≥ 500kDa) foi descrita na região do FAZ ^[5,6,7,8,9] e desempenha funções importantes para a morfologia do parasita, como é o caso da FAZ10 em *Trypanosoma brucei*, que está envolvida na correta orientação do sulco de clivagem durante a divisão celular e no posicionamento de organelas citoplasmáticas ^[9]. Resultados prévios do nosso laboratório identificaram proteínas de alta massa molecular presentes no citoesqueleto do *T. cruzi*, após *screening* por espectrometria de massas (MS) ^[10]. Dentre estas proteínas, encontra-se a PG calpaína-like cisteína peptidase (NCBI ID: XP_809993) (denominada por nós de ClpGP), pertencente ao grupo de cisteínas proteases que vêm sendo amplamente estudadas, inclusive para desenvolvimento de vacinas ^[11].

Por se tratar de uma proteína gigante do tipo calpaína, é possível que esteja envolvida em processos cruciais para a sobrevivência do parasita, inclusive aqueles relacionados ao FAZ. Contudo, um dos desafios para o estudo de novas proteínas do *T. cruzi* é a pouca disponibilidade de ferramentas moleculares, como anticorpos comerciais monoclonais e policlonais que reconheçam suas proteínas e estruturas celulares ^[12]. Assim, o objetivo deste projeto é investigar o papel da ClpGP em formas epimastigotas de *T. cruzi* através da produção de novas ferramentas moleculares, como o anticorpo policlonal anti-ClpGP e a proteína recombinante GST-ClpGP, e seu uso em ensaios de imunofluorescência, *western blotting* e de interação do tipo *pull-down* para elucidar a função desta PG, que pode ser um potencial alvo terapêutico contra a Doença de Chagas.

Metodologia

A análise *in silico* da estrutura dos domínios proteicos presentes na ClpGP (NCBI ID: XP_809993) foi realizado pelo *software* InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) e por Blastp (NCBI).

Para obtenção da proteína GST-ClpGP, o fragmento de 598 pb, correspondente aos primeiros 200 aminoácidos da ClpGP (NCBI ID: XP_809993) foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *T. cruzi*

cepa Y. O produto foi purificado, digerido pelas enzimas de restrição NotI e EcoRI, e subclonado no vetor digerido pGEM-T (Promega). Bactérias competentes *E. coli* DH10B (Thermo) foram transformadas com a construção pGEM-ClpGP e as colônias positivas foram selecionadas com ampicilina (50 ug/ml) em placa LB. O DNA plasmidial foi purificado por Miniprep (Promega), e, após digestão, o fragmento foi clonado no vetor de expressão pGEX-4T1 (GE Healthcare) com seu N-terminal fusionado ao tag de glutathiona-S-transferase (GST). A construção foi confirmada por digestão dupla e sequenciamento.

Para a expressão solúvel da GST-ClpGP (49 kDa), duas cepas de bactérias foram testadas: *E. coli* BL21 (DE3) pLysS cálcio competentes (Thermo) e *E. coli* BL21 (DE3) Arctic Express (Agilent Technologies). Ambas as bactérias foram transformadas com a construção pGEX-ClpGP e os clones positivos foram selecionados por ampicilina (50 ug/ml) e gentamicina (20 ug/ml). Com os clones confirmados, seguimos para a expressão da proteína, induzida por Isopropyl β -D-Thiogalactoside (IPTG) (0.2mM). Após lise, centrifugação do extrato total e separação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (pellet), analisamos as amostras por eletroforese em gel de poliácridamida 12%. A presença da proteína na fração solúvel foi confirmada por *western blotting* utilizando anticorpo anti-GST. A GST-ClpGP foi então purificada por cromatografia de afinidade em coluna de glutathiona sepharose (GE Healthcare).

