

**YARO LUCIOLO DOS SANTOS**

**UTILIZAÇÃO DE *Kluyveromyces lactis* NA EXPRESSÃO DA GDPase  
DE *Leishmania major***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**YARO LUCIOLO DOS SANTOS**

**UTILIZAÇÃO DE *Kluyveromyces lactis* NA EXPRESSÃO DA GDPase  
DE *Leishmania major***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 21 de agosto de 2009.

---

Prof<sup>a</sup> Juliana Lopes Rangel Fietto  
(Co-Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup> Marisa Vieira de Queiroz  
(Co-Orientadora)

---

Prof Luciano Gomes Fietto

---

Prof Sérgio Oliveira de Paula

---

Prof<sup>a</sup> Flávia Maria Lopes Passos  
(Orientadora)

À dona Eleonice, pilar da minha família,  
exemplo de avó, de vida, de amor incondicional,  
de retidão, de ser humano.

*“Quero, um dia, poder dizer às pessoas que nada foi em vão... que o amor existe, que vale a pena se doar às pessoas, que a vida é bela sim, e que eu sempre dei o melhor de mim... e que valeu a pena”!*

Mário Quintana

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e a graça da saúde.

À minha família, por incentivar e apoiar todas as minhas decisões até chegar aqui. Ao meu tio Iratan e sua esposa Silvânia, pelo apoio nos primeiros momentos em Viçosa.

Ao Sr. Dirceu e sua família e ao Bento, por toda ajuda e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pelo Programa de Pós Graduação.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À minha orientadora Flávia Maria Lopes Passos, pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Às minhas co-orientadoras Marisa Vieira de Queiroz, por acreditar em mim e me apoiar, e Juliana Lopes Rangel Fietto, pela orientação, confiança, incentivo e apoio durante todo o mestrado. Ressalto aqui minha admiração e agradeço à professora Juliana pela oportunidade, que me fez crescer pessoal e profissionalmente.

Ao professor Luciano Gomes Fietto, pela sempre prestatividade e colaboração.

À minha dinha Janaína, pela dedicação, compreensão, ajuda e paciência, pelo apoio e carinho a mim devotado. Por sempre acreditar em mim nos momentos de fraqueza e nunca me deixar abater nas dificuldades enfrentadas durante essa jornada.

À minha amiga Talita, pela amizade e grande ajuda, pelos conselhos, prestatividade e incentivo.

Aos amigos e colegas do Laboratório do LIMA, em especial ao Bernardo, Bruno e Dani, pela amizade e pelos ensinamentos e auxílios.

Ao Sr. Valdir, pela boa convivência e prestatividade sempre, e aos funcionários do BIOAGRO.

Aos meus grandes amigos: Geovanni, Márcio, André, Thizay, Ricardo, Neto e Camilo, pelo incentivo constante e companheirismo.

Ao Fábio, por seus conselhos durante nossos jantares no RU, e à Aline, pela amizade e companheirismo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e não foram aqui citados, meus sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
3. Material e métodos.....	13
3.1. Plasmídeos e microrganismos.....	13
3.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	15
3.3. Amplificação e clonagem do gene da GDPase.....	15
3.4. Confirmação da clonagem do gene da GDPase no pKLAC1.....	17
3.5. Transformação da linhagem de <i>K. lactis</i> CBS 2359 com a construção pKLAC1-GDPase.....	17
3.6. Confirmação da correta integração do cassete de expressão no genoma dos transformantes.....	18
3.6.1. PCR para amplificação do gene da GDPase integrado no genoma da <i>K. lactis</i> .....	18
3.6.2. PCR para amplificação do fragmento de 1.9 kb referente ao produto de amplificação do promotor P <sub>LAC4</sub> reconstituído.....	19
3.7. Indução da expressão da GDPase.....	20
3.8. Preparação do extrato protéico.....	20
3.9. Análise da expressão da proteína recombinante.....	21
3.9.1. Análise em gel de poliacrilamida (SDS PAGE).....	21
3.9.2. Colaração por Comissie Blue.....	21
3.9.3. Análise protéica por Western Blotting.....	21
4. Resultado e discussão.....	23
4.1. Amplificação e clonagem do gene da GDPase.....	23
4.2. Transformação das cepas de <i>K. lactis</i> CBS 2359.....	28
4.3. Confirmação das cepas de <i>K. lactis</i> CBS 2359.....	32
4.3.1. PCR para GDPase integrada no genoma da <i>K. lactis</i> .....	32

4.3.2. PCR para confirmação da reconstituição do promotor P <sub>LAC4</sub> no genoma dos transformantes.....	38
4.4. Verificação da presença da GDPase de <i>L. major</i> no sobrenadante e extrato dos transformantes por Western Blotting.....	41
5. Alinhamento.....	50
6. Conclusão e perspectivas.....	52
7. Referência bibliográfica.....	55
8. Anexo.....	65

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs).....	14
<b>Figura 2:</b> Amplificação, purificação e digestão do gene da GDPase e pKLAC1.....	24
<b>Figura 3:</b> Verificação da clonagem do gene da GDPase no plasmídeo pKLAC1.....	27
<b>Figura 4:</b> Esquema da integração do cassete de expressão no genoma.....	29
<b>Figura 5:</b> Plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs).....	29
<b>Figura 6:</b> Crescimento do transformante 1 em meio seletivo.....	31
<b>Figura 7:</b> Verificação da integração do gene da GDPase no genoma da <i>K. lactis</i> .....	33
<b>Figura 8:</b> Verificação da integração do gene da GDPase no genoma da <i>K. lactis</i> .....	34
<b>Figura 9:</b> Localização da região de anelamento dos <i>primers</i> internos no gene da GDPase.....	36
<b>Figura 10:</b> Integração do gene da GDPase no genoma da <i>K. lactis</i> .....	37
<b>Figura 11:</b> Esquema evidenciando a correta integração do cassete de expressão no genoma de <i>K. lactis</i> .....	39
<b>Figura 12:</b> Verificação da reconstituição do promotor P <sub>LAC4</sub> .....	39
<b>Figura 13:</b> Verificação da reconstituição do promotor P <sub>LAC4</sub> usando temperatura em gradiente.....	40
<b>Figura 14:</b> Verificação da expressão da proteína heteróloga por sds-page e western blot do sobrenadante das culturas induzidas por 96 h.....	42
<b>Figura 15:</b> Avaliação da expressão de proteínas homólogas à GDPase de <i>L.major</i> na cepa selvagem de <i>K. lactis</i> .....	45
<b>Figura 16:</b> Avaliação da expressão de proteínas homólogas à GDPase de <i>L.major</i> no transformante de <i>K. lactis</i> n°5.....	45
<b>Figura 17:</b> Perfil eletroforético das proteínas presentes no extrato da WT com maior tempo de corrida.....	47
<b>Figura 18:</b> Perfil eletroforético das proteínas presentes no extrato do transformante n°5 com um maior tempo de corrida.....	48
<b>Figura 19:</b> Alinhamento das seqüências das apirases de <i>K. lactis</i> juntamente com as apirases de <i>L. major</i> .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ACRs</b>	Apyrase Conserved Regions
<b>ADP</b>	5'- Difosfato de adenosina
<b>ADo</b>	Adenosina
<b>AMP</b>	5'- Monofosfato de adenosina
<b>ATP</b>	5'- Trifosfato de adenosina
<b>BSA</b>	Soroalbumina bovina
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>GDP</b>	5'- Difosfato de guanosina
<b>GTP</b>	5'- Trifosfato de guanosina
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>IL-12</b>	Interleucina-12
<b>kDa</b>	Quilo Dálton
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucléico- mensageiro
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral

## RESUMO

SANTOS, Yaro Luciolo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2009. **Utilização de *Kluyveromyces lactis* na Expressão da GDPase de *Leishmania major***. Orientadora: Flávia Maria Lopes Passos. Co-orientadores: Juliana Lopes Rangel Fietto e Marisa Vieira de Queiroz.

A levedura *Kluyveromyces lactis* apresenta potencial aplicabilidade biotecnológica como hospedeira na produção heteróloga de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi expressar a proteína GDPase de *Leishmania major* em *K. lactis* para fins biotecnológicos aplicados às leishmanioses humana e canina. A GDPase de *L. major* pertence à família das E-NTPDases ou apirases, proteínas envolvidas na infectividade e virulência de parasitos. A técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi utilizada para amplificar uma seqüência de 2073 pb referente a região codificante completa da “GDPase” de *L. major*, sendo este amplicon inserido no plasmídeo pKLAC1 nos sítios *Sal I* e *Bgl II*. A construção pKLAC1-GDPase foi confirmada por PCR, linearizada pela enzima *Ahd I* e utilizada para transformação da cepa selvagem de *K. lactis* CBS 2359. Os transformantes foram selecionados em meio YCB contendo 5 mM de acetamida e cultivados sob condições de indução em batelada em meio YPGal. Extrato e sobrenadante destas culturas foram analisados por SDS-PAGE e Western Blot utilizando um anti-soro policlonal anti-GDPase de *L. major*. As análises revelaram uma única proteína de cerca de 120 kDa nas cepas selvagem e transformantes de *K. lactis*. Pesquisa no Genbank revelou a presença de dois genes homólogos a GDPase no genoma da levedura: KIGDA1 e KIYND1 que podem explicar a reatividade cruzada. Os resultados demonstram que os transformantes obtidos não produzem a GDPase de *L. major*, provavelmente devido a não reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> que dirigiria a expressão do gene da GDPase. Porém levanta as hipóteses de que a cepa selvagem possa ser testada quanto à indução da produção de anticorpos contra espécies do gênero *Leishmania* e de sinalizar que o sistema utilizado contém falhas que comprometem seu uso, devido à dependência de reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub>.

## ABSTRACT

SANTOS, Yaro Luciolo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August of 2009. **Use of *Kluyveromyces lactis* in the Expression of *Leishmania major*'s GDPase.** Adviser: Flávia Maria Lopes Passos. Co- Advisers: Juliana Lopes Rangel Fietto and Marisa Vieira de Queiroz.

The yeast *Kluyveromyces lactis* has a potential applicability as a host in biotechnological production of heterologous recombinant proteins of biotechnological interest. In this context the objective of this work was to express the protein of *Leishmania major* GDPase for biotechnology applied to human and canine leishmaniasis. The GDPase of *L. major* belongs to the family of E-NTPDases or apirases, proteins involved in infectivity and virulence of parasites. For a system of expression and secretion of heterologous proteins in *K. lactis*, the technique of polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify a sequence of 2073 bp covering the complete coding region of the GDPase "of *L. major*, which is inserted into the amplicon plasmid pKLAC1 sites in *Sal I* and *Bgl II*. The construction pKLAC1-GDPase was confirmed by PCR, linearized by the enzyme Ahd I and used for transformation of wild strain CBS 2359. The transformants were selected in YCB medium containing 5 mM acetamide induced in batch and in YPGal. Extract and supernatant of these cultures were analyzed by SDS-PAGE and Western blot using a polyclonal antiserum anti-GDPase of *L. major*. The analysis revealed a single protein of approximately 120 kDa in the wild strains and transformants of *K. lactis*. Perform a search in GenBank are two homologous genes in the genome of yeast: KIGDA1 and KIYND1que may explain the cross-reactivity. The results point to the failure to obtain transformants producing GDPase of *L. major*, probably due not to reconstitute the promoter P<sub>LAC4</sub> that would direct the expression of the gene of GDPase. But that raises the chances of a wild strain to be tested as to induce the production of antibodies against species of the genus *Leishmania* and signal that the system contains flaws that compromise its use due to the dependence of reconstitution of the promoter P<sub>LAC4</sub>.

## 1. INTRODUÇÃO

Devido aos avanços nas pesquisas biotecnológicas e de engenharia genética, diversos compostos biológicos antes somente obtidos por métodos complexos de extração que apresentaram baixos rendimentos, alto grau de impurezas e não raramente impróprios ao consumo humano, podem hoje potencialmente serem sintetizados por microrganismos fermentativos engenheirados geneticamente. Dentre as espécies com potencial aplicabilidade biotecnológica, encontra-se a levedura *Kluyveromyces lactis* que, comparada a *Saccharomyces cerevisiae*, exibe metabolismo mais oxidativo, com baixa repressão por glicose, o que favorece maior rendimento de biomassa. Essas características aliadas à capacidade de secretar proteínas de alta massa molecular tornam a *K. lactis* uma candidata promissora para a expressão de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico. Além disso, a *K. lactis* tem status GRAS, uso seguro na indústria alimentícia e farmacêutica e maior diversidade metabólica, inclusive com capacidade de metabolizar açúcares de subprodutos da indústria agropecuária, como pentoses da indústria de celulose e lactose do resíduo de queijo e outros derivados lácteos, cujo aproveitamento é altamente desejável. Um kit comercializado pela New England Biolabs contendo o vetor integrativo pKLAC1 para expressão e secreção de proteínas recombinantes em *K. lactis* está atualmente disponível no mercado. Com base em suas características favoráveis a produção de proteínas heterólogas é justificável a utilização da *K. lactis* como hospedeira na produção de proteínas recombinantes de interesse biotecnológico. Dentre estas proteínas, podemos destacar fatores de virulência de patógenos que possam ser usados para desenvolvimento de drogas, imunobiológicos e diagnóstico.

