

MAURICIO SCAVASSINI PEÑA

**Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* pela técnica de “Phage Display”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Versão original

São Paulo
2012

RESUMO

PEÑA, M. S. **Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela técnica de “Phage Display**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública. Entre as muitas espécies descritas como causadoras de leishmaniose humana e animal, a *Leishmania (L.) amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana e é responsável por uma grande variação de formas clínicas. Durante o ciclo de vida da *Leishmania*, amastigotas vivem no interior de fagolisossomas presentes em células fagocíticas de hospedeiros vertebrados, enquanto promastigotas vivem no interior do vetor invertebrado. As duas formas exploraram a apoptose ou o mimetismo apoptótico como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferar no hospedeiro. Proteases intracelulares como as caspases são as principais efetoras no processo apoptótico. Metacaspases (MCAs) são formas evolutivas distantes das caspases de metazoários, presentes em protozoários, plantas e fungos, e vistas como potenciais alvos para combate dos parasitas sem prejuízo do hospedeiro. Ligantes e moduladores das metacaspases são até hoje desconhecidos. O Phage Display é uma técnica baseada na expressão de proteínas sintéticas nos capsídios de fagos, usada com o propósito de selecionar ligantes de proteínas, células ou tecidos. Produzimos a metacaspase recombinante de *Leishmania L. amazonensis* e aplicamos Phage Display para buscar peptídeos ligantes dessa enzima. Esses peptídeos permitiram identificar potenciais proteínas ligantes da MCA, como quinases e cinesinas, que fornecem informações sobre a regulação e controle de sua atividade. Futuramente testaremos se peptídeos ativadores da MCA poderão induzir apoptose do parasita e serem usados como drogas para o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. Metacaspase. Phage Display.

ABSTRACT

PEÑA, M. S. **Identification of ligands of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* metacaspase using Phage Display**. 2012. 69 p. Masters thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Leishmaniasis is considered an important public health problem. Among the many species described as causing human disease in Brazil, *Leishmania (L.) amazonensis* is an important etiologic agent of human cutaneous Leishmaniasis, causing a wide range of clinical forms. During its life cycle, *Leishmania* amastigotes live inside phagolysosomes of phagocytic cells of vertebrate hosts, while promastigotes live inside the invertebrate vector. The two forms explored apoptosis or apoptotic mimicry as ways to reduce macrophage inflammatory response and allow parasite proliferation in the vertebrate host. Intracellular proteases such as caspases are key effectors in the apoptotic process. Metacaspases (MCAs) are distant evolutionary forms of metazoan caspases found in protozoa, plants and fungi, and seen as potential targets to destroy the parasites without damage to the host. Ligands and modulators of metacaspases are so far unknown. Phage Display is a technique based on the expression of synthetic proteins in the phage capsid, and is used for selecting ligands of proteins, cells or tissues. We have produced the recombinant metacaspase of *Leishmania (L.) amazonensis* and employed Phage Display to find peptide ligands of this enzyme. These peptides led to the identification of potential binding proteins of the MCA, such as kinases and kinesin, which provide information about the regulation and control of MCA's activity. In the future we will test whether peptide activators of MCA induce apoptosis of the parasite and can be used as drugs for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. Metacaspase. Phage Display.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública. Elas representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair essa doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2007).

As formas clínicas em seres humanos são geralmente classificadas como leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC), conjuntamente chamadas de tegumentares, e leishmaniose visceral (LV) (REITHINGER et al., 2007). A forma clínica da doença depende tanto da espécie do parasita quanto da resposta imune do hospedeiro (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