Para a obtenção de anticorpo específico anti-ClpGP, a proteína purificada foi cortada do gel de poliácridamida, emulsificada com adjuvante (Freund Incompleto - CalBiochem) e injetada de forma subcutânea em camundongos Balb/C. O sangue foi coletado por punção cardíaca e obtido o soro com o anticorpo policlonal anti-ClpGP. O anticorpo foi validado por *western blotting* e através de imunofluorescência indireta (IF) para localização da ClpGP em formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL Brener e Y). Ensaios de IF com o anticorpo anti-ClpGP também foram realizados em células de rim de macaco (LLC-MK2) infectadas com *T. cruzi* (Cepa Y), como descrito por Gachet-Castro *et al* [13] para identificar a proteína nas formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y).

A proteína recombinante ClpGP foi também utilizada nos ensaios de interação (*pull-down*). O lisado da fração do citoesqueleto de formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL Brener) foi obtido [9] e incubado com beads-GST-ClpGP. Após incubação, o complexo proteico formado com a GST-ClpGP foi eluído e será analisado por espectrometria de massas (MS).

Resultados e Discussão

Nos tripanossomatídeos, as proteínas do tipo calpaína são chamadas de “calpaína-like” por não possuírem todos os domínios clássicos calpaína, e, por isso, sua função nesses parasitas permanece incerta [14]. Após análise *in silico*, identificamos que a proteína ClpGP se enquadra no grupo IV dentre as classificações estabelecidas para as proteínas do tipo “calpaína-like” proposta por Ersfeld *et al* (2005) [14]. Neste grupo, encontram-se proteínas bastante divergentes que apresentam várias cópias para os domínios calpaína clássicos. A ClpGP apresenta três cópias do domínio II cisteína (Cys) e três cópias do domínio III. Nas calpaínas clássicas, domínio Cys tem um domínio catalítico de protease e dois sítios de ligação de cálcio, mostrando ser importante para a atividade destas proteínas [14]. Para obter a proteína recombinante, selecionamos uma região na porção N-terminal do primeiro domínio Cys, de modo a se tornar uma boa ferramenta para os estudos de interação proteína-proteína e para a produção do anticorpo policlonal anti-ClpGP. Após amplificação e clonagem do fragmento (598 pb), confirmamos a construção pGEX-ClpGP e induzimos a expressão da GST-ClpGP (49 kDa) em duas cepas de *E. coli*. Observamos que a cepa *E. coli* BL21 pLysS, apresentou a GST-ClpGP predominante na sua fração insolúvel (Figura 1-A). A proteína insolúvel indica a formação de agregados insolúveis conhecido como corpos de inclusão, indicando uma proteína não enovelada corretamente e/ou funcionalmente inativa [15,16]. O fragmento escolhido, por se localizar parte no domínio Cys, contém 28.4% de aminoácidos cisteína, o que lhe confere um caráter insolúvel devido a formação de pontes dissulfetos, requerindo um enovelamento mais eficiente. Além disso, estima-se que apenas ~20% das proteínas recombinantes expressas em bactérias são produzidas em sua forma solúvel, e esse número decresce quando se trata de proteínas de eucariotos [17], como é o caso do *T. cruzi*.

Diante disso, e sabendo que a expressão de proteínas recombinantes é influenciada por fatores físicos e também transcricionais [15], pensamos em soluções para o problema e testamos diferentes temperaturas de incubação, concentrações do indutor IPTG e alterações no meio de cultura, como a adição de etanol [18]. O etanol adicionado ao meio de cultura é descrito como um facilitador na solubilização de proteínas recombinantes devido a sua capacidade de estabilizar proteínas em sua forma nativa [18]. Contudo, a GST-ClpGP permaneceu na fração insolúvel. A formação de corpos de inclusão pode ser causada por um *fold*ing parcial dos polipeptídeos e a presença de chaperonas eficientes é fundamental para que isso não ocorra [15]. Assim, como alternativa, expressamos a proteína na cepa *E. coli* Arctic Express, que possui uma sofisticada maquinaria para solubilizar proteínas recombinantes devido a expressão de duas chaperonas (Cpn60 e Cpn10) da bactéria *Oleispira antarctica*, adaptadas a temperaturas baixas (4°-15°C) [19]. Com essa cepa, a GST-ClpGP foi identificada a maior parte na porção solúvel das amostras induzidas com IPTG (Figura 1-B).