A Leishmaniose é uma doença parasitária com amplo espectro de sintomas clínicos dividida basicamente em quatro formas clínicas: visceral (kalazar), cutânea, muco-cutânea e dérmica pós-kalazar (PKDL). Estas enfermidades são causadas por espécies do gênero *Leishmania*. Atualmente, sabe-se da existência de 20 espécies de protozoários patogênicos pertencentes ao gênero *Leishmania*. Estes parasitos são transmitidos pela picada de insetos vetores dos gêneros *Lutzomyia* (continente americano) e *Phlebotomus* (velho mundo). A forma visceral quando não tratada costuma ser fatal, já as formas cutâneas, apesar de raramente evoluírem para a fatalidade são mutilantes (forma mucosa e muco-cutânea) e desagradáveis especialmente quando da existência de múltiplas lesões (formas cutânea-difusa e cutânea).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru e mais de 90% dos casos da forma visceral ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. Atualmente a leishmaniose está presente em quatro continentes sendo endêmica em 88 países, 72 dos quais são países em desenvolvimento. Também, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, apenas 600.000 novas infecções são oficialmente notificadas por ano, porém como a declaração é obrigatória em apenas 32 dos 88 países afetados, muitos casos não são registrados, sendo previsto que 2 milhões de novos casos ocorram por ano (1,5 milhões para a LC e 500.000 para LV), com um valor estimado de 12 milhões de pessoas infectadas atualmente em todo o mundo. A crescente expansão da leishmaniose no mundo se deve ao aumento de fatores como: migração, desmatamento, urbanização e hospedeiros humanos susceptíveis a infecção como imunossuprimidos e desnutridos. No intuito de encontrar uma solução para esse problema de saúde pública, um dos pontos a serem combatidos é o controle da infecção nos hospedeiros animais que servem como reservatórios do parasito, sendo o cão a principal fonte de parasitos de relevância epidemiológica, que por sua presença doméstica, participa ativamente do processo de manutenção da leishmaniose.

Este trabalho está focado especificamente na GDPase de *L. major*, enzima pertencente a família das E-NTPDases, capazes de hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados e baseia-se em dados da literatura que evidenciam a participação de proteínas desta família na infectividade e virulência de parasitos, sendo especificamente relatado o envolvimento na interação parasito-célula hospedeira, no controle da resposta imune do hospedeiro animal e na captação de purinas para a via de salvação visto que esses parasitos não são capazes de sintetizá-las na via *de novo*. Além disto, esta é uma proteína predita como possivelmente ecto-localizada o que a torna facilmente disponível para o reconhecimento pelo sistema imune ou por drogas direcionadas. Logo, a GDPase se mostra como um bom alvo para o desenvolvimento de novas abordagens para a quimioterapia racional, imunoprofilaxia e imunoterapia e diagnóstico das leishmanioses, com o potencial de levar a resultados que possibilitem o depósito de patentes, derivadas do uso biotecnológico desta proteína recombinante. Neste contexto o objetivo deste trabalho é expressar a proteína GDPase de *Leishmania major* para fins biotecnológicos ligados às leishmanioses humana e canina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a antiguidade, as leveduras são reconhecidas como protagonistas na produção de alimentos e bebidas fermentáveis e, mais tarde, na obtenção de pigmentos, co-fatores, proteínas e outros produtos com valor agregado. Nas últimas décadas, devido ao advento da engenharia genética, bem como a sedimentação do conhecimento das propriedades biológicas e fisiológicas das leveduras, tem-se possibilitado sua potencial aplicação na produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico, especialmente de organismos eucariotos (Porro & Mattanovich, 2004). A *K. lactis* é uma das espécies empregadas biotecnologicamente devido as suas características favoráveis, que incluem status GRAS (*Generally Recognized As Safe*) reconhecida pela FDA (*Food and Drug Administration*), predominância de metabolismo oxidativo com baixa repressão catabólica resultando em maiores rendimentos de biomassa e proteínas heterólogas e baixo níveis de glicosilação na via secretória e de processamento de proteínas, o que também estimula a secreção das proteínas expressas (Barteviciute & Saskaunas, 2004; Piscitelli *et al.*, 2005).

Embora leveduras não sejam boas secretoras de proteínas, algumas linhagens de *K. lactis* tem a capacidade natural de secretar uma proteína killer de alta massa molecular (Zimocina), capacidade essa proporcionada pelos plasmídeos lineares pGKL1 e pGKL2, que permitiram o desenvolvimento de vetores para expressão em *K. lactis* (Jeske *et al.*, 2006).

Atualmente um kit comercializado e fornecido pela New England Biolabs (*K. lactis Protein Expression Kit*) disponibiliza um vetor integrativo de expressão e secreção de proteínas recombinantes, denominado pKLAC1, com expressão induzível por galactose e cuja integração ocorre na região promotora do gene *LAC4*, que codifica  $\beta$ -galactosidase em *K. lactis*. Esta região promotora contém uma modificação na região “Pribnow Box” (TATA Box) do tipo PBI que impede sua atividade em células procarióticas, assim o promotor *LAC4* não pode promover a expressão em *E. coli*, possibilitando dessa forma que genes que codificam proteínas consideradas tóxicas para *Escherichia coli* possam ser clonados antes da sua introdução na levedura. Além disto, o genoma da *K. lactis* já foi completamente seqüenciado e está disponível (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt>), sendo que as relações filogenéticas entre *K. lactis* e *S. cerevisiae* permitem o compartilhamento de técnicas de engenharia genética para

construção de sistemas eficientes de expressão e secreção de proteínas (Breunig *et al.*, 1984; Schaffrath & Breunig, 2000; Dujon *et al.*, 2004; Colussi & Taron, 2005; Jablonowski & Schaffrath, 2007).

Devido ao fato das leveduras pertencentes aos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* descenderem de um ancestral comum, elas apresentam forte correlação genética, logo a habilidade de ambas em assimilar galactose como fonte de carbono é compartilhada e determinada pelo grupo de genes que compõe o regulon GAL. A principal diferença entre o regulon GAL de ambas, é a evolução nos sistemas de internalização e hidrólise das diferentes fontes de galactose presentes no ambiente (Bhat & Murthy, 2001; Kellis *et al.*, 2004; Rubio-Teixeira., 2005). Pelo fato da *K. lactis* ser uma levedura isolada do leite, seu suprimento de galactose encontra-se freqüentemente sob a forma de lactose, logo a *K. lactis* possui a capacidade de assimilar lactose dependente dos genes *LAC12* e *LAC4*, inexistentes em *S. cerevisiae*, os quais, respectivamente codificam a permease e a  $\beta$ -galactosidase (lactase) de lactose (Srekrishna & Dickson, 1985).

No sistema *K. lactis Protein Expression Kit* (New England Biolabs), a expressão da proteína recombinante de interesse é feita pela indução com galactose, sendo que em *K. lactis* o metabolismo da lactose e galactose é regulado pelo regulon Lac/Gal. A lactose é transportada para dentro da célula via permease (produto do gene *LAC12*) e então é decomposta em glicose e galactose pela  $\beta$ -galactosidase (produto do gene *LAC4*) cujo promotor  $P_{LAC4}$  é um promotor forte com um nível de indução de 100 vezes. A galactose entra na via catabólica de Leloir onde é metabolizada pelas enzimas galactokinase (*KIGAL1*), transferase (*KIGAL7*) e epimerase (*KIGAL10*). Esses cinco genes são co-regulados, transcritos e induzidos quando a célula é crescida na presença de lactose ou galactose (Hsieh *et al.*, 1999).

O promotor  $P_{LAC4-PBI}$  contido no *pKLAC1* contém uma deleção (PBI) na seqüência consenso Pribnow Box TATAAT localizada entre a região 204-209 dentro do sítio maior de iniciação da transcrição em *E. coli*. Essa mutação leva a eliminação da expressão em *E. coli*, mas não afeta o nível de secreção e expressão em *K. lactis*. Isso ocorre porque os sítios múltiplos requeridos para iniciação da transcrição estão localizados em regiões diferentes em *E. coli* e *K. lactis*. Logo, a deleção em PBI não afeta nenhum dos sítios de iniciação da transcrição em *K. lactis*, sendo assim possível a clonagem de genes que são potencialmente tóxicos para *E. coli*, antes da sua inserção na *K. lactis* (Colussi & Taron, 2005). O segundo

elemento chave do pKLAC1 é a marca de seleção proporcionada pelo gene da acetamidase (permite aos transformantes usar acetamida como única fonte de nitrogênio) que favorece uma alta frequência de múltiplas integrações em *tandem* nos transformantes que conseqüentemente produzem mais proteínas recombinantes quando comparadas a simples integrações que ocorrem quando outras marcas de seleção são usadas (Colussi & Taron, 2005; Read *et al.*, 2007)

Com base na habilidade da *K. lactis* em assimilar lactose como fonte de carbono, é possível sua aplicação em processos que envolvam a biorremediação. O aumento da produção de derivados do leite ao redor do mundo também tem levado ao aumento do volume em larga escala do soro proveniente de alguns produtos como o queijo. O soro de queijo (rico em lactose) tem alta demanda química e biológica de oxigênio e a falta de métodos acessíveis para sua eliminação tem levado ao descarte no esgoto comum, o que pode ser perigoso em termos ambientais (Yang & Silva, 1995; Ghaly & Kamal, 2004; Rodríguez *et al.*, 2006). Porém, devido às leis ambientais que forçam as indústrias a dar um destino seguro a esse material residual, a forma mais econômica que as indústrias têm encontrado para eliminação do soro de queijo, é a sua transformação em produto de valor comercial através da fermentação por microrganismos que assimilam lactose. Logo, apesar de muitos fungos e bactérias possuírem a capacidade de produzir  $\beta$ -galactosidase, somente microrganismos com status GRAS, como a *K. lactis*, são aprovados para bioconversão do soro de queijo em produtos de interesse para indústria farmacêutica e alimentícia (Belem & Lee, 1998; Maullu *et al.*, 1999; Ghaly & Kamal, 2004). Então, a habilidade da *K. lactis* em crescer em um meio barato e abundante, juntamente com a fácil manipulação genética e o fato de ter o genoma totalmente seqüenciado, bem como sua tendência a melhor secreção de proteínas heterólogas comparada a *Saccharomyces*, fazem da *K. lactis* uma excelente hospedeira para produção de proteínas de interesse biotecnológico (Maullu *et al.*, 1999; Schaffrath & Breunig, 2000; Hsieh & Da Silva, 2000; Panuwatsuk & Da Silva, 2002, 2003; Bartkeviciute & Sasnauskas, 2004; Dujon *et al.*, 2004).

De fato a *K. lactis* já foi utilizada com sucesso na produção de várias proteínas de interesse comercial. Na indústria farmacêutica, foi utilizada na produção das proteínas de mamíferos interleucina 1- $\beta$ , interferon  $\alpha$  A,  $\beta$ -lactoglobulina, lisozima, fator estimulador de macrófago, soro albumina, bem como na indústria de alimentos, foi utilizada com sucesso na produção da quimosina bovina, sendo esta a primeira enzima heteróloga originada de um

eucarioto superior produzida a baixo custo em um microrganismo em larga escala industrial (Van den Berg *et al.*, 1990; Fleer *et al.*, 1991a; Chen *et al.*, 1992; Hua *et al.*, 1994; Rocha *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 2004; Colussi & Taron, 2005). Atualmente, mais de 40 proteínas de origem animal, vegetal, bacteriana, fúngica e viral são produzidas a partir da *K. lactis*, enfatizando sua habilidade para produzir eficientemente uma ampla extensão de proteínas heterólogas (Van Ooyen *et al.*, 2006).

As Leishmanioses constituem-se em um amplo espectro de formas clínicas provocadas por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, podendo ser apresentadas como uma lesão cutânea simples, com tendência de cura espontânea a uma doença sistêmica extremamente grave. As principais formas da doença são classificadas como formas tegumentar ou visceral. Estas diferentes formas clínicas estão relacionadas à espécie de *Leishmania* e ao hospedeiro vertebrado envolvidos. Uma das características da leishmaniose, tal como acontece com muitas doenças da pobreza que causam alta morbidade e baixa mortalidade, é o seu verdadeiro peso que permanece praticamente invisível, em parte porque as pessoas mais afetadas vivem em áreas remotas, e também devido ao estigma social referente as cicatrizes desfigurantes e deformidades causadas por esta doença que mantém os pacientes ocultos, assim a leishmaniose impõe um grande fardo social e prejudica a produtividade econômica (Who, 2004).