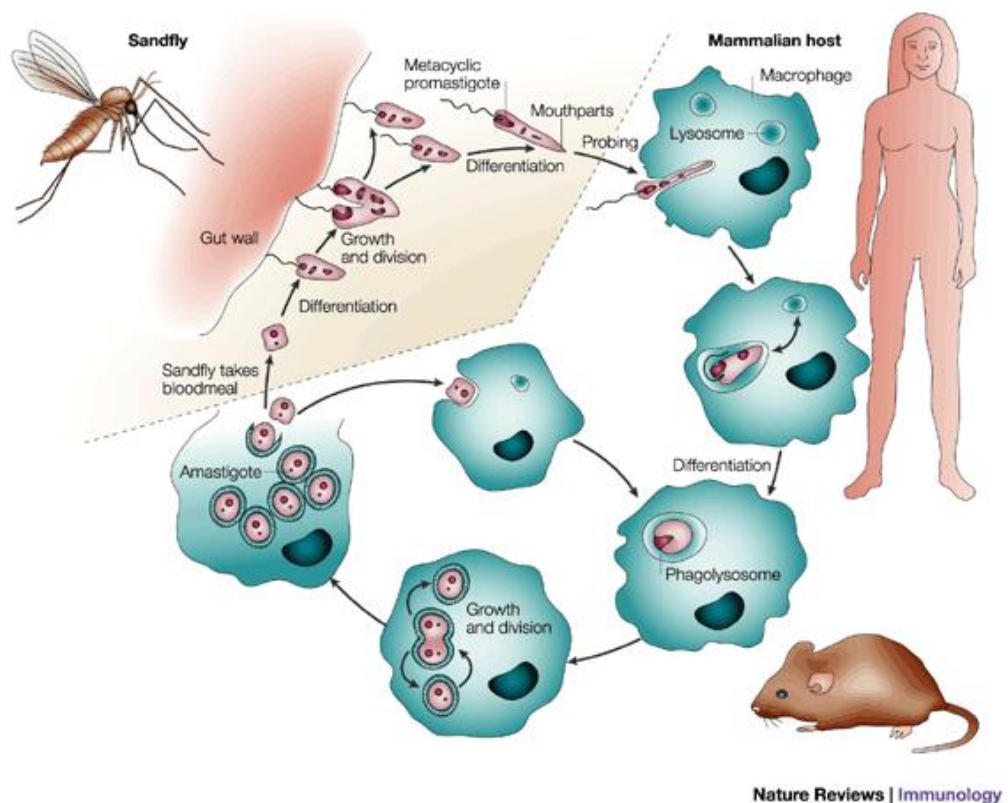
Dentre as manifestações cutâneas, a LCL tipicamente apresenta-se com um nódulo que sofre ulceração progressiva até se tornar uma lesão característica, e pode variar em gravidade e aspecto clínico. Essa manifestação tem uma tendência à auto-cura, embora o tempo necessário para a cura possa variar. Ao contrário, a LCD é caracterizada por múltiplos nódulos não ulcerativos que podem se espalhar para todo o corpo do paciente, normalmente não têm tendência de auto-cura e é de difícil tratamento (REITHINGER et al., 2007).

Entre as muitas espécies de *Leishmania* já descritas como causadoras de leishmaniose humana e animal, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana no Brasil (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003) e é responsável por uma grande variedade de formas clínicas (BARRAL et al., 1991). De fato, essa espécie pode causar tanto a doença localizada quanto a difusa, dependendo do sistema imune do indivíduo infectado (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Em alguns pacientes a LCL pode evoluir para uma ausência de resposta celular específica (anergia) a antígenos de *Leishmania*, o que permite a acentuada proliferação dos parasitos e a disseminação da infecção que caracteriza a rara leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BRASIL, 2007). *Leishmania (L.) amazonensis* parece ter uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a geração de uma resposta imune efetiva (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

1.2 A sobrevivência da *Leishmania* no macrófago

Durante o ciclo de vida a *Leishmania* tem duas formas: amastigota intracelular e sem flagelo externo e promastigota flagelada e extracelular. Os amastigotas vivem no interior de fagolisossomas de células fagocíticas de hospedeiros vertebrados, especialmente monócitos e macrófagos, e são ingeridos pelos vetores invertebrados flebotomíneos fêmeas durante seu repasto de sangue infectado. Nestes insetos hematófagos, o parasita desenvolve uma complexa série de modificações morfológicas, tornando-se promastigotas (figura 1) (SHAHA, 2006).

Figura 1-Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da leishmaniose



Fonte: (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002)

A sobrevivência do amastigota no interior do macrófago é uma questão extremamente importante na patogênese da leishmaniose, já que esta célula apresenta mecanismos eficazes para o combate a parasitas, como a produção de NO e espécies reativas de oxigênio (MILLS et al., 2000). Os macrófagos apresentam grande diversidade, e dois subtipos extremos respondem de forma bastante diferente à infecção por *Leishmania*: macrófagos M1, bons

produtores de NO, que combatem mais eficientemente o parasita do que os M2, que sob estímulo produzem pouco NO (MILLS et al., 2000). De fato, macrófagos M2 são considerados supressores ou “alternativamente ativados” por inibirem a geração de produtos pró-inflamatórios (GORDON, 2001).

Além de combaterem organismos invasores, os macrófagos realizam a fagocitose de células apoptóticas, que tem sido sugerida como um processo silencioso de remoção de células sem a produção de mediadores inflamatórios (FADOK et al., 1998). De fato, a fagocitose de células apoptóticas pelos macrófagos leva ao aumento de TGF β e à redução de TNF α e de várias quimiocinas, suprimindo assim a resposta inflamatória (MCDONALD et al., 1999).

