



Clonagem e sobre expressão de um gene que codifica para uma proteína de união ao cálcio em *Giardia intestinalis*

William N. Sanchez¹ Magda E. Alvarado² Moisés Wasserman³

07 abr. 2015

Resumo – As proteínas que unem cálcio do tipo EF-HAND têm um papel muito importante nas vias de transdução de sinais que permitem as células eucariotas adaptarem-se as mudanças no ambiente externo. O parasita *Giardia intestinalis* é reconhecido como um excelente modelo para estudar as vias de sinalização, por sua altamente simplificada maquinaria molecular. O objetivo do presente trabalho foi estudar o gene que codifica para uma possível proteína do tipo EF-HAND. O gene foi clonado e a proteína EF 453 foi expressa no parasita. Análises de bioinformática foram realizadas por meio do software I-TASSER. O gene foi amplificado por PCR com primers desenhados (5'ATGACATCTCTGGGTGCCA3' e 5'CTAGACCTCAAAGGCAA3') e foi clonado no vetor de expressão pTubN (possui um tag de HA e um gene de resistência à puromicina) usando *E. coli* cepa TOP 10. Com o plasmídeo recombinante foi feita a transfecção em trofozoítos de *Giardia intestinalis* por eletroporação. Logo, foram selecionados os parasitas resistentes à puromicina. Nesses parasitas foi confirmada a expressão da proteína EF-453 por ensaios de Western Blot pela detecção de uma proteína a 55 KDa com um anticorpo contra HA.

Palavras-chave: *Giardia intestinalis*. proteínas de união a cálcio. motivo EF-HAND. tecnologia recombinante.

1. INTRODUÇÃO

Giardia intestinalis, também conhecida como *Giardia lamblia* é um parasita eucariota unicelular flagelado que coloniza o intestino fraco dos seres humanos e ocasiona uma doença conhecida como Giardiasis (CASTILLO-ROMERO et al., 2009). Estudos filogenéticos baseados na sequência do rRNA 16S e o fator de alongação das proteínas, tem mostrado que *Giardia* é um organismo basal, ou que divergiu muito cedo durante a evolução (MORRISON et al., 2007).

O ciclo de vida de *G. intestinalis* é simples e consiste no intercambio entre duas formas celulares claramente diferenciadas: o trofozoíto e o cisto (LOURENÇO et al., 2012). O trofozoíto tem uma aparência morfológica única com forma de pera e é a forma replicativa, se multiplica por divisão binária e possui dois núcleos diploides (LOURENÇO et al., 2012); por outro lado o cisto é a forma infectiva e é metabolicamente passivo, possui uma parede celular formada principalmente de N-acetilgalctosamina e

¹ williamsanchezluna@gmail.com, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

² Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

³ Universidad Nacional de Colombia, Colombia.



varias proteínas e é altamente resistente a diversos fatores externos (ELVIRA; MORA, 2009; MANNING et al., 2011). *Giardia intestinalis* tem dois processos de diferenciação dentro do seu ciclo de vida os quais são a excistância, que é a transformação de cisto a trofozoíto, e a encistância que é o passo de trofozoíto a cisto. Os dois processos são marcadamente diferentes quanto à morfologia, transporte celular e regulação gênica (REINER, 2008), porém estão sujeitos a aos processos de sinalização celular.

As interações bioquímicas de uma célula formam complexas redes com diferentes funções. Uma parte transcendental é o sistema de transdução dos sinais celulares que tem sido estudada a nível teórico e experimental. Isto é possível porque existem bases de dados disponíveis que contem informação específica de proteínas que fazem parte de uma rede de transdução de sinais (KONDOR; VATTAY, 2013). A conversão dos sinais extracelulares em intracelulares ocorre por causa das cadeias proteicas de sinalização e por pequenas moléculas chamadas segundos mensageiros. A função dos segundos mensageiros e a de amplificar ou transduzir o sinal (MCCORMICK; BAILLIE, 2014).