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose que acomete vísceras, como o fígado, o baço, medula óssea e linfonodos, podendo ocasionar aumento de volume abdominal e se não tratada evoluir para óbito. Esta doença tem como agente etiológico no novo mundo a espécie *Leishmania (L.) infantum/chagasi*. De acordo com o Ministério da Saúde (<http://portal.saude.gov.br/saude/>), no Brasil, a LV é uma doença endêmica com registro de surtos freqüentes, sendo que no período entre 2001 e 2005 foram registrados 15.340 casos. Inicialmente, sua ocorrência era limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas atualmente encontra-se em franca expansão para grandes centros urbanos. Está distribuída em 19 estados da federação, atingindo quatro das 5 regiões brasileiras. Sua maior incidência encontra-se no Nordeste com aproximadamente 70% do total de casos, seguido pela região Sudeste, a região Norte, e finalmente a região Centro-Oeste, tendo-se registrado em média cerca de 3.500 casos por ano no país. As taxas de letalidade, de acordo com os registros oficiais, chegam a 10% em alguns locais, sendo que no Brasil o inseto vetor responsável pela transmissão é o flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. O cão, mesmo assintomático,

permanece com intenso parasitismo cutâneo e tem sido apontado como o principal reservatório doméstico do parasito, transmitindo os parasitos ao vetor durante o repasto sanguíneo (Tesh, 1995).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa que acomete pele e mucosas, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo as espécies mais importantes no Brasil *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L.(V.) braziliensis*. Segundo dados do Ministério da Saúde, no Brasil em média, são registrados cerca de 28.830 casos/ano. A região Norte apresenta o maior coeficiente de incidência (89 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (37,4 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (20,4 casos/100.000 habitantes) (MSB, 2007).

O diagnóstico laboratorial da LTA canina é semelhante ao realizado na doença humana podendo ser baseado no diagnóstico parasitológico (exames de observação de lâmina, histopatológico ou cultura) ou sorológico (reação de imunofluorescência indireta – RIFI e ensaio imunoenzimático – ELISA). No entanto, como não são recomendadas ações objetivando o controle de animais domésticos com LTA, o diagnóstico para execução da eutanásia é indicado somente quando os animais doentes evoluírem para o agravamento das lesões cutâneas, com surgimento de lesões mucosas e infecções secundárias que poderão conduzir o animal ao sofrimento (MSB, 2007). Já com relação a leishmaniose visceral, uma das principais ações empregadas pelo programa de controle brasileiro da leishmaniose visceral canina é ainda a eliminação de cães infectados com o intuito de diminuir a incidência da doença humana (Palatinik-de-Souza *et al.*, 2001). Porém, apesar de nos últimos 5 anos mais de 160000 cães terem sido eliminados, o Ministério da Saúde não tem sido eficiente em reduzir os níveis de incidência da doença humana, sendo que os motivos poderiam ser devido a demora entre a coleta, análise da amostra e sacrifício do cão (cerca de 80 dias) devido aos métodos adotados pelo programa, bem como a possível participação de outros reservatórios do parasito, como pessoas infectadas assintomáticas e gatos (Dantas-Torres, 2007; Lemos *et al.*, 2008). Na prática clínica nos inquéritos epidemiológicos, a leishmaniose visceral canina vem se apresentando como problema para os serviços de saúde pública devido a três fatores: 1) variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas; 2) alterações histopatológicas inespecíficas e 3) inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (MSB, 2006). O diagnóstico parasitológico é o método de certeza e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico de punção hepática,

linfonodos, esplênica, de medula óssea e biópsia ou escarificação da pele. É um método com especificidade próxima a 100% e sensibilidade dependente do grau de parasitemia, tipo de material biológico coletado e do tempo de leitura da lâmina, estando em torno de 80% para cães sintomáticos e menor ainda para cães assintomáticos (Singh & Sivakumar, 2003). É um método seguro de diagnóstico, uma vez que o resultado positivo é dado pela observação direta de formas amastigotas. Entretanto, alguns desses procedimentos, embora ofereçam a vantagem da simplicidade, são métodos invasivos, significando a ocorrência de riscos para o animal e também impraticáveis em programas de saúde pública, em que um grande número de animais devam ser avaliados em curto espaço de tempo (MSB, 2006). Outros diagnósticos laboratoriais utilizados são a realização de provas sorológicas como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), fixação do complemento e aglutinação direta. Porém, atualmente para inquéritos em saúde pública os exames disponíveis para diagnóstico sorológico são a RIFI e o ELISA, que expressam os níveis de anticorpos circulantes no soro sanguíneo (MSB, 2006). Sendo que a RIFI pode apresentar reações cruzadas principalmente com a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e a doença de Chagas e o ELISA tem sua sensibilidade e especificidade grandemente influenciada pelo antígeno utilizado (Singh & Sivakumar, 2003). Essas duas técnicas sorológicas são recomendadas pelo Ministério da Saúde para avaliação da soroprevalência em inquéritos caninos amostrais. O ELISA por estar em fase de implantação, inicialmente está sendo recomendado para a triagem de cães sorologicamente negativos e a RIFI para a confirmação dos cães sororreagentes ao teste de ELISA ou como uma técnica diagnóstica de rotina (MSB, 2006).

As pesquisas objetivando a obtenção de testes diagnósticos moleculares com uma maior especificidade baseadas na amplificação de regiões do DNA do parasito por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tem avançado, diversificando a utilização de primers específicos que podem amplificar regiões conservadas entre as diferentes espécies de leishmania, ou primers para regiões diferenciadas com o objetivo não só de constatar a presença do parasito, como também de discriminar entre as diferentes espécies de leishmania, em regiões onde ambas as formas visceral e cutânea são prevalentes. Porém, apesar da alta especificidade e sensibilidade, a PCR exige pessoal treinado, laboratórios devidamente equipados e não é passível de utilização em campo (Singh, 2006; Gomes *et al.*, 2007). Atualmente muitos estudos têm sido feitos com o intuito de se descobrir novos métodos ou alvos no diagnóstico e novos candidatos à vacina que possam ser utilizados não somente em humanos mas

principalmente em cães, pois estes hoje são considerados o principal reservatório de várias espécies de *Leishmania* no ambiente doméstico e no peridomicílio, constituindo parte do ciclo epidemiológico da transmissão humana (Torres, 2007; Moreira *et al.*, 2007).

Tendo em vista o número expressivo de casos da doença no continente Americano, bem como no Brasil, a morbidade causada pelas diferentes formas clínicas da doença e a limitação dos tratamentos e profilaxia para humanos e animais, especialmente cães, com as drogas atualmente disponíveis, é de extrema importância o desenvolvimento de novas abordagens de diagnóstico, tratamento e prevenção. Neste contexto, a descoberta de moléculas envolvidas com o processo de infecção presentes nas interações parasito-hospedeiro e o conhecimento da função destas biomoléculas têm grande potencial para ser usado em abordagens como o desenvolvimento de métodos de diagnósticos mais acurados e futuramente no desenvolvimento de vacinas. Deste modo, acredita-se que as E-NTPDases (ecto-nucleotidases da família apirase ou CD39) constituem novos alvos promissores para estes estudos (MSB, 2006; Gomes *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2007).

As ecto-apirases da família das E-NTPDases são enzimas capazes de regular a concentração extracelular de nucleotídeos (Zimmermann *et al.*, 2000). Atualmente sabemos que o ATP extracelular ( $ATP_e$ ), e seus produtos de degradação  $ADP_e$ ,  $AMP_e$  e adenosina<sub>e</sub>, bem como outros nucleotídeos e nucleosídeos, são componentes normais do meio extracelular e estão envolvidos com vários efeitos biológicos em diferentes células, tecidos e órgãos (Dombrowski *et al.*, 1998). Como exemplos já consolidados e bem descritos, podemos citar que o  $ATP_e$  está envolvido em efeitos citostáticos e citotóxicos em vários tumores, vasodilatação, metabolismo ósseo, estimulação dos neutrófilos a degranulação e fagocitose bactericida, necessários a secreção de algumas citocinas, além de participar de processos inflamatórios (Bours *et al.*, 2006). O ATP está envolvido no desenvolvimento da inflamação por meio da combinação dos seguintes eventos: liberação de histamina através dos mastócitos, provocando a produção de prostaglandinas e a produção e liberação de citocinas a partir das células imunes (Burnstock, 2006). O ADP extracelular contribui para propagação da ativação plaquetária (recrutamento de novas plaquetas para o tampão hemostático via liberação ou secreção de agonistas secundários) induzindo mudanças nas formas celulares e inibindo a adenilato ciclase por meio de receptores específicos de membrana, mas não mostrando efeito sobre os linfócitos (Woulfe *et al.*, 2001). Por outro lado, sabe-se que a adenosina extracelular pode ser transportada para o citoplasma e ser incorporada em vias de recuperação de purinas,

importantes vias presentes em parasitos como em *Leishmania spp.* que são incapazes de fazer a síntese *de novo* de purinas (Bours *et al.*, 2006). Além disto, o acúmulo de adenosina extracelular contribui para a imunodeficiência, pois apresenta efeitos tóxicos frente ao desenvolvimento e atividade dos linfócitos (Dombrowski *et al.*, 1998; Bours *et al.*, 2006). A adenosina e seu produto de degradação a inosina são reguladores do processo inflamatório e desempenham potentes efeitos imunomodulatórios. A adenosina não somente inibe a agregação plaquetária, mas também suprime a produção das citocinas inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-12, e aumenta a produção de IL-10 através dos monócitos e macrófagos. Já a inosina, suprime a síntese de IL-1, IL-12, proteínas inflamatórias dos macrófagos (MIP)-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  nos macrófagos, IL-8 nas células epiteliais e inibe a ativação dos neutrófilos via N-formil-metionil-leucilfenilalanina (fMLP). Logo a sinalização desencadeada pela adenosina por meio dos receptores purinérgicos (principalmente o subtipo P1A<sub>2A</sub>) leva a desativação dos macrófagos e supressão da proliferação e função efetora dos linfócitos (Gounaris & Selkirk, 2005; Bours *et al.*, 2006).

Atualmente sabe-se da existência de proteínas ligadoras de nucleotídeos extracelulares, visto que estes não são capazes de atravessarem membranas celulares, dentre elas estão os purinoreceptores e as ecto-nucleotidases. Os purinoreceptores são proteínas transmembranares agrupadas em duas grandes famílias, de acordo com os efeitos farmacológicos de antagonistas e agonistas dos nucleosídeos e nucleotídeos. Os receptores do tipo P1 ligam adenosina ou inosina, e todos os receptores P1 e seus subtipos A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>, são receptores acoplados a proteína G (metabotrópicos). Os receptores do tipo P2 ligam ATP<sub>e</sub>, UTP<sub>e</sub>, ADP<sub>e</sub> e UDP<sub>e</sub>. Os receptores P2 são subdivididos em duas grandes famílias, a P<sub>2X</sub>, família de receptores do tipo canais de íons, composta por 7 subtipos e a família P<sub>2Y</sub> de receptores do tipo serpentina acoplados a proteína G é composta de 8 subtipos (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock, 2006; Bours *et al.*, 2006).

A sinalização purinérgica age em diversos processos fisiológicos dentre os quais podemos citar a secreção endócrina e exócrina, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelas células vasculares endoteliais, influencia na proliferação celular, na diferenciação e apoptose no desenvolvimento embrionário, regeneração dermal, reabsorção óssea, aterosclerose, isquemia, alterações nas células epiteliais da pele e órgãos viscerais, inflamação, neuroproteção e câncer (Burnstock, 2006; Bours *et al.*, 2006; Burnstock, 2008; Shabbir *et al.*, 2008). Especificamente no sistema imune, os receptores P2X<sub>7</sub>, P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub> localizados nas

células imune e inflamatórias desempenham uma função primordial no processo inflamatório e na imunomodulação. É por meio do receptor P2X<sub>7</sub> que o ATP induz a apoptose em macrófagos resultando na morte das bactérias contidas dentro do mesmo, como também desempenha um efeito bactericida nos macrófagos por meio dos receptores P2Y<sub>2</sub> (Burnstock., 2006).

De uma maneira geral, a concentração extracelular dos nucleotídeos e a presença de subtipos diferentes de receptores nas células regulam a resposta celular à estas biomoléculas, por sua vez a presença e concentração dos nucleotídeos são reguladas pela ação de enzimas metabolizadoras destes, presentes na membrana das células ou excretadas em formas solúveis. Várias famílias de ectonucleotidases são conhecidas, sendo que a nomenclatura atual (Zimmermann *et al.*, 2000) descreve: as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDases), também chamadas de ecto-ATPDases ou apirases que atuam na conversão dos nucleotídeos tri e difosfatados em seus componentes monofosfatados, as ecto-5'-nucleotidases hidrolisam os componentes monofosfatados, usualmente AMP até adenosina que por sua vez pode ser convertida em inosina pelas adenosina deaminases, as ecto-pirofosfatase/fosfodiesterases que utilizam diferentes substratos e possuem atividade fosfodiesterásica e nucleotídeo pirofosfatásica e as fosfatases alcalinas que liberam fosfato livre a partir de uma variedade de substratos, incluindo nucleotídeos.