Parasitas do gênero *Leishmania* exploraram a apoptose como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferarem no hospedeiro (SHAHA, 2006). A presença de promastigotas em apoptose expondo fosfatidilserina (PS) no inóculo leva à produção de TGF β , que inibe a atividade inflamatória do macrófago colaborando para a sobrevivência dos parasitas não apoptóticos e para a patogênese da leishmaniose (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). De fato, um inóculo de promastigotas viáveis sem exposição de PS não minimiza a produção de NO pelo macrófago e com isto os parasitas são destruídos, não havendo multiplicação de amastigotas e progressão da doença (WANDERLEY et al., 2009).

Além dos promastigotas, amastigotas também são capazes de suprimir a resposta inflamatória, induzindo secreção de TGF β e reduzindo a produção de NO (WANDERLEY et al., 2006). Esse efeito é devido à exposição de fosfatidilserina (PS) na membrana do amastigota, que ao contrário do promastigota, não entra em apoptose. Esse processo foi denominado de mimetismo apoptótico por apresentar um dos fenótipos característicos da apoptose sem estar obrigatoriamente relacionado à morte celular (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). Nos promastigotas a exposição de PS está associada à apoptose e portanto leva obrigatoriamente a morte celular (WANDERLEY et al., 2009).

1.3 Apoptose

A apoptose é o tipo mais comum de morte celular programada, sendo caracterizada por eventos como redução do tamanho da célula, exposição de fosfatidilserina (PS), aparecimento de extrusões da membrana plasmática, fragmentação do DNA e formação de

corpos apoptóticos (KROEMER et al., 2005). Análises bioquímicas tais como de fragmentação do DNA não devem, porém, ser usadas para definir a apoptose, porque este tipo de morte celular pode ocorrer sem a formação do DNA oligonucleosomal (SHAHA, 2006).

Estudos sobre a apoptose revelaram que as proteases intracelulares são as principais efetoras neste processo (LI; YUAN, 2008). Os primeiros estudos apontam para a importância das caspases (cisteino aspartato proteases) como mediadores da fase de execução da apoptose (FRITZ et al., 2006; GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999; MIURA et al., 1993; ZOU et al., 1997). Caspases podem ser classificadas com base nas suas conhecidas funções principais em duas subfamílias: caspases pró-apoptóticas e caspases pró-inflamatórias. Caspases pró-apoptóticas (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) são conhecidas por serem principalmente envolvidas na mediação da morte celular e pela produção de sinalizadores, enquanto que as pró- inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11, -12) regulam a maturação de citocinas durante a inflamação. A ativação das caspases pró-inflamatórias pode também induzir a apoptose (LI; YUAN, 2008).

Promastigotas de *Leishmania* são expostos a mudanças de temperatura durante o ciclo de vida, variando desde a temperatura no interior do vetor invertebrado (22-28 °C) até a temperatura do hospedeiro mamífero (34-37 °C). Quando expostos a temperaturas próximas às do hospedeiro mamífero esses promastigotas apresentam características ultra-estruturais e moleculares típicas de células que morrem por apoptose (ALZATE et al., 2007; MOREIRA et al., 1996; WANDERLEY et al., 2006). Outros estímulos também podem induzir a apoptose em *Leishmania*, como Miltefosina, originalmente desenvolvida como uma droga anticâncer e posteriormente introduzida com sucesso como tratamento de leishmaniose visceral causada por *Leishmania (L.) donovani* na Índia, (PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004), Curcumina, um composto de polifenóis reconhecido como uma promissora droga anticâncer (DAS, R. et al., 2008), peróxido de hidrogênio (DAS; MUKHERJEE; SHAHA, 2001) e Estaurosporina, um inibidor de proteínas quinases (SHAHA, 2006). Apesar de se aceitar que a apoptose encontrada nesses parasitas seja semelhante à descrita para mamíferos (ALZATE et al., 2007; ARNOULT et al., 2002; MOREIRA et al., 1996), pouco foi elucidado sobre as vias e as proteínas envolvidas. Comparações entre genomas revelaram que a grande maioria das proteínas (especialmente as da via Bcl-2/Bax) envolvidas na apoptose de mamíferos aparentemente não são codificadas no genoma de *Leishmania* ou de outros protozoários relacionados (IVENS et al., 2005).

1.4 Metacaspases

Metacaspases (MCAs) são formas evolutivas distantes das caspases de metazoários que foram identificadas a partir de análises da seqüência de caspase e parecem estar restritas às plantas, fungos e protozoários (AMBIT et al., 2008). São cisteíno peptidases do clã CD, família C14 (AMBIT et al., 2008). Em termos de seqüência, MCAs tem pouca similaridade com as caspases, mas predições de estrutura secundária indicam dobramentos similares a caspase-3 e caspase-1 (UREN et al., 2000). Outra semelhança com as caspases é a presença da subunidade p20 e da díade catalítica histidina/cisteína (H/C) conservada em todas as caspases (UREN et al., 2000).