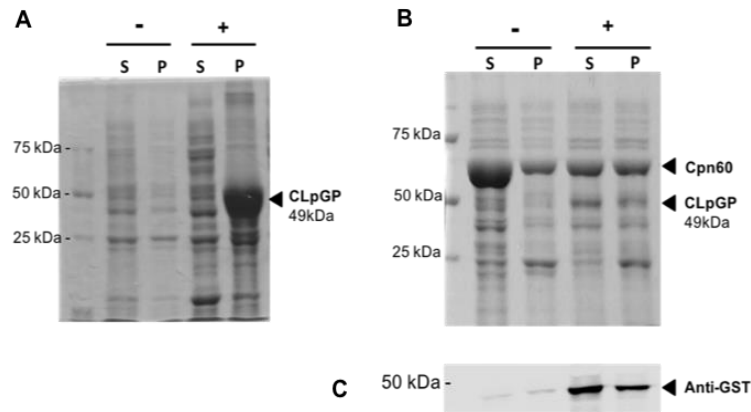


Figura 1. Expressão da GST-ClpGP (49 kDa) em duas cepas de *E. coli*. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% corado com *Comassie Blue*. As amostras das células não-induzidas (-) e induzidas com IPTG (+) foram obtidas após centrifugação do lisado total e separação da porção solúvel (sobrenadante – S) e insolúvel (pellet – P). **(A)** Expressão da GST-ClpGP de 49kDa (seta) em *E. coli* BL21 pLyS. A proteína se encontra na porção insolúvel (P). **(B)** Expressão da GST-ClpGP de 49kDa (seta) em *E. coli* BL21 Arctic Express. A proteína se encontra na porção solúvel (S). A chaperona Cpn60 (~55 kDa) está indicada pela seta preta. **(C)** *Western blotting* usando anticorpo anti-GST para confirmar a presença da GST-ClpGP (49kDa) (seta) na fração solúvel (S) e um parte na insolúvel (P) do lisado.

A GST-ClpGP foi então purificada por cromatografia de afinidade e sua banda foi recortada do gel de poliacrilamida e utilizada para produção de anticorpo policlonal específico em camundongos. Validamos esse anticorpo por *western blotting*, no qual mostrou grande especificidade do anticorpo ao antígeno ClpGP, e não ao *tag* GST. Os ensaios de imunofluorescência indireta (IF) também mostraram a especificidade do anticorpo à ClpGP, que foi identificada na região do FAZ, como descrito para outras proteínas gigantes (Figura 2-A). O FAZ é a região responsável por conectar o flagelo ao corpo celular do parasita, e se inicia desde o bolso flagelar até o final do flagelo que está em contato com o corpo celular, sendo o FAZ ausente na porção do flagelo livre. Nos tripanossomatídeos, a região do FAZ possui diversas proteínas e tem função intrínseca tanto na regulação da morfologia celular, quanto no posicionamento de organelas citoplasmáticas, desempenhando papel na divisão celular e nas diferenciações dos tripanossomatídeos durante seu ciclo de vida [4,9]. Assim, a localização dessa proteína no FAZ (Figura 2-A) mostra que ela pode estar envolvida em processos cruciais para o ciclo de vida do parasita, indicando ser uma proteína que deve interagir com elementos do citoesqueleto. Nesse contexto, decidimos identificar a ClpGP nos diferentes estágios morfológicos do ciclo de *T. cruzi* através de IF em células epiteliais de rim de macaco (LLC-MK2) infectadas com as formas tripomastigotas do parasita. Nas análises de microscopia confocal observou-se que o anticorpo anti-ClpGP identificou a proteína tanto nas formas amastigotas (48hpi), quanto nas tripomastigotas (96hpi). Na forma amastigota, sem flagelo livre, a localização da ClpGP está na região do bolso flagelar, local aonde o flagelo faz o contato com corpo celular. Já na forma tripomastigota que possui flagelo lateralizado ao longo do corpo celular, observamos regiões específicas de maior reatividade na região do FAZ.