Vários trabalhos recentes têm sugerido uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular por parasitos como *T. cruzi*, *L.(L). amazonensis*, *Toxoplasma gondii*, *Tricomonas vaginalis* e *Entamoeba histolytica* e processos como virulência, sobrevivência intracelular e adesão celular (Fietto *et al.*, 2004; Berrêdo-Pinho *et al.*, 2001; Asai *et al.*, 1995; Asai *et al.*, 2002; Borges *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2001; Barros *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2009; Marques-da-Silva, *et al.*, 2008). Especificamente em *L. (L.) amazonensis*, já foi demonstrada uma maior capacidade de hidrólise de ATP, por uma Mg<sup>2+</sup>-ecto-ATPase em promastigotas virulentos quando comparados aos avirulentos (Bêrredo-Pinho *et al.*, 2001). Neste trabalho os autores caracterizaram “in vivo” uma atividade ecto-ATPásica, dependente de Mg<sup>2+</sup>, não inibida por inibidores clássicos de outras ATPases e postularam a participação desta enzima na via de salvação de purinas do meio extracelular e em mecanismos de evasão do parasito frente aos mecanismos de defesa do sistema imune que de alguma forma dependam ou sejam regulados por ATP e seus metabólitos extracelulares. Outro trabalho aponta para diferença de resposta à infecção experimental em camundongos infectados por *L.*

(*V.*) *braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, onde o decréscimo da produção de interferon- $\gamma$  e TNF pelos linfonodos, com a diminuição da proliferação de células do baço e dos centros germinativos nos camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* foi relacionada ao fato de que as células de *L. (L.) amazonensis* eram capazes de hidrolisar uma maior quantidade de ecto-nucleotídeos de adenina do que as células de *L. (V.) braziliensis* (Maioli e t al., 2004).

Mais recentemente em 2008, utilizando a infecção experimental em camundongos, foi evidenciado que a infecção por *L. amazonensis* causava lesões crônicas não auto-curáveis, enquanto que as espécies *L. braziliensis* e *L. major* não eram eficientes no controle do estabelecimento da infecção. Os resultados mostraram que a *L. amazonensis* era mais virulenta que as outras espécies devido a uma maior hidrólise de nucleotídeos extracelulares proporcionada por uma alta expressão de uma E-NTPDase de membrana, corroborando com a idéia de que uma maior produção de adenosina é importante para o desenvolvimento da lesão, estabelecimento do parasitismo tecidual, tamanho da lesão e atraso na cura, sugerindo que a conversão do ATP (molécula pró-inflamatória) em adenosina (molécula anti-inflamatória) contribui para o estabelecimento da infecção por espécies do gênero *Leishmania* (de Almeida Marques-da-Silva *et al.*, 2008).

Em 2004, Fietto *et al* caracterizaram um gene da família das apirases em *Trypanosoma cruzi*, nomeando-o NTPDase-1. Neste mesmo trabalho, por meio de pesquisa no banco de dados (Genbank) foram encontrados 2 genes homólogos das apirases no genoma de *L. major* (gi|45120584| possível NTPDase [*Leishmania major*] e gi|15487213| possível guanossina difosfatase [*Leishmania major*]). Sendo estes genes pertencentes a família de fatores de virulência de patógenos, neste trabalho a fim avaliarmos a utilização biotecnológica, da proteína codificada pelo gene gi|15487213| possível guanossina difosfatase [*Leishmania major*] propõe-se realizar a sua expressão em sistema heterólogo de cultura contínua utilizando a *K. lactis* como hospedeira e a utilização da proteína recombinante obtida em ensaios de imunodiagnóstico da leishmaniose canina por ELISA.

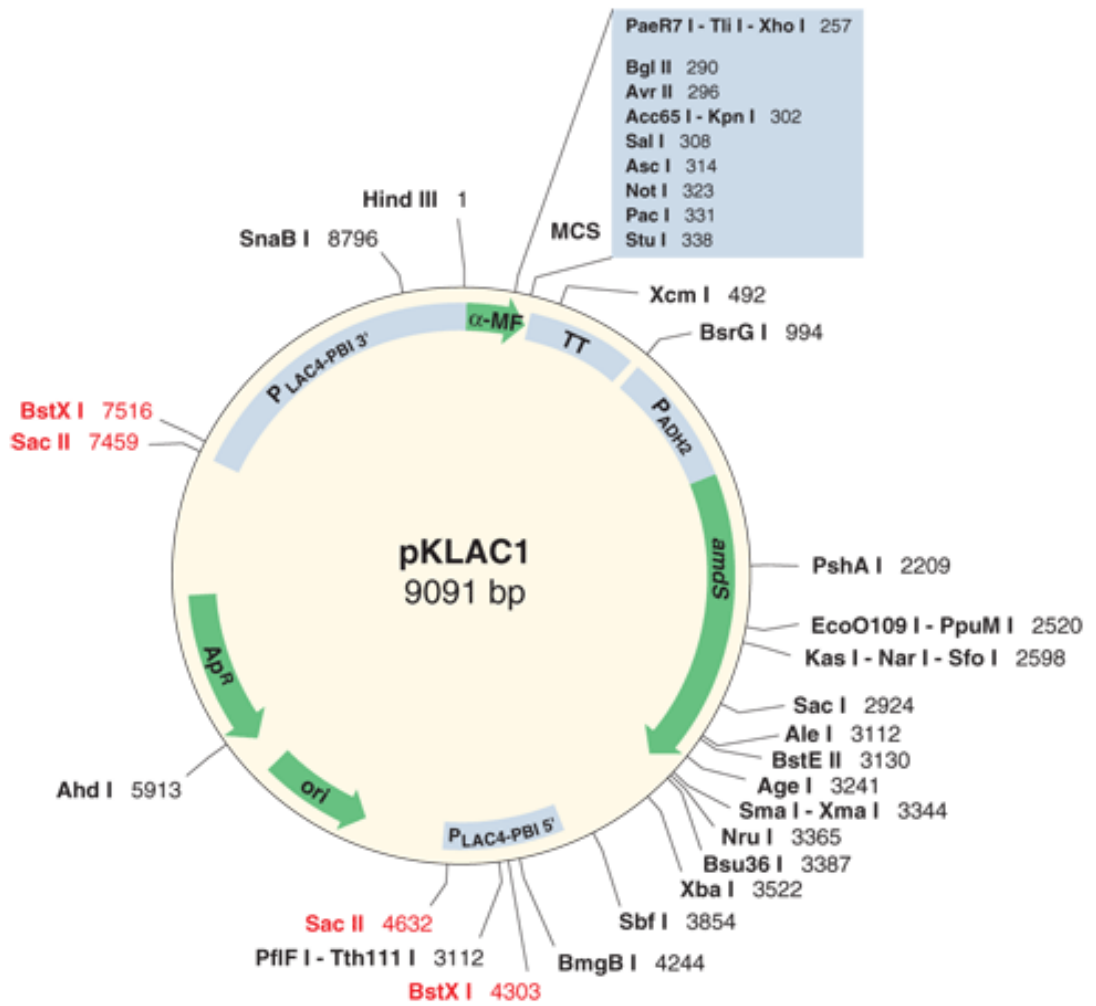
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Plasmídeos e Microrganismos

O plasmídeo pET21b/GDPase é derivado do plasmídeo pET-21b (5442 pb), que contém a região codificante completa do gene da GDPase de *L. major*, isolada e clonada previamente (DeSouza, 2009). A construção pET21b/GDPase foi utilizada para amplificação da seqüência de nucleotídeos referente a GDPase de *L. major*, com o número de acesso no banco de dados gi|15487213.

O plasmídeo pKLAC1 (Figura 1), contém o promotor do gene que codifica a álcool desidrogenase ( $P_{ADH2}$ ) de *Saccharomyces cerevisiae*. Este, controla a expressão do gene de seleção *amdS* de *Aspergillus nidulans*, que por sua vez codifica a acetamidase, conferindo capacidade de crescimento em acetamida como única fonte de nitrogênio como meio de seleção dos transformantes contendo o plasmídeo. O pKLAC1 contém as seqüências 5' e 3' referentes ao promotor do gene LAC4, a seqüência líder de secreção *alpha mating factor* de *Kluyveromyces lactis* ( $\alpha$ MF) que direciona a secreção das proteínas expressas, o sítio múltiplo de clonagem (MCS), o gene de resistência a ampicilina ( $AP^R$ ) e o terminador (TT) da transcrição do gene LAC4, que está a *downstream* da seqüência 3' do promotor do gene LAC4 ( $P_{LAC4-PBI 3'}$ ) (Manfredi *et al.*, 1996; Colussi & Taron, 2005). A linhagem de *K. lactis* CBS 2359 (linhagem referência utilizada no seqüenciamento pela *Genolevure*) foi utilizada como hospedeira para expressão da GDPase de *L. major* utilizando o pKLAC1. Transformantes de *K. lactis* expressando o peptídeo SBM 7462 nomeados Seq 1 e Seq 4 obtidos por Santos (2007), foram usados como controle positivo para verificação da correta reconstituição do promotor  $P_{LAC4}$ , onde de acordo com o manual do fabricante do sistema de expressão, em reação de PCR específica deveria ser amplificada uma banda de 1.9 kb.

A cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para propagação dos plasmídeos utilizados neste trabalho (Sambrook *et al.*, 1987).



**Figura 1:** plasmídeo pKLAC1 (New England Biolabs).

### 3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

A estirpe de *E. coli DH5α* foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) (10 g.L<sup>-1</sup> triptona, 5 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 10 g.L<sup>-1</sup> cloreto de sódio) sob agitação de 180 rpm a 37 °C. As células de *DH5α* contendo os plasmídeos pKLAC1 e pKLAC1/GDPase foram cultivadas em meio LB suplementado com 50 µg.mL<sup>-1</sup> de ampicilina sob as mesmas condições, para manutenção do plasmídeo e seleção dos transformantes.

Os transformantes de *K. lactis* foram selecionados em meio YCB ágar (*Yeast Carbon Base*) contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio. Após seleção, os transformantes foram cultivados em meio YPD (1% p/v extrato de levedura, 2% p/v peptona e 2% p/v dextrose) sob agitação de 200 rpm a 30 °C e em meio YPD sólido acrescido de 1,5% p/v de ágar em estufa a 37 °C. Para indução da expressão da proteína heteróloga, os transformantes foram cultivados em YPGal (1% p/v extrato de levedura, 2% p/v peptona e 2% p/v galactose) sob agitação de 200 rpm a 30 °C.

### 3.3. Amplificação e clonagem do gene da GDPase

Inicialmente foi realizada a escolha de enzimas de restrição que não cortassem o gene internamente, mas que apresentassem um sítio de clonagem disponível no sistema pKLAC1. Deste modo, foi feita a análise do padrão de restrição do gene e foram escolhidas as enzimas *Sal I* e *Bgl II*.

A seqüência de nucleotídeos referente ao gene da GDPase foi amplificada a partir do plasmídeo pET21b/GDPase utilizando os *primers* desenhados a partir da seqüência do gene íntegro e foram adicionados sítios de restrição ao produto de PCR gerado (referentes às enzimas *Bgl II* e *Sal I*), bem como nucleotídeos extras para ancoragem das enzimas de restrição, como apresentados a seguir (em azul os sítios de restrição, em vermelho os sítios de ancoragem e em preto a região específica do gene alvo, iniciando a partir do códon da metionina no oligonucleotídeo iniciador direto F e a partir do códon de parada no oligonucleotídeo iniciador reverso R).

GDPase F (*Bgl II*) – 5' **GGAAGATCTATGCCAATGACTGACG** 3'

GDPase R (*Sal I*) – 5' **GCGTCGACGGTAAGAGAGAGGAGTGA** 3'

A reação de amplificação foi montada em um volume total de 75  $\mu\text{L}$  e posteriormente dividida em 3 tubos de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 9  $\mu\text{L}$  (aproximadamente 100 ng) do DNA plasmidial pET21b/GDPase, 5 unidades da enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (Invitrogen), 0,2 mM de cada dNTP, tampão da Taq 1x, 2 mM de  $\text{MgSO}_4$  e 0,4  $\mu\text{M}$  de cada um dos *primers* específicos. A amplificação foi efetuada de acordo com o seguinte protocolo: (I) 94 °C por 3 minutos (um ciclo); (II) 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 1 minuto e 68 °C por 4 minutos (35 ciclos); e (III) 68 °C por 7 minutos (um ciclo). O produto da amplificação foi fracionado em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 0,5x. Um volume de 5  $\mu\text{L}$  da reação de amplificação foi aplicado no gel e o fragmento de DNA de cerca de 2073 pb esperado foi visualizado por coloração com brometo de etídio, utilizando o aparelho Eagle Eye Stratagene para captura das imagens. O volume restante da reação (70  $\mu\text{L}$ ) foi fracionado em gel de agarose 1% e a banda de aproximadamente 2073 pb foi purificada utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen).