O cálcio como segundo mensageiro é essencial porque regula processos em células diferenciadas como a contração muscular, excitose, controle do ciclo celular, metabolismo energético e regulação da transcrição (CLAPHAM, 1995; EVANS; ABRAHAMSE, 2009).

Quando a concentração de cálcio intracelular cresce acontece por duas razões: porque há uma entrada extracelular deste cátion ou porque ocorre uma liberação no interior da célula. De qualquer modo, é detectado pelas proteínas de união ao cálcio, as quais podem ter duas funções, bem seja como proteínas sensores ou tampão. As proteínas de união a Ca^{2+} sensores transduzem e fazem parte de uma queda de uma cascada de sinalização. As proteínas tampão capturam e transportam os íons de cálcio para manter a homeostase na concentração intracelular de Ca^{2+} (CARAFOLI, 2002).

Um tipo especial de proteínas de união ao cálcio são as proteínas com motivo EF-HAND. As EF-HAND se caracterizam por sua estrutura de hélice-loop-hélice, assim com os ligandos apresentados no loop (GIFFORD; WALSH; VOGEL, 2007). São proteínas centrais em todos os aspetos referentes aos processos que envolvem a sinalização de Ca^{2+} . Possuem distintas funções como a abertura de canais de cálcio ou a modulação da intensidade e duração dos sinais de Ca^{2+} , para que sejam transduzidas em respostas bioquímicas ou biomecânicas (CHAZIN, 2012).

Porém este trabalho pretendeu estudar a sequência GL50803_17157 (GIARDIADB.ORG, 2009) reportada no gene bank e nomeado neste trabalho EF-453 por seus 453 aminoácidos que compõem sua estrutura primária in silico, a qual possivelmente codifica para uma proteína de união ao cálcio em *Giardia intestinalis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Análise bioinformática

As análises bioinformáticas foram realizadas por meio do software I-TASSER (GROUP; ZHANG, 2008) com a sequência GL50803_17157 reportada no Gene Bank e o desenho dos primers foi realizado mediante a ferramenta primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

2.2. Clonagem em pGEMT- easy e Sub Clonagem em pTubN

Realizou-se um cultivo in vitro de *Giardia intestinalis* no meio de cultivo TYI-S 33 para obter uma quantidade adequada de parasitas no estado de trofozoíto e assim extrair DNA genômico. A purificação do DNA foi feita por meio do kit comercial (DNA Purification System – PROMEGA) Depois foi feita uma PRC com T_m de 58 °C e uma concentração de $MgSO_4$ de 2 mM num termociclador (BIO –RAD MyCycler™ Thermal Cycler System With Gradient Option).

A clonagem no vetor pGEM-T foi realizada segundo a recomendação do fabricante com os produtos de PCR



de EF-453 em bactérias competentes JM 109 de *E. coli*. As bactérias foram rastreadas por PCR e o plasmídeo recombinante foi extraído por lise alcalina e verificado por eletroforese de agarose em buffer TBE. O plasmídeo purificado foi digerido enzimaticamente com as enzimas BamHI e NotI para obter a sequência EF-453. A sub clonagem foi feita pela transformação do plasmídeo recombinante pTubN em bactérias TOP 10 de *E. coli*. As bactérias foram rastreadas por PCR e o plasmídeo recombinante foi extraído por lise alcalina e verificado por eletroforese de agarose em buffer TB.E

2.3. Transfecção do plasmídeo EF-453-pTubN em trofozoítos WB de *Giardia intestinalis*

A transfecção foi realizada por eletroporação com uma voltagem de 350 V, uma capacitância de 95 μ F e uma resistência de 800 Ω num eletroporador (*Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems*) usando trofozoítos de *Giardia intestinalis* da cepa WB. Coletaram-se parasitas em 300 μ L de meio de cultivo sem suplementação com soro e foram agregados em cubetas de eletroporação de 4 mm. Depois do pulso elétrico, as células eletroporadas foram transferidas a meio de cultivo de recuperação.