Com a proteína recombinante também realizamos ensaios de interação do tipo *pull-down* para buscar os parceiros moleculares que interagem com a ClpGP no citoesqueleto de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso, a GST-ClpGP foi imobilizada na coluna de glutationa, e, após a eluição das proteínas ligantes, as amostras foram analisadas em eletroforese e foram considerados parceiros da ClpGP as proteínas que não apareceram ligadas ao controle- GST (Figura 2-B). O próximo passo será analisar os ligantes por espectrometria de massas (MS) a fim de determinar as suas identidades.

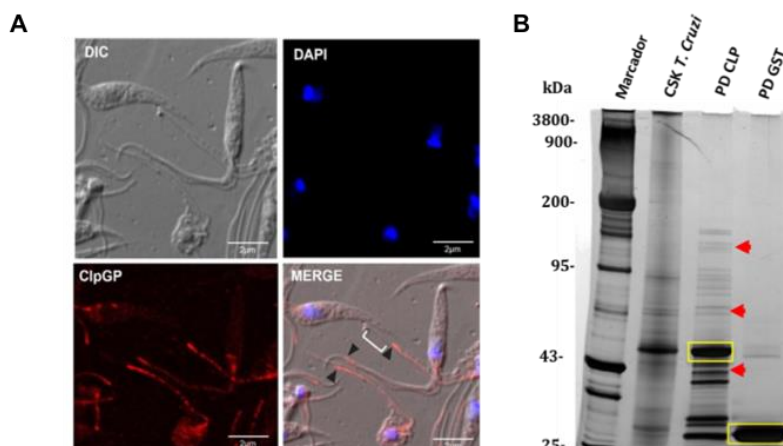


Figura 2. A ClpGP está localizada na região do FAZ e sua interação com proteínas do citoesqueleto de *Trypanosoma cruzi*. (A) Microscopia confocal das formas epimastigotas usando anticorpo anti-ClpGP e anticorpo secundário conjugado com Alexa 594 (vermelho). Os núcleos e cinetoplastos foram marcados com DAPI (azul). As setas pretas indicam o local que termina a conexão do flagelo com o corpo celular e o colchete branco indica o flagelo livre. Barra: 2 µm. (B) *Pull-down* usando o citoesqueleto (CSK) de *T. cruzi* epimastigota. Gel gradiente SDS-PAGE (2,5%-12%) corado por nitrato de prata. Esquerda para direita: Marcador de alta massa molecular de miofibrila; Extrato celular do CSK de *T. cruzi* epimastigota; *Pull-down* das proteínas ligantes com a ClpGP (PD ClpGP); *Pull-down* das proteínas ligantes com a GST (PD GST). Os retângulos amarelos indicam a presença da proteína recombinante GST-ClpGP e a proteína GST. As setas vermelhas indicam algumas das possíveis proteínas parceiras da ClpGP.