O fragmento de DNA purificado e o plasmídeo pKLAC1 foram diretamente digeridos pelas enzimas *Bgl II* e *Sal I*, fracionados em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 0,5x e purificados a partir da banda cortada do gel utilizando o kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). Em seguida foi feita a reação de ligação utilizando 1 unidade da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante, 30 ng do DNA plasmidial e 90 ng do DNA alvo purificado. Logo após essa etapa, as células de *E. coli DH5 $\alpha$*  foram transformadas com a reação de ligação segundo método proposto por INOUE *et al.* (1990).

As células transformantes foram selecionadas em meio LB ágar (10 g.L<sup>-1</sup> triptona, 5 g.L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> cloreto de sódio e 1,5% p/v ágar bacteriológico) suplementado com 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina. As colônias isoladas foram inoculadas em 20 mL de caldo LB seletivo (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de ampicilina) e incubadas a 37 °C, sob agitação de 180 rpm por cerca de 16 horas. Após incubação, foram retiradas alíquotas de 0,6 mL cada, seguida da adição de 20 % (v/v) de glicerol e armazenamento a -80 °C. O volume restante da cultura de *E. coli DH5 $\alpha$*  contendo o plasmídeo pKLAC1-GDPase foi utilizado para a extração do DNA

plasmidial. Todos os procedimentos de manipulação de DNA foram realizados segundo SAMBROOK *et al.* (1987).

### 3.4. Confirmação da clonagem do gene da GDPase no pKLAC1

O plasmídeo pKLAC1-GDPase foi submetido a uma reação de PCR realizada em um volume total de 25  $\mu\text{L}$  contendo: 1  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial não diluído (aproximadamente 100 ng), 20 pmol de cada um dos *primers* específicos e 12,5  $\mu\text{L}$  da GO Taq Green Master Mix (Promega), que já contém todos os outros componentes necessários à reação como tampão adequado, magnésio e dNTPs. A amplificação foi efetuada de acordo com o seguinte protocolo: (I) 94 °C por 4 minutos (um ciclo); (II) 94 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 3 minutos (33 ciclos); e (III) 72 °C por 7 minutos (um ciclo). O produto da amplificação foi fracionado em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 0,5x a 110 volts por cerca de 60 minutos utilizando o padrão de tamanho 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). O volume de 0,5  $\mu\text{L}$  da reação de amplificação foi aplicado no gel e o fragmento de DNA de cerca de 2073 pb foi visualizado por coloração com brometo de etídio, utilizando o aparelho Eagle Eye Stratagene para captura das imagens.

### 3.5. Transformação da linhagem de *K. lactis* CBS 2359 com a construção pKLAC1-GDPase

Células de *K. lactis* CBS 2359 foram transformadas com cerca de 4  $\mu\text{g}$  do plasmídeo pKLAC1-GDPase previamente linearizado com a endonuclease de restrição *Ahd I* (New England Biolabs), utilizando o tampão NEB 4 (10 mM Tris-acetato, 50 mM acetato de potássio, 10 mM acetato de magnésio e 1 mM ditiotreitól) adicionado de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de BSA. O processo de transformação de leveduras *K. lactis* foi realizado segundo Hill *et al.* (1991). Inicialmente as linhagens de *K. lactis* foram inoculadas em 10 mL de meio YPD e incubadas a 30 °C e 200 rpm. Ao atingir a fase estacionária, as culturas foram transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio YPD e incubadas sob as mesmas condições. Após atingir uma  $\text{DO}_{600} = 0.5$ , que corresponde aproximadamente a  $1-4 \times 10^7$  UFC/mL, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi suspenso em 10 mL de uma solução de acetato de lítio (LiAc 0,1 M, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1

mM). Em seguida, essa suspensão foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de solução acetato de lítio. Uma alíquota de 100  $\mu$ L dessa suspensão de células foi adicionada de 4  $\mu$ g do plasmídeo pKLAC1-GDPase previamente linearizado e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 280  $\mu$ L de uma solução de PEG 4.000 [solução de PEG (polietilenoglicol) 4.000 a 50% (p/v) diluído em acetato de lítio] e homogeneizado 4-6 vezes por inversão. A mistura foi incubada a 30 °C por 45 minutos sem agitação. Após incubação, foram adicionados 43  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) que corresponde aproximadamente a 10% (v/v), seguida da mesma homogeneização. A mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 5 minutos e centrifugada a 12.000 g por 3-5 segundos. O *pellet* foi lavado com água ultra pura estéril e centrifugado novamente sob as mesmas condições. Uma alíquota de 100  $\mu$ L das células foram plaqueadas em meio YCB ágar seletivo contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio para a seleção dos transformantes. Cada transformante foi cultivado em YPD líquido e sólido e após incubação foram retiradas alíquotas de 0,6 mL seguida da adição de 20% (v/v) de glicerol e armazenamento a -80 °C.

### **3.6. Confirmação da correta integração do cassete de expressão no genoma dos transformantes**

#### **3.6.1. PCR para amplificação do gene da GDPase integrado no genoma da *K. lactis***

Para confirmação da inserção do gene de interesse no genoma da levedura foram feitas reações de PCR usando *primers* específicos (descritos anteriormente) para amplificação da GDPase. A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25  $\mu$ L contendo: 1  $\mu$ L (aproximadamente 1  $\mu$ g) do DNA total não diluído dos transformantes N° 1, N° 5 e cepa selvagem (WT), 2,5 unidades da enzima Dream Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM de cada dNTP, tampão 1x da Taq e 20 pmol de cada um dos *primers* específicos. A amplificação foi efetuada de acordo com o seguinte protocolo: (I) 94 °C por 4 minutos (um ciclo); (II) 94 °C por 1 minuto, 55, 57, 58 e 60 °C por 1 minuto (anelamento) e 72 °C por 3 minutos (35 ciclos); e (III) 72 °C por 7 minutos (um ciclo). Os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 0,5x. O volume de 5  $\mu$ L das

reações de amplificação foi aplicado em gel e os fragmentos de DNA foram visualizados por coloração em brometo de etídio utilizando o aparelho Eagle Eye Stratagene para captura das imagens. Os *primers* internos **iGDPase Lm FW** e **iGDPase Lm RV** desenhados posteriormente, foram utilizados para amplificar o gene da GDPase a partir do DNA total dos transformantes N° 1, N° 2, N° 3, N° 5 e N° 8 e WT, seguindo o protocolo anteriormente descrito, sendo que as temperaturas de anelamento foram 57, 60 e 65 °C. A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µL contendo: 1 µL do DNA total (aproximadamente 1 µg), 20 pmol de cada um dos *primers* específicos e 12,5 µL da GO Taq Green Master Mix (Promega), que já contém todos os outros componentes necessários à reação como tampão adequado, magnésio e dNTPs. O produto da amplificação foi fracionado em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 0,5x a 110 volts por cerca de 60 minutos utilizando o padrão de tamanho 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). O volume de 20 µL da reação de amplificação foi aplicado no gel e o fragmento de DNA de 967 pb foi visualizado por coloração com brometo de etídio sob luz UV, utilizando o aparelho Eagle Eye Stratagene para captura das imagens.

**iGDPase Lm FW 5' AACACTTGGAGGGTTTGCAC3'**

**iGDPase Lm RV 5' CTCAGAGCCTTCCAA ACAGG 3'**

### **3.6.2. PCR para amplificação do fragmento de 1.9 kb referente ao produto de amplificação do promotor P<sub>LAC4</sub> reconstituído**

A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 25 µL contendo: 1 µL do DNA total não diluído (aproximadamente 1 µg) dos transformantes N° 1, N° 2, N° 3 e N° 5, cepa selvagem (WT) e cepas Seq 1 e Seq 4, 2,5 unidades da enzima Dream Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM de cada dNTP, tampão 1x da Taq e 20 pmol de cada um dos *primers* específicos. A amplificação foi efetuada de acordo com o seguinte protocolo: (I) 94 °C por 4 minutos (um ciclo); (II) 94 °C por 30 segundos, 65, 65.2, 65.4, 65.5 e 65.7 °C por 30 segundos (anelamento) e 72 °C por 2 minutos (35 ciclos); e (III) 72 °C por 7 minutos (um ciclo). Os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose 1% p/v de tampão TBE 0,5x. Um volume de 10 µL das reações de amplificação foi aplicado em gel e os

fragmentos de DNA foram visualizados por coloração em brometo de etídio sob luz UV utilizando o aparelho Eagle Eye Stratagene para captura das imagens.

### **3.7. Indução da expressão da GDPase**

Para indução da expressão da proteína heteróloga, os transformantes foram cultivados em 15 mL de YPGal líquido (1% p/v extrato de levedura, 2% p/v peptona e 2% p/v galactose) sob 200 rpm e 30 °C por 96 horas, sendo que a cada 24 horas uma alíquota da cultura era retirada e centrifugada a 12.000 g por 1 minuto. O sobrenadante e o extrato foram então armazenados a -20 °C para avaliação da expressão por SDS-PAGE e Western blotting. Cada alíquota foi adicionada de um coquetel de inibidores de proteases contendo: pepstatin A 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , aprotinin 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , leupeptins 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e EDTA 1 mM.

### **3.8. Preparação do extrato protéico**

Alíquotas da cultura de *K. lactis* sob indução foram coletadas e centrifugadas a 12.000 g por 1 minuto, o sobrenadante foi armazenado como anteriormente descrito e o *pellet* foi suspenso em tampão imidazol 200 mM 1x gelado. A suspensão foi novamente centrifugada (12.000 xg por 1 minuto) e o *pellet* foi suspenso em 500  $\mu\text{L}$  de tampão imidazol 200 mM 1x gelado e adicionado dos inibidores de proteases pepstatin A 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aprotinin 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , leupeptins 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e EDTA 1 mM. A esta suspensão foram adicionadas pérolas de vidro, que romperam as células após 2 minutos de agitação vigorosa. Após a decantação das pérolas de vidro, 400  $\mu\text{L}$  do extrato foi recuperado e armazenado a -20 °C para posteriores análises.

### **3.9. Análise da expressão da proteína recombinante**

#### **3.9.1. Análise em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Para cada 15 µL de amostra (sobrenadante e extrato) foram adicionados 5 µL do tampão de amostra 4x [125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% β-mercaptoetanol, 10% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol e 0,05 (p/v) azul de bromofenol] para SDS-PAGE. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos e fracionadas por eletroforese seguida de coloração por azul de Coomassie. A eletroforese foi realizada a 110 volts durante aproximadamente 1 hora em tampão de corrida (25 mM de Tris, 250 mM de glicina e 0,1% m/v de SDS), utilizando o sistema Mini Protean III (Bio-Rad) e o sistema de maxgel GiBco BRL modelo V16-2, em gel de poliacrilamida 10% (v/v), conforme descrito por Sambrook *et al.* (1987). A visualização das proteínas foi feita por coloração com Azul de Coomassie. Os géis foram preparados a partir de uma solução estoque de acrilamida/N,N-metileno bisacrilamida (Bis) 30%, tampão Tris/HCl 1,5 mol.L<sup>-1</sup>, pH 8,8 para o gel de separação, e tampão Tris/HCl 1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 6,8 para o gel de empilhamento, persulfato de amônio 10% (p/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v), e N,N,N,N,-tetrametil-etilenodiamino (TEMED). A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente na presença do marcador de massa molecular PageRuler Unstained Protein Ladder SM0661 (Fermentas).

#### **3.9.2. Coloração por Coomassie Blue**

Os géis de poliacrilamida foram colocados em solução corante (0,1% p/v de azul de Coomassie, 9% v/v de ácido acético e 45% v/v de etanol), sob agitação por pelo menos 3 horas. Decorrido esse tempo, a solução corante foi retirada e adicionou-se a solução descorante (75% v/v de ácido acético e 25% v/v de etanol), que foi trocada até adequada visualização das amostras. Os géis resultantes foram digitalizados em aparelho scanner (Multifuncional Photosmart C5580 – HP).

#### **3.9.3. Análise protéica por Western Blotting.**

Para avaliação da expressão protéica foram realizados ensaios de *Western Blotting* usando antisoro-policlonal anti-GDPase de *L. major* recombinante expressa em sistema bacteriano (DeSouza, 2009). Para cada análise por *Western Blotting* foram feitas duas

separações por SDS-PAGE 10%, sendo uma utilizada para visualização das bandas protéicas por coloração com Comassie, como descrito anteriormente, e outra utilizada para a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose. A transferência foi feita de acordo com o manual do fabricante, em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% v/v de metanol, pH 8,5), a 4 °C por 2 horas, em corrente de 210 mA, utilizando o sistema *Mini trans-blot electrophoretic transfer cell Bio-Rad*.