Depois de 24 horas de recuperação aproximadamente, foi agregada a puromicina para a seleção de trofozoítos transfetados com o plasmídeo recombinante EF-453-pTubN exitosamente.

2.4. Detecção da proteína 453 por western blot

A proteína 453 fusionada com um TAG de hemaglutinina (HA) foi detectada por western blot. Os parasitas silvestres e os transfectantes foram cultivados, coletados e lisados em buffer de eletroforese, assim foram separados por SDS-PAGE e transferidos a uma membrana de PVDF. Depois a membrana foi bloqueada com TBS-T 0,5% de leite por 1 hora e foi incubada com o anticorpo primário monoclonal (α HA-mouse-SIGMA) com relação 1:1000. A incubação do anticorpo secundário (α mouse-biotin-SIGMA) foi realizada por 1 hora. O revelado foi realizado com fosfatase alcalina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise bioinformática

Foi feito um blast da proteína por ProteinBlast para procurar os domínios EF-HAND na sequência EF-453 onde foram encontrados domínios conservados de proteínas de união ao cálcio, especificamente da superfamília EF-HAND de transdução de sinais.



Figura 01 – Proteína modelada in silico. A sequência de aminoácidos a proteína EF-453 foi modelada por I-TASSER, se mostram as hélices e os loops que apresenta a proteína, cada loop e cada hélice apresentam uma core distinta. A esfera cinza representa o Ca^{2+} .

Depois a sequência primária do gene EF-453 foi utilizada para ser analisada pelo programa I-TASSER para encontrar os domínios principais responsáveis pela união a cálcio em essa sequência de aminoácidos. O projeto I-TASSER utiliza a sequência primária de aminoácidos de uma proteína para a modelagem estrutural mais estável acordo a dois itens: similitude com proteínas cristalizadas e torção própria da estrutura.

Assim o resultado obtido da modelagem foi analisado no programa RasMol (BERNSTEIN, 2005) o qual permitiu observar os dois domínios EF-HAND na sua estrutura primária (Figura 1A). Assim foram reconhecidos encontraram-se 5 aminoácidos específicos responsáveis pela união ao cálcio nos motivos EF-HAND: E297, D286, D288, D290 e L292. Estes aminoácidos encontrados suportam os resultados encontrados nas bases de dados e o blast



realizado neste estudo. Além disso, concordam quase todos com os ligandos monodentados típicos na união a cálcio nas proteínas EF-HAND (YANYI et al., 2011). Com os resultados obtidos do blast e da modelagem foi realizado o desenho dos primiers para a amplificação por PRC, cada um deles com uma sequência de reconhecimento para uma enzima de restrição, estes resultados estão presentes na Tabela 1.

Tabela 01 – Sequência dos primers sentido e anti-sentido para amplificar o gene EF-453. Em preto se mostra a sequência para as enzimas de restrição.

Primer	sequencia	Tamanho (pb)
Ef453s	5'GGATCCATGACATCTCTGGGTGCCA3' (BamHI)	1.362
Ef453as	5'GCGGCCGCTAGACCTCAAAGGCA3' (NotI)	