Em termos de função e atividade observam-se grandes diferenças entre MCAs e caspases: enquanto caspases têm especificidade por substratos com um ácido aspártico na posição P1, MCAs de plantas (VERCAMMEN et al., 2004) e de *Leishmania* (GONZALEZ et al., 2007) têm especificidade por substratos com arginina/ lisina. arginina.

A composição de aminoácidos das MCAs tem permitido classifica-las em dois grupos principais: MCAs tipo I, que contem dominos ricos em prolinas, e MCAs tipo II, que carecem dos dominios de prolinas mas contem uma inserção de aproximadamente 200 aminoácidos no C-terminal da subunidade p20 (VERCAMMEN et al., 2004). Semelhante às caspases, algumas MCAs de plantas, fungos e parasitas do gênero *Leishmania* requerem um auto processamento para se tornarem ativas (GONZALEZ et al., 2007; MADEO et al., 2002; VERCAMMEN et al., 2004). Desde sua descoberta há cerca de 10 anos, verificou-se que MCAs não são apenas responsáveis por eventos de morte celular, mas também podem regular outros processos celulares.

1.5 Metacaspases de *Leishmania*

Considerando as seqüências de MCA dos tripanosomatídeos com o genoma completamente seqüenciado, MCA de *Leishmania* mostra maior identidade com MCA de *Trypanosoma brucei* 5 (52%) e de *Trypanosoma cruzi* 5 (61%), organismos que possuem 5 e 17 genes de MCA, respectivamente. O significado desta identidade dentro da família dos tripanosomatídeos não é bem conhecido (LEE et al., 2007). Em *Trypanosoma brucei* existem 5 MCAs, e a expressão da MCA4 em células de *Saccharomyces cerevisiae* nas quais o gene MCA endógeno havia sido deletado produziu manifestações fenotípicas tais como retardo do

crescimento, disfunção mitocondrial e morte clonal (SZALLIES; KUBATA; DUSZENKO, 2002). Esta MCA4 foi localizada no núcleo de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo que a proteína poderia controlar a transcrição de genes, afetando a biogênese mitocondrial. (SZALLIES et al., 2002), sendo por isso fundamental para o ciclo de vida. Já em *Leishmania (L.) major* a MCA foi localizada em diferentes compartimentos intracelulares dependendo da fase do ciclo celular do parasita: foi encontrada em vesículas citoplasmáticas durante a intérfase e associada ao cinetoplasto e núcleo durante a mitose (AMBIT et al., 2008). Curiosamente, o peptídeo sinal N-terminal da MCA de *Leishmania (L.) major* tem uma sequência para localização mitocondrial que foi confirmada pela expressão do fragmento em fusão com uma proteína GFP (GONZALEZ et al., 2007; ZALILA et al., 2011).

Em *Leishmania (L.) major* foi demonstrado que a MCA é expressa tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas (AMBIT et al., 2008). Tentativas de gerar formas promastigotas com deleção do gene de MCA foram falhas, sugerindo que este gene é essencial para a sobrevivência do parasita (AMBIT et al., 2008). De fato, com o aumento de sua expressão em promastigotas de *Leishmania (L.) major* ocorre um atraso significativo no crescimento dos parasitas, bem como defeitos na citocinese e geração de parasitas com ploidias anômalas (AMBIT et al., 2008).

A MCA de *Leishmania* apresenta uma região carboxi-terminal com domínio rico em prolina, também encontrada em uma das MCAs de *T. cruzi* (*T. cruzi* metacaspase-5) (KOSEC et al., 2006). O papel deste domínio rico em prolina é desconhecido, mas sua presença em algumas MCAs sugere que possa estar envolvido na interação entre proteínas. Além disso, a MCA pode sofrer um processo de auto clivagem similar o que ocorre em caspases de mamíferos (EARNSHAW; MARTINS; KAUFMANN, 1999), que pode contribuir para o aumento de sua capacidade catalítica (GONZALEZ et al., 2007).

Leishmania (L.) major, uma das responsáveis pela leishmaniose cutânea, possui no genoma apenas um gene de MCA (www.genedb.org). Por outro lado, *Leishmania (L.) donovani*, uma das espécies responsáveis pela leishmaniose visceral, apresenta duas MCAs. Em *Leishmania (L.) donovani* a diferença entre as duas MCAs, denominadas MCd1 e MCd2, é a presença de dois aminoácidos na região carboxi-terminal da MCd1, que resulta em um domínio rico em prolina um pouco maior (LEE et al., 2007). Nessa espécie a expressão do mRNA de MCd1 foi significativamente maior em amastigotas axênicas do que em promastigotas. Tal aumento poderia explicar os níveis mais elevados de atividade “tripsina-like” em amastigotas, sugerindo que essa proteína desempenha um papel mais importante na fase parasitária de mamíferos do que na fase do inseto vetor (LEE et al., 2007). Quando