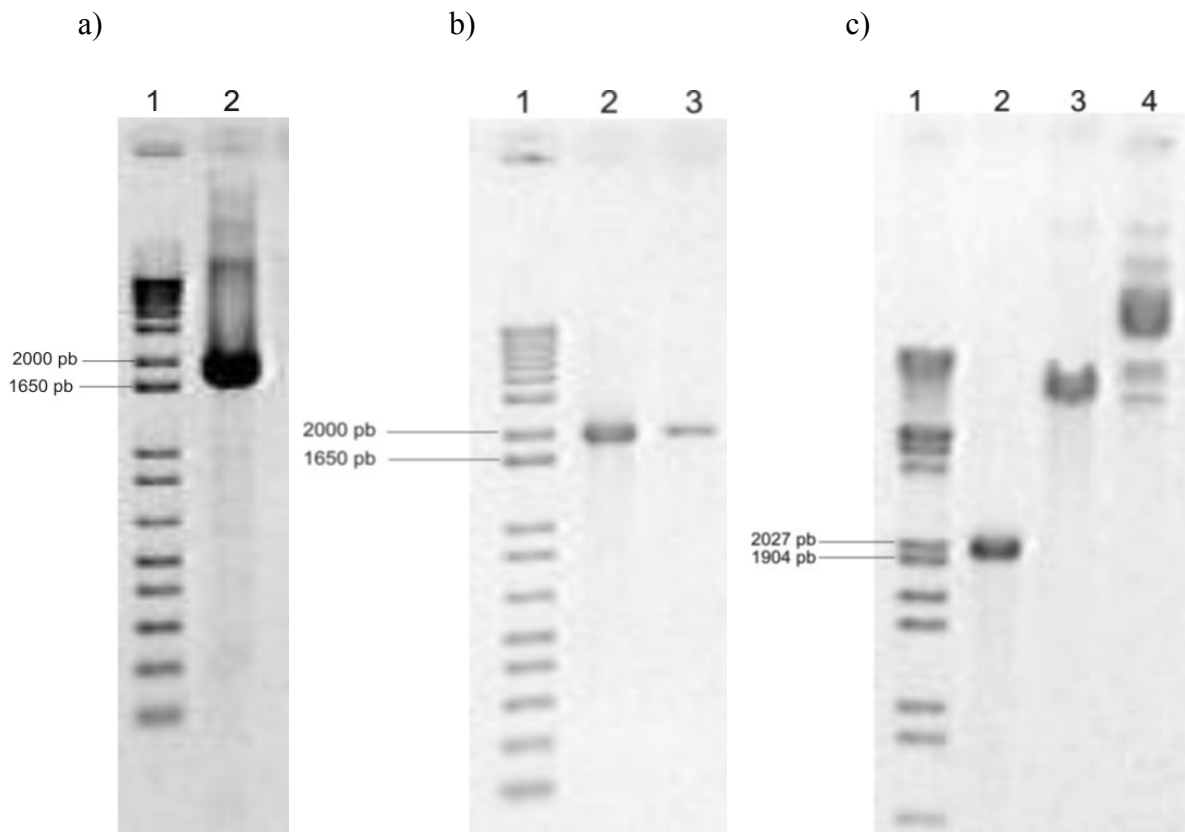
Após a transferência das proteínas do gel para a membrana, esta foi colocada em uma placa de Petri e lavada com 15 ml de PBS-T (NaCl 8 g.L<sup>-1</sup>, KCl 0,2 g.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g.L<sup>-1</sup>, 0,1% v/v tween 20, pH 7,4). Então, foi adicionado Ponceau (0,1% p/v de Ponceau S em ácido acético glacial 10% v/v) e a membrana foi incubada até o aparecimento das bandas referentes às proteínas e do padrão de massa molecular (Page Ruler Unstained Protein Ladder SM 0661). A membrana foi então lavada com água destilada e adicionado o reagente de bloqueio (BSA 3% p/v em PBS-T 1x), com incubação de 1 hora a temperatura ambiente sob agitação constante. Posteriormente, a membrana passou por 3 lavagens com PBS-T 1x de 5 minutos cada, sendo o soro policlonal de coelho anti-NTPDase recombinante de *T. cruzi* e anti-GDPase recombinante de *Leishmania major*, usados como anticorpos primários, adicionados nas proporções 1:1000 e 1:2000 respectivamente, e incubados *over night* a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida foram feitas 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS-T, sob agitação constante em temperatura ambiente e o anticorpo secundário Anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase produzido em cabras (Sigma-Aldrich) foi adicionado na proporção 1:20000, diluído em PBS-T e incubado sob agitação constante por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T cada foram feitas como descrito anteriormente. No passo seguinte, foi realizada a revelação. Foi adicionada uma solução contendo o substrato para a peroxidase [10 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; 10 mg de DAB (3,3-tetraclorido de diaminobenzidina) e 10 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%]. A placa contendo a membrana de nitrocelulose e o substrato para a peroxidase foi agitada manualmente no escuro até o aparecimento das bandas referentes à proteína. Após o aparecimento das bandas, a membrana de nitrocelulose foi colocada em um recipiente contendo água destilada para paralisar a reação de revelação. Por fim a membrana foi digitalizada após secagem parcial em papel absorvente (Multifuncional Photosmart C5580 – HP).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Amplificação e clonagem do gene da GDPase

Para isolamento da região codificante da GDPase de *L. major* a ser expressa no sistema eucariótico *K. lactis*, foi feita a amplificação da região codificante do gene da GDPase de *L. major* inserido no plasmídeo bacteriano pET21b. A amplificação com os primers específicos levou à formação de um amplicon de DNA de aproximadamente 2073 pb, como era esperado. Estes resultados podem ser vistos na Figura 2 Painel A. O restante da reação de PCR (cerca de 70 µL) foi aplicado em gel de agarose 1%, sendo o fragmento de 2073 pb referente ao gene da GDPase cortado do gel e purificado (Figura 2 Painel B). Mesmo após uma segunda lavagem da coluna de purificação, em um maior volume (50 µL), o rendimento do produto de PCR purificado foi satisfatório, conforme a Figura 2 Painel B, provavelmente devido à eficiência da amplificação inicial, usando uma Taq polimerase de alta fidelidade.

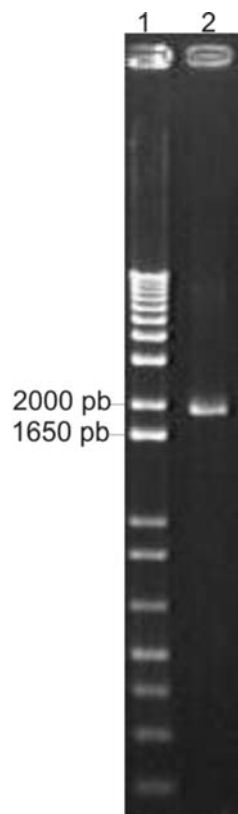
Após a purificação, o produto de PCR e o plasmídeo pKLAC1 foram digeridos com as enzimas *Bgl II* e *Sal I*, como observado na Figura 2 Painel C.



**Figura 2:** AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E DIGESTÃO DO GENE DA GDPase E pKLAC1. **a)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto de amplificação da GDPase de *L. major*, usando como molde a construção pET21b-GDPase. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 2) Produto da reação de PCR (5  $\mu$ L) utilizando os *primers* GDPase F (*Bgl* II) e GDPase R (*Sal* I) correspondentes ao gene da GDPase de *L. major* (~2073 pb). **b)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto de amplificação do gene da GDPase de *L. major* purificado. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 2) 5  $\mu$ L do produto de amplificação purificado; 3) 5  $\mu$ L do produto de amplificação purificado, eluído pela 2<sup>a</sup> vez na mesma coluna de purificação. **c)** Análise eletroforética em gel de agarose 1% (p/v) do produto de amplificação do gene da GDPase de *L. major* e do plasmídeo pKLAC1 digeridos. Canaletas: 1) Padrão de tamanho molecular Lambda DNA/*EcoR* I/*Hind* III Digest (Promega); 2) 5  $\mu$ L do produto de amplificação clivado com as enzimas *Bgl* II e *Sal* I; 3) 5  $\mu$ L do pKLAC1 clivados com as mesmas enzimas; 4) 1  $\mu$ L do pKLAC1 não clivado. A visualização foi feita com coloração por brometo de etídio sob luz UV.

De acordo com a Figura 2 Painel C, constata-se que o plasmídeo pKLAC1 foi eficientemente clivado, quando comparada a forma digerida (canaleta 3) com a não digerida (canaleta 4). Não foi fracionada uma alíquota do produto de PCR não digerido, porque a quantidade de nucleotídeos liberados durante a clivagem não seriam suficientes para evidenciar uma diferença de tamanho no gel. A estratégia de digestão direta do produto de PCR foi adotada devido à economia de tempo, pela não necessidade de clonagem em um vetor de propagação e passível de execução devido à adição de bases de ancoragem para as enzimas utilizadas nas extremidades 5' dos iniciadores usados. Segundo o manual do fabricante das enzimas (FERMENTAS), a adição de bases extras ao produto de PCR aumenta a eficiência de clivagem em 50-100% para a *Bgl II* com 3 bases extras e em 20-50% para a *Sal I* com duas bases extras. Os produtos da digestão foram purificados.

Os produtos da purificação foram utilizados na reação de ligação que posteriormente foi usada para a transformação das células de *E. coli DH5α*. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB Ágar seletivo para a triagem das células transformantes, com o objetivo de propagar a construção pKLAC1-GDPase. As colônias transformantes foram cultivadas em meio líquido e submetidas à extração do DNA plasmidial e análise do mesmo por PCR para verificação da integração do gene da GDPase no plasmídeo pKLAC1. Pela Figura 3 observa-se o aparecimento do fragmento de DNA referente ao produto de amplificação do gene da GDPase com aproximadamente 2073 pb. Apesar de a banda mostrar-se um pouco abaixo da referência de 2000 pb, provavelmente devido a uma corrida eletroforética não satisfatória.



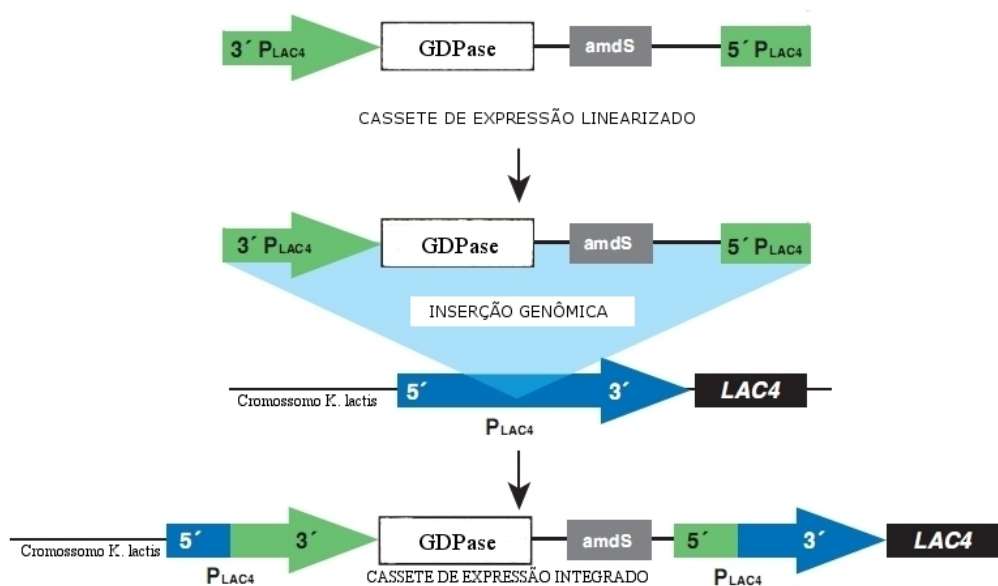
**Figura 3:** VERIFICAÇÃO DA CLONAGEM DO GENE DA GDPase NO PLASMÍDEO pKLAC1. Análise em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x do produto de amplificação do gene da GDPase a partir do plasmídeo pKLAC1 extraído das células transformantes. 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen). 2) 0,5  $\mu$ L do produto de amplificação do gene da GDPase.

As sucessivas tentativas de seqüenciamento da construção pKLAC1-GDPase falharam, e devido a baixa qualidade, os resultados foram impossíveis de serem analisados para obtenção de uma conclusão satisfatória que indicasse a correta integração do gene da GDPase no plasmídeo pKLAC1. Analisando os *primers* da empresa que vêm junto com o kit de expressão, foi possível observar que a *Temperatura de melting* ( $T_m$ ) de ambos os primers de seqüenciamento  $\alpha$ -Mating Factor e pKLAC1 Reverse eram de aproximadamente 44 °C, sendo que as temperaturas de anelamento de 52, 48 e 55 °C utilizadas na reação de PCR no procedimento de seqüenciamento, não tiveram êxito em otimizar o  $T_m$  para obtenção de um resultado satisfatório, logo creditou-se o fracasso das tentativas de seqüenciamento ao baixo valor de  $T_m$  dos *primers* de seqüenciamento  $\alpha$ -Mating Factor e pKLAC1 Reverse do kit, já que esses mesmos *primers* foram resintetizados (mais concentrados 100 pmol/ $\mu$ L) e a amostra reenviada para seqüenciamento, porém os resultados continuaram não conclusivos.