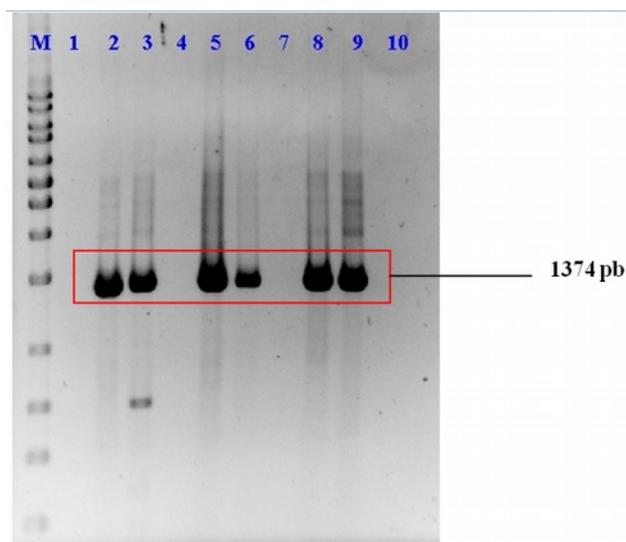


Figura 02 – Padronização das condições da PCR para EF-453. M. marcador 1 Kb, 1. Produto de PCR 1 mM de Mg²⁺ a 55 °C, 2. Produto de PCR 2 mM de Mg²⁺ a 55 °C, 3. Produto de PCR 3 mM de Mg²⁺ a 55 °C, 4. Produto de PCR 1 mM de Mg²⁺ a 58 °C, 5. Produto de PCR 2 mM de Mg²⁺ a 58 °C, 6. Produto de PCR 3 mM de Mg²⁺ a 58 °C, 7. Produto de PCR 1 mM de Mg²⁺ a 60 °C, 8. Produto de PCR 2 mM de Mg²⁺ a 60 °C, 9. Produto de PCR 3 mM de Mg²⁺ a 60 °C, 10. Controle negativo.

Para iniciar os procedimentos de amplificação foi realizada a padronização da T_m e da concentração de Mg²⁺. Assim, as temperaturas T_m avaliadas foram 55, 58 e 60 °C; as concentrações usadas para a padronização foram 1, 2 e 3 mM de Mg²⁺. Como se pode evidenciar na Figura 2, as condições ótimas para a amplificação por PCR foram a 58 °C de T_m e 2 mM de Mg²⁺.

3.2. Clonagem em pGEMT- easy e Sub Clonagem em pTubN

Para a clonagem do gene EF-453 foi selecionado o vetor comercial pGEM-T o qual facilita a clonagem dos produtos de PCR pois possui um sítio linearizado no sítio EcoRV e apresenta uma sequência de timinas nos extremos 3' a qual é complementar com a sequência de adeninas que deixa a taq polimerase nos produtos de PCR (Figura 3A). O gene foi amplificado com as condições estandardizadas, este produto se purificou e se ligou no vetor pGEM-T.

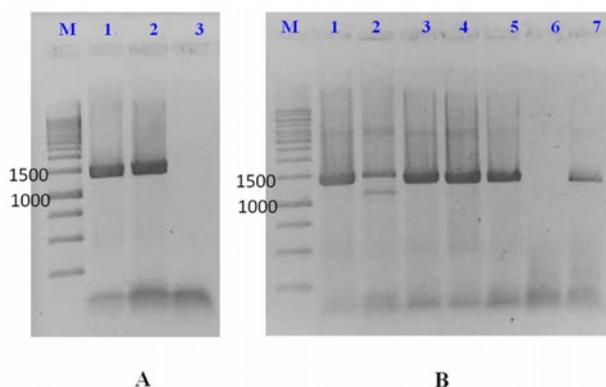


Figura 03 – 3A_ Amplificação por PCR de EF-453. Eletroforese em agarose tingida co bromuro de etídio. M. marcador 1Kb. 1 e 2. Produto de PCR sobre DNA genômico. 3. Controle negativo, reação de PCR sem DNA. Figura 3B_ Rastreio de colônias EF-453-pGEM-T. M. Marcador 1 Kb. 1-5. Produto de PCR sobre as colônias 1-5. 6. Controle negativo sem DNA. 7. Controle positivo sobre DNA genômico de *G. intestinalis*

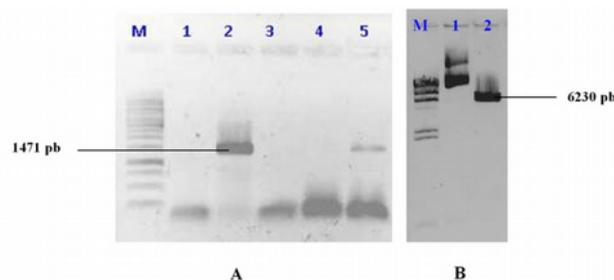


Figura 04 – 4A_ PCR rastreio de colônias positivas de EF-453-pTub-N. M. marcador 1Kb, 1. colônia 1, M. Marcador de tamanho. 1-3. Produto de PCR sobre as colônias 1-3. 4. controle negativo sem DNA de colônia. 5. controle positivo sobre DNA genômico de *G. intestinalis*. Figura 4B_ Linearização de EF-453pTub-N. M. marcador λ HindIII, 1. Plasmídeo EF-453pTub-N extraído por lise alcalina, 2. linearização de EF-453pTub-N cortado com BamHI.