silenciado, o gene de MCd1 leva o promastigota a um quadro de estresse fisiológico, interrupção no ciclo celular e morte celular programada, assim demonstrando que mesmo apresentando duas MCAs, a *Leishmania (L.) donovani* não sobrevive sem MCd1 (RAINA; KAUR, 2012). Ao contrário do observado para MCA de *Leishmania (L.) major*, as MCd1 e MCd2 não sofrem auto processamento nem mesmo após a indução de morte celular programada por peróxido de hidrogênio, e podem ser localizadas em vesículas citoplasmáticas tanto em formas promastigotas quanto em formas amastigotas axênicas (LEE et al., 2007).

O efeito do estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio como ativador de MCA foi demonstrado em uma complementação funcional de *Saccharomyces cerevisiae* mutante nula para MCA e complementada com a MCA de *Leishmania (L.) major* (LmjMCA) (GONZALEZ et al., 2007). Essa levedura mutante era mais resistente ao estresse oxidativo do que a levedura selvagem, e ela recuperou a sensibilidade ao tratamento e a exposição de fosfatidilserina (PS) quando complementada com MCA de *Leishmania (L.) major*, sendo esta recuperação dependente da atividade catalítica desta enzima (GONZALEZ et al., 2007). Recentemente foi mostrado que Miltefosina induz a morte celular com características de apoptose e a superexpressão de MCA em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (KHADEM VATAN; GHARAVI; SAKI, 2012). O envolvimento da MCA na apoptose foi reforçado pelos achados de que a exposição a peróxido de hidrogênio é mais letal em *Leishmania (L.) donovani* que superexpressa uma de suas duas MCAs (LEE et al., 2007) e a exposição de fosfatidilserina (PS) é maior em *Leishmania (L.) major* que superexpressa a região catalítica da MCA (ZALILA et al., 2011). Tentativas de gerar uma *Leishmania* mutante nula para MCA foram inviáveis mesmo em *Leishmania (L.) donovani* que contem duas MCAs (AMBIT et al., 2008; RAINA; KAUR, 2012), sugerindo que o gene é essencial para o parasita.

Estes resultados sugerem que MCA pode ter mais de uma função em diferentes compartimentos celulares e que tem um papel importante no ciclo celular (GONZALEZ, 2009). Além disso, mostram que agentes químicos podem modificar o perfil de expressão ou a atividade catalítica da MCA em *Leishmania*.

Nenhum estudo sobre MCA foi publicado especificamente para *Leishmania (L.) amazonensis*. O genoma dessa espécie apresenta um único gene de MCA com 99% de similaridade com o gene de *Leishmania (L.) mexicana*, 93% com *Leishmania (L.) donovani*, 92% com *Leishmania (L.) major*, 92% com *Leishmania (L.) chagasi*, 91% com *Leishmania (L.) infantum* e 85% com *Leishmania (V.) braziliensis* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) (NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2012).

A presença de MCAs em *Leishmania* e em outros protozoários parasitas como *T. cruzi* e *Plasmodium*, mas não em seus hospedeiros vertebrados, impulsiona o estudo dessas proteínas e de suas vias de ativação com a perspectiva de identificação de potenciais novas drogas (GONZALEZ et al., 2007).

1.6 A técnica de Phage Display

O Phage Display é uma técnica baseada na expressão de proteínas sintéticas nos capsídeos de fagos. Esses fagos tornam-se veículos de expressão que trazem a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse e tem a capacidade de se replicar. Com a utilização de Phage Display, um grande número de sequências de nucleotídeos é convertido em populações de diferentes peptídeos e proteínas que podem ser selecionados para as propriedades desejadas (WILLATS, 2002).

A técnica de Phage Display foi usada pela primeira vez em 1985 por Smith. Utilizando essa técnica, sequências de DNA de interesse ou aleatórias são inseridas no genoma de um fago filamentosso de tal forma que a proteína codificada é expressa em fusão com proteínas do capsídeo do fago, por exemplo com a proteína III (GUO et al., 2010). Os fagos ou bacteriófagos são vírus que infectam uma variedade de bactérias GRAM negativas usando o pilus sexual como receptor. As partículas de bacteriófagos filamentosos das linhagens M13 f1 e fd, que infectam *Escherichia coli* via pilus F, consistem em uma fita simples de DNA envolta por uma cápsula protéica. Um bacteriófago viável expressa aproximadamente 2700 cópias da proteína codificada pelo gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 aminoácidos) e de 3 a 5 cópias do gene 3 (p3 ou pIII, proteína de 406 aminoácidos) (MACDOUGALL; BEIGHTON; RUSSELL, 1991), além de outras proteínas.