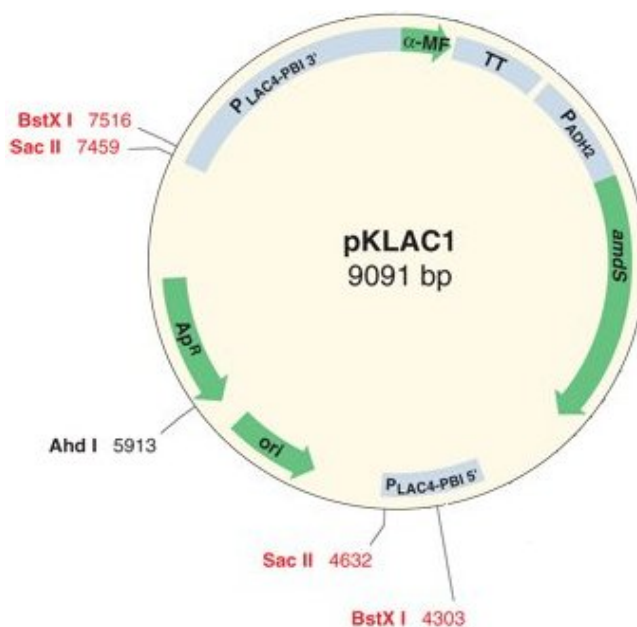
#### **4.2. Transformação das cepas de *K. lactis* CBS 2359**

A construção pKLAC1-GDPase foi linearizada com a enzima *Ahd I* para transformação da linhagem CBS 2359. A linearização resultou em um cassete contendo o gene da GDPase flanqueado pelas regiões 3' $P_{LAC4}$  e 5' $P_{LAC4}$ , que direcionam a integração do cassete por recombinação homóloga na região promotora do gene LAC4, como representado na Figura 4. A recombinação homóloga é importante devido ao fato de reconstituir a seqüência do promotor para que ocorra a expressão da GDPase. Caso contrário, não ocorrerá expressão.

Com relação à linearização do cassete de expressão, é importante ressaltar que duas outras enzimas são recomendadas pelo fabricante para linearização: a *Sac II* e a *BstX I*. Essas enzimas não puderam ser utilizadas devido ao fato de clivarem o gene de interesse. Porém, como pode ser observado na Figura 5, o produto de linearização gerado pela *Ahd I* não leva à perda de fragmentos do pKLAC1, diferentemente da *Sac II*, que libera um fragmento de 2827 pb, e da *BstX I*, que libera um fragmento 3213 pb. Além disso, o manual do pKLAC1 recomenda o uso da enzima *Sac II* e relata ainda que se o gene de interesse contiver sítios para *Sac II*, esse deve ser mutado, sugerindo que é imprescindível a utilização desta enzima. Pelo fato da *Ahd I* gerar um cassete de expressão linearizado maior que as demais enzimas, não se sabe até que ponto esse fato pode interferir na correta integração e reconstituição do promotor  $P_{LAC4}$ .



**Figura 4:** ESQUEMA DA INTEGRAÇÃO DO CASSETE DE EXPRESSÃO NO GENOMA DA *K. lactis*. Cassete de expressão contendo o gene de seleção *amdS* e a seqüência de nucleotídeos referente ao gene da *GDPase*, flanqueado pelas regiões 3'  $P_{LAC4}$  e 5'  $P_{LAC4}$ .



**Figura 5:** PLASMÍDEO pKLAC1 (New England Biolabs). Sítios de restrição das enzimas de linearização *Ahd I*, *Sac II* e *BstX I*.

As leveduras transformantes foram selecionadas em placas de meio YCB contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio. O metabolismo da acetamida é dependente do produto do gene *amdS* presente no cassete. As placas foram incubadas a 30 °C e após 3 dias pôde-se observar o aparecimento dos primeiros transformantes. Como resultado da transformação 5 colônias cresceram vigorosamente após 3 dias de incubação em meio seletivo. Essas colônias foram incubadas em meio YPD líquido para posterior armazenamento de alíquotas a -80 °C e novamente plaqueadas em meio YCB contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio, após o *pellet* ter sido lavado 7 vezes com água ultra pura estéril, com o objetivo de verificar a sua capacidade de crescimento em meio seletivo (Figura 6).

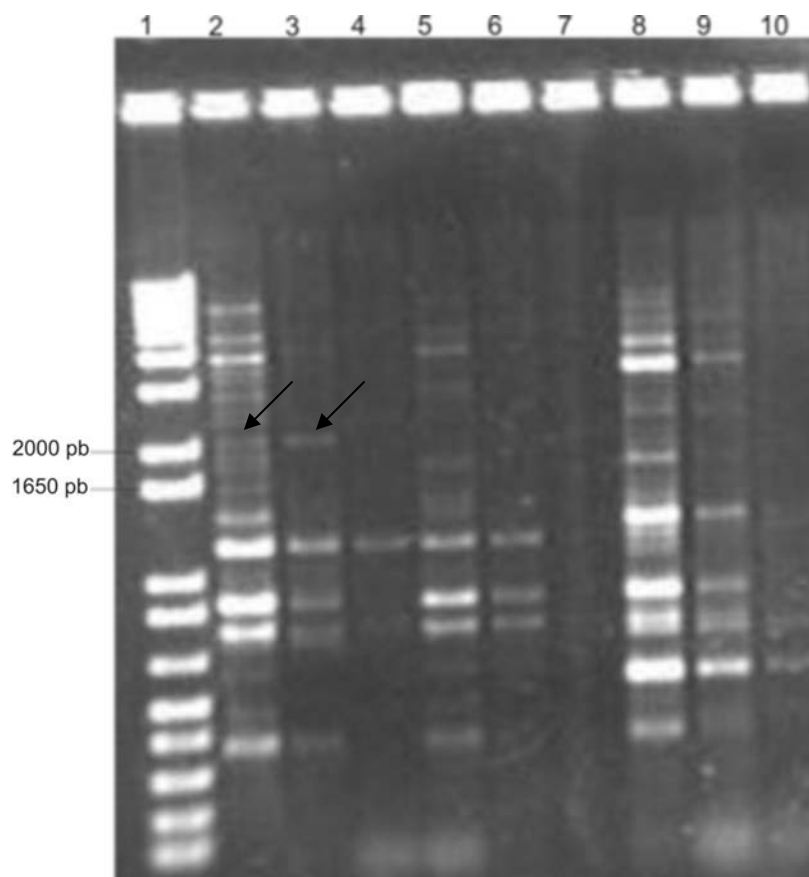


**Figura 6:** TRANSFORMANTE 1. Crescido em meio YCB contendo 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio.

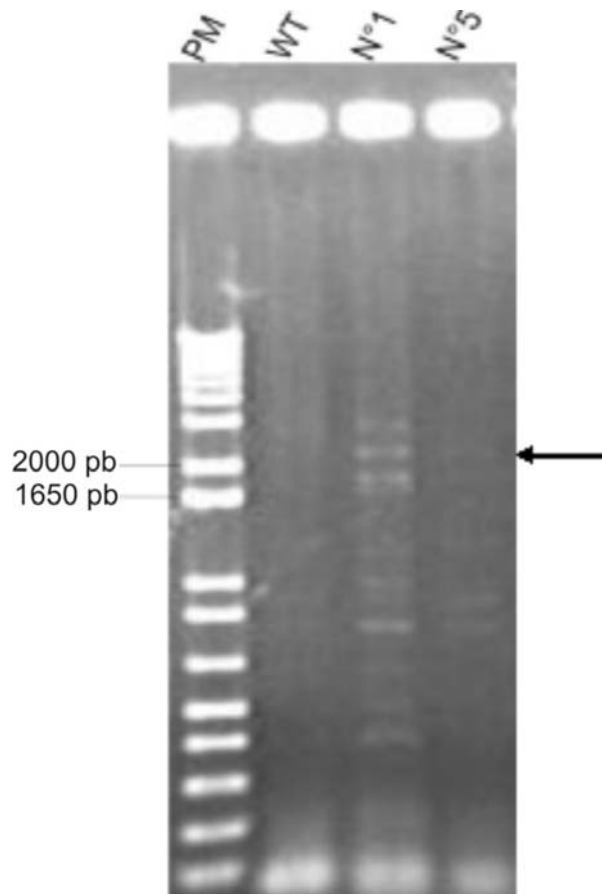
### **4.3. Confirmação da transformação das cepas de *K. lactis* CBS 2359**

#### **4.3.1. PCR para GDPase integrada no genoma da *K. lactis***

Com o objetivo de confirmar a integração do cassete de expressão contendo o gene da GDPase no genoma das linhagens transformantes, o DNA total dos transformantes foi utilizado nas reações de amplificação em gradiente de temperatura de anelamento, com os *primers* GDPase-F e GDPase-R (Figura 7). Como observado na Figura 7, o fragmento de DNA correspondente ao gene da GDPase apareceu nas canaletas correspondentes ao transformante N° 1 quando a temperatura de anelamento foi de 55 e 57 °C, resultado este não observado para o transformante N° 5 e a cepa selvagem. Apesar de o resultado ser promissor, a quantidade de bandas inespecíficas compromete a veracidade da afirmação anterior. Assim sendo, a temperatura de anelamento foi aumentada para 58 °C (Figura 8).



**Figura 7:** VERIFICAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO GENE DA GDPase NO GENOMA DA *K. lactis*. Análise em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x do produto de amplificação do gene da GDPase com gradiente de temperatura no anelamento, usando 1 µg de DNA genômico extraído das células de *k. lactis* transformantes como molde. Canaleta 1) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen). As canaletas 2, 3 e 4 representam a reação de PCR utilizando DNA total do transformante N° 1 com as temperaturas de anelamento de 55, 57 e 60 °C, respectivamente. As canaletas 5, 6 e 7 representam a reação de PCR utilizando DNA total do transformante N° 5 com as temperaturas de anelamento de 55, 57 e 60 °C, respectivamente. As canaletas 8, 9 e 10 representam a reação de PCR utilizando DNA total da WT com as temperaturas de anelamento de 55, 57 e 60 °C, respectivamente. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV.

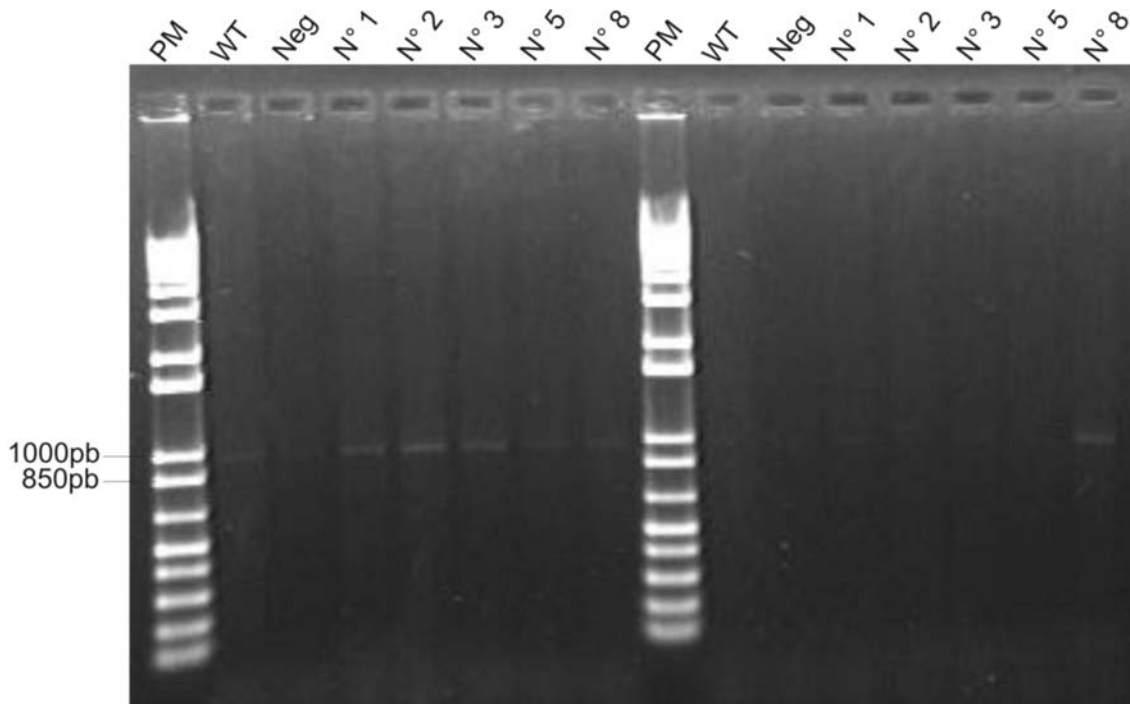


**Figura 8:** VERIFICAÇÃO DA INTEGRAÇÃO DO GENE DA GDPase NO GENOMA DA *K. lactis*. Análise em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x do produto de amplificação do gene da GDPase (~2073 pb), a partir de 1 µg de DNA genômico extraído das células WT (controle negativo) e transformantes N° 1 e N° 5, com uma temperatura de anelamento de 58 °C. PM) Padrão de tamanho molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