A reação de ligação foi utilizada para transformar células competentes JM 109 de *E. coli* por choque térmico. Logo as colônias que cresceram no meio sólido de seleção (LB/ampicilina/IPTG/XGAL) foram rastreadas por PCR para confirmar a presença do plasmídeo recombinante EF-453-pGEM-T (Figura



3B). Isolou-se uma colônia positiva em meio líquido (LB/ampicilina) e se extraiu DNA (plasmídeo) o qual foi digerido junto com o plasmídeo pTubN com as enzimas BamHI e NotI.

O vetor e o inserto foram purificados e ligados. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias competentes TOP 10 de *E. coli* por choque térmico. As colônias que cresceram foram rastreadas por PCR com primers específicos (Figura 4A). Foi selecionada uma colônia positiva, se cresceu em meio líquido LB/AMP e se realizou uma extração de plasmídeo por lise alcalina. O plasmídeo recombinante EF-453-pTubN foi digerido com a enzima BamHI para verificar o êxito da clonagem (Figura 4B). Além disso, o plasmídeo foi sequenciado com tecnologia SANGER, o qual verificou que a subclonagem foi exitosa.

3.3. Transfecção do plasmídeo EF-453-pTubN em trofozoítos WB de *Giardia intestinalis*

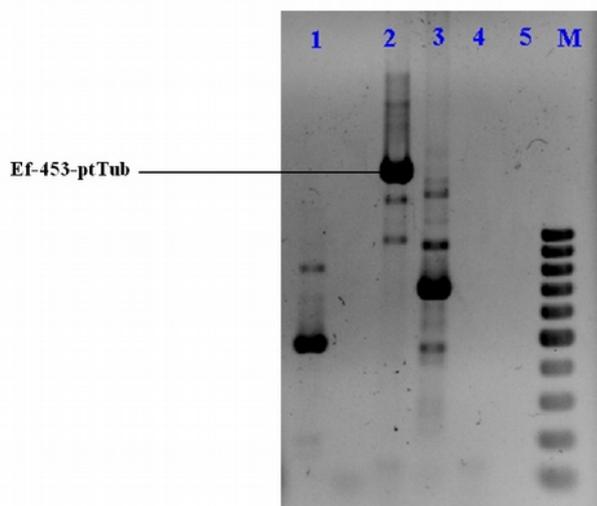


Figura 05 – PCR sobre DNA genômico extraído de transfectantes 453. Carril 1: amplificação de DNAg de transfectantes 892, Carril 2: Amplificação de DNAg de transfectantes 453, Carril 3: Amplificação de DNAg de transfectantes 764, Carril 4: Amplificação de DNAg de WB, Carril 5: controle negativo, Carril M: marcador 100 pb.

O plasmídeo recombinante EF-453-pTubN foi utilizado para transfectar trofozoítos de *Giardia intestinalis* da cepa WB. Depois de 15 dias de obter uma linha de parasitas transfectantes resistentes a puromicina, foi extraído DNA genômico para fazer uma PCR e verificar que realmente o plasmídeo EF-453-pTubN se acoplou ao genoma e não foi a nível episomal (Figura 5). A transfecção foi estável e não

transitória porque expressou a proteína depois de um longo período de cultivo em presença de puromicina (DAVIS-HAYMAN; NASH, 2002; SU et al., 2007). Assim, se obteve uma linha de parasitas transfectantes estável.