Existem três tipos principais de bibliotecas de Phage Display, cujos produtos expressos no fago são proteínas, anticorpos ou peptídeos (WILLATS, 2002). O isolamento de sequências baseado na afinidade de ligação do fago a uma molécula (seleção sobre um alvo imobilizado), célula ou tecido alvo é feita por um processo de seleção geralmente feito *in vitro* denominado *Biopanning* (BENHAR, 2001; PARMLEY; SMITH, 1988). Por essa triagem, bibliotecas de fagos são expostas a alvos de interesse a fim de seletivamente capturar fagos aderidos. Ao longo de sucessivas adesões, lavagens, eluições e ampliações, a população de fagos é cada vez mais seletiva em relação ao alvo em questão (WILLATS, 2002).

O Phage Display tem sido utilizado para diversos fins: identificação de interações proteína-ligante, incluindo a seleção de agonistas e antagonistas, definição de epitopos de anticorpos monoclonais, seleção de substratos ou inibidores de enzimas, aprimoramento das propriedades de enzimas, seleção de alvos para a inibição de angiogênese tumoral, desenvolvimento de vacinas e identificação de candidatos a drogas ou alvos específicos para entrega de drogas para diversas doenças, incluindo as infecciosas (KURZEPA et al., 2009). Este método tem várias vantagens: o elevado número de proteínas que podem ser expressas, a alta flexibilidade, a possibilidade de realizar a seleção *in vitro* e *in vivo*, e até mesmo sobre moléculas inorgânicas. Além disso, a técnica é eficaz, rápida, barata, fácil de controlar, e não requer equipamentos especiais (KURZEPA et al., 2009).

As bibliotecas normalmente usadas para identificação de ligantes de proteínas são as bibliotecas de peptídeos. Peptídeos selecionados contra um alvo particular têm um papel na identificação do motivo necessário para ligação (STEVENS et al., 1988) e do ligante natural desse alvo. A seleção sobre uma proteína específica tem como intuito encontrar reguladores ou ligantes deste alvo (PETTER et al., 2008), sobre uma célula, encontrar marcadores específicos (GALILI; DEVEMY; RAZA, 2008; HSIUNG et al., 2008), e sobre um tecido *ex vivo* (BIDLINGMAIER et al., 2009) ou *in vivo* (HOUSTON et al., 2001), encontrar marcadores para diagnóstico ou tratamento.

A probabilidade de se encontrar um ligante em uma biblioteca de peptídeos é uma função da afinidade pela molécula selecionada, havendo normalmente uma grande chance de se identificar bons ligantes (CORTESE et al., 1995). A identificação de peptídeos ligantes de uma proteína essencial para um organismo, por exemplo uma enzima, permite entender os mecanismos de regulação de sua atividade e fornece potenciais formas de controle da viabilidade desse organismo.

Neste projeto nos propomos a aplicar a técnica de Phage Display com bibliotecas de peptídeos para identificar ligantes da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis*. Os achados deverão fornecer informações sobre a complexa regulação da apoptose nesses protozoários, e possíveis ativadores da MCA poderão eventualmente ser usados como drogas para indução da morte do parasita sem efeitos colaterais para o hospedeiro vertebrado.

1.7 Phage Display e metacaspase de *Leishmania (L.) amazonensis*

A metacaspase é uma proteína essencial em *Leishmania* que participa de processos importantes como divisão celular e apoptose. A participação dessa enzima nos diferentes processos deve depender do contexto celular, o qual pode afetar sua localização, processamento, e/ou ligação a fatores que regulam sua atividade catalítica. Esses fatores não são conhecidos, e sua identificação contribuirá para entendermos mecanismos que determinam sobrevivência ou morte do parasita. Além disso, a presença da metacaspase em *Leishmania* mas não em seus hospedeiros vertebrados a torna um alvo de estudo com a perspectiva de identificação de potenciais novas drogas. (GONZALEZ et al., 2007).

Neste projeto buscamos analisar a relação entre a atividade da metacaspase e a morte de *Leishmania (L.) amazonensis* por choque térmico. Além disso, clonamos e expressamos a metacaspase recombinante dessa espécie, a qual foi usada para busca de ligantes pela técnica de Phage Display com bibliotecas de peptídios. Os potenciais ligantes dessa proteína devem fornecer informações sobre a complexa regulação da apoptose nesses protozoários, e poderão eventualmente ser usados para produzir indutores da morte do parasita sem efeitos colaterais para o hospedeiro vertebrado.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste projeto mostramos que o choque térmico a 37 °C aumentou a atividade da metacaspase de *Leishmania (L) amazonensis*, embora não tenha alterado a expressão e o processamento desta proteína. Esses dados sugerem que esse estímulo afeta a atividade da enzima por um mecanismo independente de sua tradução e processamento.