Conclusões

Neste trabalho, os resultados contribuíram para esclarecer o papel da ClpGP em *T. cruzi*. Os resultados mostraram que esta proteína se enquadra no grupo IV das proteínas do tipo “calpaína-like” em tripanossomatídeos. Neste grupo, encontram-se proteínas bastante divergentes que apresentam várias cópias para os domínios calpaína clássicos e possuem função ainda incerta. Para estudar esta proteína no *T. cruzi*, obtivemos ferramentas moleculares, como a proteína recombinante GST-ClpGP e o anticorpo policlonal anti-ClpGP. Assim, foi possível investigar sua localização em *T. cruzi* e auxiliar futuros estudos de caracterização funcional da ClpGP. Os ensaios de imunofluorescência mostraram a localização desta proteína na região do FAZ nas formas epimastigotas e nas outras formas do ciclo de vida do parasita. O ensaio de *pull-down* isolou os possíveis parceiros moleculares que interagem com essa proteína no citoesqueleto de *T. cruzi*. Os resultados e ferramentas obtidas, contribuirão para elucidar o potencial terapêutico desta molécula, para que avance o desenvolvimento de tratamentos para a doença de Chagas, uma doença negligenciada que afeta milhares de pessoas no mundo.

Referências bibliográficas

1. RIBEIRO, Vanessa et al. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 12, p. 7-17, 2020.
2. VILLALTA, Fernando; RACHAKONDA, Girish. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161-1174, 2019.
3. GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 53, p. 629- 55, 1999.
4. SUNTER, Jack D.; GULL, Keith. The flagellum attachment zone: ‘the cellular ruler’ of trypanosome morphology. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 4, p. 309-324, 2016.
5. BAQUI, M. M. A., Takata, C. S., Milder, R. V. and Pudles, J. (1996). A giant protein associated with the anterior pole of a trypanosomatid cell body skeleton. **European Journal of Cell Biology**, 70, 243-249.
6. BAQUI, Munira MA et al. In vivo and in vitro phosphorylation and subcellular localization of trypanosomatid cytoskeletal giant proteins. **Cell motility and the cytoskeleton**, v. 47, n. 1, p. 25-37, 2000b.
7. BAQUI, Munira Muhammad Abdel; MORAES, Nadia de; MILDNER, Regina Vugman; PUDLES, Julio. A giant phosphoprotein localized at the spongime region of *Crithidia luciliae* thermophila. **Journal of Eukariotic Microbiology [S.l.]**, v. 47, p. 532-537, 2000a.
8. RUIZ-MORENO, L. et al. *Trypanosoma cruzi*: monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. **Exp Parasitol**, v. 80, n. 4, p. 605- 15, Jun 1995.
9. MOREIRA, B. P. et al. Giant FAZ10 is required for flagellum attachment zone stabilization and furrow positioning in. **J Cell Sci**, v. 130, n. 6, p. 1179-1193, 03 2017.
10. TRAJANO-SILVA, L. A. M. Functional characterization of Calpain-like giant proteins at the FAZ region of *Trypanosoma cruzi* by CRISPR/Cas9 system. 2021. 113 p. **Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**, 2021.
11. SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 08 2018.
12. GACHET-CASTRO, Camila; TRAJANO-SILVA, Lays Adrienne Mendonça; BAQUI, Munira Muhammad Abdel. Double Labeling Immunofluorescence using Antibodies from the Same Species to Study Host-Pathogen Interactions. **JOVE-JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS**, n. 173, 2021a.
13. GACHET-CASTRO, Camila et al. Modulation of the host nuclear compartment by *Trypanosoma cruzi* uncovers effects on host transcription and splicing machinery. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, p. 988, 2021b.
14. ERSFELD, Klaus; BARRACLOUGH, Helen; GULL, Keith. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. **Journal of molecular evolution**, v. 61, n. 6, p. 742-757, 2005.
15. SØRENSEN, Hans Peter; MORTENSEN, Kim Kusk. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005.
16. TEROL, Gema Lozano et al. Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.
17. GRÄSLUND, Susanne et al. Protein production and purification. **Nature methods**, v. 5, n. 2, p. 135-146, 2008.
18. CHHETRI, Gaurav; KALITA, Parimita; TRIPATHI, Timir. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. **MethodsX**, v. 2, p. 385-391, 2015.
19. FERRER, Manuel et al. Expression of a temperature-sensitive esterase in a novel chaperone-based *Escherichia coli* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4499-4504, 2004.