3.4. Detecção da proteína 453 por western blot

O vetor de expressão pTubN produz uma proteína recombinante como um tag de HA, o que permite que seja detetada num extrato completo de frecoes solúvel e insolúvel usando um anticorpo comercial contra HA (Anti-HA, SIGMA). Porem se realizou um ensaio de western blot sobre parasitas completos transfectantes EF-453, parasitas PCD (controle positivo) e de parasitas WB (controle negativo).

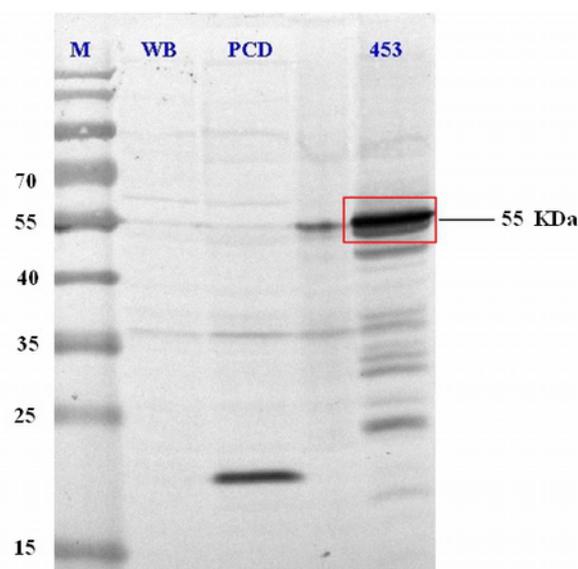


Figura 06 – Detecção da proteína EF-453 em parasitas completos. Carril M: marcador pré-tingido, Carril WB: parasitas completos WB, Carril PCD: controle positivo, parasitas completos de transfectantes PCD, Carril 453: parasitas completos de transfectantes 453. Membrana revelada com α HA-mouse.

Como pode ser observado na Figura 6, se obteve um sinal esperada em uma banda de 55 KDa nos parasitas transfectados EF-453, dos quais 52 KDa pertencem á proteína e 3 KDa ao tag de HA. Este ensaio confirmou que a entrada do inserto-vetor foi correta e que a proteína foi expressa.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise bioinformática



mostraram que a sequência primária da proteína 453 obtida por bases de dados e modelada in silico apresenta dois motivos EF-HAND e aminoácidos típicos no loop. Também foi possível clonar a sequência EF-453 em um vetor de clonagem e subclonar em um vetor de expressão para *Giardia*

intestinalis. Por fim, foi possível confirmar a sobre-expressão da proteína EF-453 em trofozoítos do parasita mediante ensaios de imunodeteção.

Agradecimento

À Fundación Banco de la República de Colombia pelo apoio financeiro do projeto.

Cloning and overexpression of a gene that codifies for calcium binding protein in *Giardia intestinalis*

Abstract – Calcium binding EF-HAND proteins have an important role in signal transduction pathways that allow eukaryotic cells adjust to an extracellular environment. *Giardia intestinalis* is recognized to be an excellent model to study signalization pathways because the simple molecular machinery. The objective of this work was study a gene that codifies for a possible EF-HAND calcium binding protein. Gene was cloning and EF-453 protein was expressed in parasite. Bioinformatic analyses were performed in I-TASSER software. The gene was amplified by PCR whit designed primers (5'ATGACATCTCTGGGTGCCA3' e 5'CTAGACCTCAAAGGCAA3') and was cloning in pTubN expression vector (have a HA tag and a puromicin resistance gene) using E. coli TOP 10. Transfection was done with recombinant plasmid in *Giardia intestinalis* trophozoites by electroporation. Then, parasites with puromicine resistance were selected. Over expression of EF-453 protein was confirmed by western blot essays and a protein detection with 55 KDa with a anti HA antibody.

Keywords: *Giardia intestinalis*. calcium binding proteins. EF-HAND motif. recombinant technology.