Nós clonamos e expressamos a metacaspase de *Leishmania (L) amazonensis* em sistema bacteriano e identificamos um padrão de processamento semelhante ao encontrado em extratos de promastigotas do parasita. A enzima recombinante foi usada para busca de ligantes por Phage Display utilizando uma biblioteca de peptídios. Dentre os potenciais ligantes identificados por comparação com bancos de dados de proteínas de *Leishmania* encontramos diversas quinases e a proteína cinesina. Quinases participam da metaciclógênese do parasita e da autofagia resultante da falta de nutrientes. Dezenas de genes de cinesinas foram identificados no genoma de *Leishmania*, e já foi descrita a participação dessas proteínas na divisão celular do parasita, formação flagelar, tráfico e reorganização do citoesqueleto. A conhecida participação da metacaspase de *Leishmania* em processos de divisão celular e apoptose corrobora nossos achados de quinases e cinesinas como seus potenciais ligantes e possivelmente reguladores.

Temos como perspectivas produzir peptídeos sintéticos correspondentes às sequências de quinases e cinesinas identificadas como ligantes da MCA. Esses peptídeos serão usados em experimentos de choque térmico com promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* para verificar sua participação na modulação da atividade da MCA. Além disso, pretendemos analisar se esses peptídeos afetam a morte celular e o processamento da metacaspase.

REFERÊNCIAS*

- ALZATE, J. F. et al. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. **Apoptosis**, v. 11, n. 2, p. 161-171, 2006.
- ALZATE, J. F. et al. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 152, n. 2, p. 192-202, 2007.
- AMBIT, A. et al. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differ.**, v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.
- ARNOULT, D. et al. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death Differ.**, v. 9, n. 1, p. 65-81, 2002.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, n. 1, p. 1-33, 2001.
- BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem. Biophys.**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BESTEIRO, S. et al. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 16, p. 11384-11396, 2006.
- BHATTACHARYA, A.; BISWAS, A.; DAS, P. K. Role of intracellular cAMP in differentiation-coupled induction of resistance against oxidative damage in *Leishmania donovani*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, n. 5, p. 779-794, 2008.
- BIDLINGMAIER, S. et al. Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma. **Cancer Res.**, v. 69, n. 4, p. 1570-1577, 2009.
- BLAINEAU, C. et al. A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 9, p. 778-782, 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, 2007.
- CASTILLA, J. J. et al. Leishmania donovani: in vitro culture and [1H] NMR characterization of amastigote-like forms. **Mol. Cell Biochem.**, v. 142, n. 2, p. 89-97, 1995.
- CORTESE, R. et al. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6, n. 1, p. 73-80, 1995.
- CUTLER, N. S. et al. The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, n. 12, p. 4103-4113, 2001.
- DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 114, pt. 13, p. 2461-2469, 2001.
- DAS, R. et al. WITHDRAWN:Curcumin, a dietary polyphenol, emerges as a novel inhibitor of DNA topoisomerase I of kinetoplastid parasite Leishmania donovani. **Biochem. J.**, v. 13, p. 879-882, 2008.
- DE FREITAS BALANCO, J. M. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 23, p. 1873, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 9, p. 692, 2004.
- DURRENBERGER, F.; WONG, K.; KRONSTAD, J. W. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in Ustilago maydis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 10, p. 5684-5689, 1998.
- EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 383-424, 1999.
- EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **CLUSTALW**. Disponível em: <<http://ebi.ac.uk/clustalw>>. Acesso em: 4 de fevereiro 2012.
- FADOK, V. A. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 7, p.551-562, 1998.
- FRANKE, E. D. et al. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant Leishmania promastigotes. **J. Immunol.**, v. 134, n. 4, p. 2713-2718, 1985.
- FRITZ, J. H. et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 12, p. 1250-1257, 2006.
- GALILI, N.; DEVEMY, E.; RAZA, A. Isolation of specific and biologically active peptides that bind cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). **J. Hematol. Oncol.**, v. 1, p. 8, 2008.

GERALD, N. J.; COPPENS, I.; DWYER, D. M. Molecular dissection and expression of the LdK39 kinesin in the human pathogen, *Leishmania donovani*. **Mol. Microbiol.**, v. 63, n. 4, p. 962-979, 2007.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. **Ciba Found. Symp.**, v. 119, p. 130-149, 1986.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO MDE, L. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 71-80 2003.

GONZALEZ, I. J. Metacaspases and their role in the life cycle of human protozoan parasites. **Biomedica**, v. 29, n. 3, p. 485-493, 2009.

GONZALEZ, I. J. et al. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int. J. Parasitol.** v. 37, n. 2, p. 161-172, 2007.

GORDON, J. Mononuclear phagocytes in immune defence. **Fundamental Immunol.**, v. 6, p. 162, 2001.

GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes. Dev.**, v. 13, n. 15, p. 1899-1911, 1999.

GUO, Y. et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay. **Anal Biochem.**, v. 396, n. 1, p. 155-157, 2010.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 519-526, 1998.

HOUSTON, P. et al. Homing markers for atherosclerosis: applications for drug delivery, gene delivery and vascular imaging. **FEBS Lett**, v. 492, n. 1-2, p. 73-77, 2001.

HSIUNG, P. L. et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. **Nat. Med.**, v. 14, n. 4, p. 454-458, 2008.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

KHADEM VATAN, S.; GHARAVI, M. J.; SAKI, J. Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in *Leishmania infantum*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 442-448, 2012.

KOSEC, G. et al. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 1, p. 18-28, 2006.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1463-1467, 2005.

KURZEPA, A. et al. Molecular modification of T4 bacteriophage proteins and its potential application: review. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 54, n. 1, p. 5-15, 2009.

- LEE, N. et al. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 10, p. 1745-1757, 2007.
- LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.
- MACDOUGALL, J. H.; BEIGHTON, D.; RUSSELL, R. R. Cloning and expression of protease genes from *Treponema denticola* in *Escherichia coli*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 270-274, 1991.
- MADEIRA DA SILVA, L.; BEVERLEY, S. M. Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 26, p. 11965-11970, 2010.
- MADEO, F. et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Mol. Cell**, v. 9, n. 4, p. 911-917, 2002.
- MAVRAKIS, M. et al. Depletion of type IA regulatory subunit (RI α) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. **Hum Mol. Genet.**, v. 15, n. 19, p. 2962-2971, 2006.
- MAZUMDAR, M.; MISTELI, T. Chromokinesins: multitalented players in mitosis. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n. 7, p. 349-355, 2005.
- MCDONALD, P. P. et al. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 163, n. 11, p. 6164-6172, 1999.
- MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 206-224, 2004..
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.
- MIURA, M. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 653-660, 1993.
- MOREIRA, M. E. et al. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J. Cell Physiol.**, v. 167, n. 2, p. 305-313, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST**. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 20 de março 2012.

NAULA, C. et al. Spontaneous dimerization and leucine-zipper induced activation of the recombinant catalytic domain of a new adenylyl cyclase of *Trypanosoma brucei*, GRESAG4.4B. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 112, n. 1, p. 19-28, 2001.

PARAMCHUK, W. J. et al. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 203-221, 1997.

PARIS, C. et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305-318, 1988.

PATTINGRE, S. et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. **Biochimie.**, v. 90, n. 2, p. 313-323, 2008.

PETTER, C. et al. Phage display screening for peptidic chitinase inhibitors. **J. Mol. Recognit.**, v. 21, p. 401-409 2008.

RAINA, P.; KAUR, S. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Mol. Cell Biochem.**, v. 359, n. 1-2, p. 135-149, 2012.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RENFRANZ, P. J.; BECKERLE, M. C. Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, n. 1, p. 88-103, 2002.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 233-244, 2006.

SIMAN-TOV, M. M. et al. Cloning from *Leishmania major* of a developmentally regulated gene, c-lpk2, for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 77, n. 2, p. 201-215, 1996.

SIMAN-TOV, M. M.; IVENS, A. C.; JAFFE, C. L. Molecular cloning and characterization of two new isoforms of the protein kinase A catalytic subunit from the human parasite *Leishmania*. **Gene**, v. 288, n. 1-2, p. 65-75, 2002.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

STEVENS, T. L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-258, 1988.

SZALLIES, A.; KUBATA, B. K.; DUSZENKO, M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 517, n. 1-3, p. 144-150, 2002.

THOMASON, P. A. et al. An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. **EMBO J.**, v. 17, n. 10, p. 2838-2845, 1998.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

UREN, A. G. et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Mol. Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-967, 2000.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 37, p. 13837-13842, 2006.

VERCAMMEN, D. et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 44, p. 45239-45336, 2004.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

WANDERLEY, J. L. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. **J. Immunol.**, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, 2006.

WANDERLEY, J. L. et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009

WICKSTEAD, B.; GULL, K. A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. **Mol. Biol. Cell**, v. 17, n. 4, p. 1734-1743, 2006.

WILLATS, W. G. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Mol. Biol.**, v. 50, n. 6, p. 837-854, 2002.

WILLIAMS, R. A. et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 655-674, 2006.

WORDEMAN, L. Microtubule-depolymerizing kinesins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 82-88, 2005.

ZALILA, H. et al. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. **Mol. Microbiol.**, v. 79, n. 1, p. 222-239, 2011.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death Differ.**, v. 9, n. 10, p. 1126-1139, 2002.

ZOU, H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 413, 1997.