REFERÊNCIAS

- BERNSTEIN, H. J. **RasMol Stevenage**, Hertfordshire, UK, 2005. Disponível em: <<http://www.openrasmol.org/Copyright.html>>. Acesso em: 31 ago. 2013
- CARAFOLI, E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1115–1122, 2002.
- CASTILLO-ROMERO, A. et al. Participation of Actin on *Giardia lamblia* Growth and Encystation. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 1–11, 2009.
- CHAZIN, W. J. Relating Form and Function of EF-hand Calcium Binding Proteins NIH Public Access. **Acc Chem Res.**, v. 44, n. 3, p. 171–179, 2012.
- CLAPHAM, D. E. Calcium Signaling Review. **Cell**, v. 80, p. 259–268, 1995.
- DAVIS-HAYMAN, S.; NASH, T. Genetic manipulation of *Giardia lamblia*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 122, p. 1–7, 2002.
- ELVIRA, M.; MORA, A. **Estudio de la expresión de calmodulina y detección de posibles cambios en transducción de señales durante los dos procesos de diferenciación del parásito *Giardia intestinalis***. 2009.
- EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. A review of laboratory-based methods to investigate second messengers in low-level laser therapy (LLLT). **Medical Laser Application**, v. 24, n. 3, p. 201–215, ago. 2009.
- GIARDIADB.ORG. **GiardiaDB:** gene GL50803_17157 (Phosphatase subunit gene g4-1). Disponível em: <http://giardiadb.org/giardiadb/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=GL50803_17157&project_id=GiardiaDB>. Acesso em: 3 set. 2013.
- GIFFORD, J. L.; WALSH, M. P.; VOGEL, H. J. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. **The Biochemical journal**, v. 405, n. 2, p. 199–221, 15 jul. 2007.
- GROUP, Y. Z. R.; ZHANG, Y. **I-TASSER server for protein 3D structure prediction**. 2008. Disponível em:
- Syn. scy.* UTFPR, Pato Branco, v. 10, n. 1, p. 67–73, 2015.



<[http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/L-](http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/L-TASSER/output/S148998/)

[TASSER/output/S148998/](http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/L-TASSER/output/S148998/)>. Acesso em: 1 set. 2013

KONDOR, D.; VATTAY, G. Dynamics and structure in cell signaling networks: off-state stability and dynamically positive cycles. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e57653, jan. 2013.

LOURENÇO, D. et al. Proteomic analysis of the ventral disc of *Giardia lamblia*. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 41, jan. 2012.

MANNING, G. et al. The minimal kinome of *Giardia lamblia* illuminates early kinase evolution and unique parasite biology. **Genome biology**, v. 12, n. 7, p. R66, jan. 2011.

MCCORMICK, K.; BAILLIE, G. S. Compartmentalisation of second messenger signalling pathways. **Current opinion in genetics &**

development, v. 27, p. 20–25, ago. 2014.

MORRISON, H. G. et al. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Science**, v. 317, n. 5846, p. 1921–1926, 28 set. 2007.

REINER, D. S. **Cell cycle and differentiation in *Giardia lamblia***. Stockholm, Sweden.: Karolinska Institutet, 2008.

SU, L.-H. et al. Neomycin and puromycin affect gene expression in *Giardia lamblia* stable transfection. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, p. 124–135, 2007.

YANYI, C. et al. Calciomics: prediction and analysis of EF hand calcium binding proteins by protein engineering. **Sci China Chem**, v. 53, n. 1, p. 52–60, 2011.

Correspondência:

William N. Sanchez

williamsanchezluna@gmail.com, Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Recebido: 30/07/2014

Aprovado: 07/04/2015

Como citar: SANCHEZ, William N.; ALVARADO, Magda E.; WASSERMAN, Moisés. Clonagem e sobre expressão de um gene que codifica para uma proteína de união ao cálcio em *Giardia intestinalis*. **Syn. Scy. UTFPR**, Pato Branco, v. 10, n. 1, p. 67–73, jan./mar. 2015. ISSN 2316-4689 (Eletrônico). Artigos convidados da SIMTEQ 2014, Pato Branco-PR. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/synscy>>. Acesso em: DD mmm. AAAA.

DOI: “em processo de registro”

Direito autoral: Este artigo está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.