Como pode ser observado na análise da Figura 8, um fragmento referente ao produto de PCR proveniente do gene da GDPase (~2073 pb) é visualizado no gel na canaleta referente ao transformante N° 1 e muito fracamente no N° 5, o que não ocorre quando o DNA total utilizado foi o da cepa selvagem (WT). Mesmo com esses dados aparentemente satisfatórios não é possível afirmar com certeza que uma cópia do gene da GDPase encontra-se integrada ao genoma da *K. lactis*. Em parte essa dificuldade de amplificação livre de bandas inespecíficas, deve ser devido ao fato de que os *primers* específicos GDPase-F e GDPase-R tenham uma baixa estrincência e não sejam apropriados para ampliações a partir do DNA genômico, onde a probabilidade de anelamento com uma outra seqüência é maior devido a grande quantidade de DNA, quando comparada à amostra de DNA plasmidial, a partir da qual o gene da GDPase foi originalmente amplificado. Como os *primers* desenhados para isolamento do gene completo e clonagem no vetor de expressão devem ser obrigatoriamente direcionados às regiões 5'e 3'da extremidade do gene, isto limita a possibilidade de variação da posição dos *primers* em relação à qualidade dos mesmos para amplificação. Para resolver este problema foi desenhado um novo par de primers, agora direcionados para um fragmento interno do gene da GDPase: **iGDPase Lm FW** 5'AACA CTTGGAGGGTTTG CAC3'e **iGDPase Lm RV** 5'CTCAGAGCCTTCCAAACAGG 3'. Para este desenho, a seqüência de DNA completa do gene da GDPase foi adicionada ao programa Pick Primers do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), tendo sido escolhido o primeiro par de primers sugerido pelo programa. A Figura 9 evidencia a região de anelamento dos *primers* internos no gene da GDPase, cujo fragmento gerado compreende um produto de 967 pb. Os *primers* internos foram testados primeiramente com temperatura de anelamento de 57 °C (dados não mostrados) o que não levou ao aparecimento do produto de PCR previsto, mas ao aparecimento de inúmeras bandas inespecíficas. Em seguidas as temperaturas de 60 e 65 °C foram testadas simultaneamente levando ao aparecimento do fragmento de 967 pb nos transformantes N° 1, N° 2, N° 3, N° 5, N° 8, bem como no selvagem (Figura 10). Pela análise da Figura 10 é possível propor que a banda referente à cepa selvagem seja devido a contaminação de algum dos componentes do PCR, já que com o aumento da estrincência (65 °C de anelamento) esta praticamente desapareceu. Essa evidencia reforça a hipótese da presença de uma cópia do gene da GDPase no genoma da *K. lactis*.

ATGAGTCGCGTCGTTCTTGCCTTCTTCGCCGCTGTGCTTTTCGTCGTCTTTCTCACGGCGTA  
 CGAAGTCGGCGTTGGCACTGCCAACCCGCTTCAGTCTCGGCACATGCAGCTCACGCAGAACG  
 CCGTGAAGAAGAGTGAGGAAAATCTAGTGAACCTGCCGCGAGGTCAACACGGATTTAAGAAGT  
 GGTGGTGACGTCAATGTTCGCACGGGCGATGGCGGAGATGAGGCGGCAGAGAGAGGAGCTGAT  
 GAACATCGTCGCGCTGGAGCGTGAGCGTGTAGTGTTCGGCGCGTAGTCTGCTGCAGGTTTGGC  
 AGGATGAGCTAGCGAGCGACCTCAGCGTACTCTTCGGTGTTCGCTGACCATAACTTCACTGCG  
 CGCCTCCGGTCGTTGGAGAAAAAGCGGAAACACTTGGAGGGTTTGCACTCGATGCTCAACAC  
GGACCCGTTTGGTGCAGTGCAGCTGCGCAGCAGCAGCGAAATCCGCGCGCTGCAGGCGGCTC  
TCTTTCACGAGATGCGCGCCAGCAAGAAGAAAGCAGAAAACGGTGTGGCGAGCGGCGCGGCG  
TGCGCGAAGTCTTCGGTCAAGTACTCCGTCTGTTCGATATTGGCAGCACTGGAAATCGTGT  
TCATGTCTACAAGTACAGAGTGGCACCTGCCACGCGTACCGCTGCCGCGGCCGGCAGTGAGC  
TCAGCGACATCGACCTCGTCGAGGAGTTATTTGAGCTAAATCACAAAGCCCTTAGCGAGCTC  
GAGAATTCGGTGCAGGATGCGCCGGAGGCTTTATGGGAGCTCTTCGTGAAAGCCAAGGACTT  
TGTACCGGCGGAGCTGCACGCATGCACGGCGGCCGAGTTCAAGGCTACCGCGGGGCTGCGCA  
TGCTGGGGATGGAGAAGGCCAACGAAATTTTGCCGGCATTCGCGCGCGCTACCGCAACGAG  
ACGTTCTGGTTGCGCGGCAACGCATCAGTTCGCATCTTGATGCCTGCGAGGAGGGCCCAAT  
GGCGTGGCTGACAGTAACTACTTACTGGGGCATTCTCCAGGGGTGCAACGGCAACCGACT  
CGACGGTGGCCGTATCGATCTCGGCGGCGGCTCCACGCAAATCGTCTTCGAACCCGGCGAG  
AGCACTTTCACGGGATGCGCACCGATTTCCGCTACGCGGCAACCTTGGGCAGCCGGTCAGT  
GAGAGCCTACCAGCACAGCTACGAAGGCTACGGCCTGCACGCGGCCACCAAGAAGCTGCTTT  
ACCACATAACAAGGCAAGAGCCAAGAGAAGCCGGGCGGTGGCACCGCCACCAACACAGCAATG  
ACGACCACCACGACAGCACCGGCAAACGGCGGTGACGAGGTCTCTGCCTGTTTGAAGGCTCT  
GAGAAACCTGGGTGCAGACGGGAGAAGCGAGCGAGGCGACATCGTCACCAAGAGAGCGCCGC  
 CGATGCCACCGCCAGACGCGGAGGCGATGGAGGCGTTCCCGTGCTTCGCTGTTCGGCTACGAA  
 GACCCACTAGGGGTGAAGAACGTCAAGAGAAACAATGCCGAGGAGCCGGTTATGCCCCGAA  
 CTTCCAGGCTTGC CGAACC'TTTCCGCGATCGGTTGCTGAAGCCAGTGGGGCTGACATGTG  
 AGGCAGTCAACTGCGGCATCGCTGGTGTTCATGCAGCCACCGCTGACCAACTTACCCGGTGAA  
 ATCTACGCGTTTTCGTTTCATCTTTGATCTGCTGGTTTTTGGCGAACAGCTCCCTGGTGCCAGC  
 GGGGGCTGCTGTGTGCGAAGGAAAAGTTTGAGGTGAAGCTGCCGGACCTAGCGAAGATCGCGG  
 AGGGTCACTGCGCCGCCTTCTCCCTACCCGTATCGCCGAGGCGACCGCCAAGGGGGGCTC  
 GGTAGCCTAAAGCCGGAGTACGAGTGTATGTATTACTCCTACGTGTACGCGCTTCTCCGCTA  
 CGGTTACGAGGTGCCAGAGGACCGCGTGTGTCACGTGGCGAAGAAGATCCGCGGCTACGAGA  
 CCGCCTGGTCCCTCGGCGCCTCACTCCTCTCTTACCTAA

**Figura 9:** LOCALIZAÇÃO DA REGIÃO DE ANELAMENTO DOS PRIMERS INTERNOS NO GENE DA GDPase. >gi|157865274|ref|XM\_001681293.1| Leishmania major guanosine diphosphatase. Em azul destaca-se a região de anelamento do primer *iGDPase Lm FW* e em vermelho destaca-se a região de anelamento do primer *iGDPase Lm RV*. A região tracejada indica toda porção a ser amplificada gerando um produto de amplificação de 967 pb.



**Figura 10:** INTEGRAÇÃO DO GENE DA GDPase NO GENOMA DA *K. lactis*. Análise em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x do produto de amplificação do gene da GDPase (967 pb), a partir de 1 µg de DNA genômico extraído das células WT e transformantes N° 1, N° 2, N° 3, N° 5 e N° 8 com temperatura de anelamento de 60 e 65 °C respectivamente. PM) Padrão de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Neg (controle negativo). O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

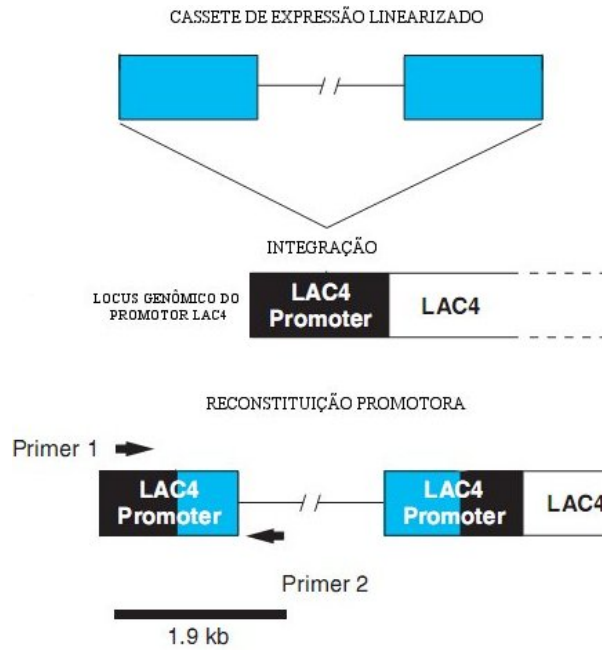
#### 4.3.2. PCR para confirmação da reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> no genoma dos transformantes

Segundo manual do sistema *K. lactis Protein Expression Kit* (New England Biolabs), após a transformação da *K. lactis*, é imprescindível a reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub>, para que este controle a expressão do gene de interesse, como evidenciado na Figura 11. Para verificação desse propósito, o kit contém os *primers* de integração 1 e 2, que devem gerar um produto de PCR de 1.9 kb, confirmando a reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> e a correta integração do cassete de expressão no genoma da levedura.

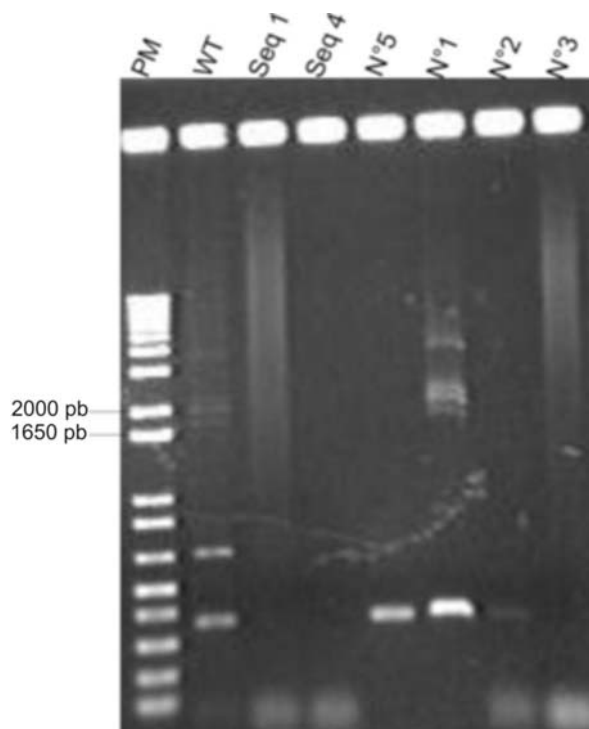
Após diversas tentativas de amplificação utilizando como template o DNA genômico dos transformantes N° 1, N° 2, N° 3 e N° 5 e dos controles positivos Seq 1 e Seq 4 (transformantes com o promotor P<sub>LAC4</sub> reconstituído), bem como da WT (controle negativo), os resultados mostram inúmeros fragmentos inespecíficos visualizados após a amplificação e o não aparecimento de um produto de PCR referente a 1.9 kb, nem mesmo quando da utilização do DNA genômico dos controles positivos Seq 1 e Seq 4, que são transformantes de *K. lactis* que supostamente expressam o peptídeo SBM 7462, obtidos por Santos (2007) (Figura 12).

Como na Figura 12 as reações de amplificação que resultaram em fragmentos de DNA foram aquelas que utilizaram como template o DNA total do transformante N° 1 e da WT, uma nova reação foi realizada com as temperaturas de anelamento 65.2, 65.4, 65.5 e 65.7 °C, com a finalidade de aumentar a estringência do ensaio (Figura 13).

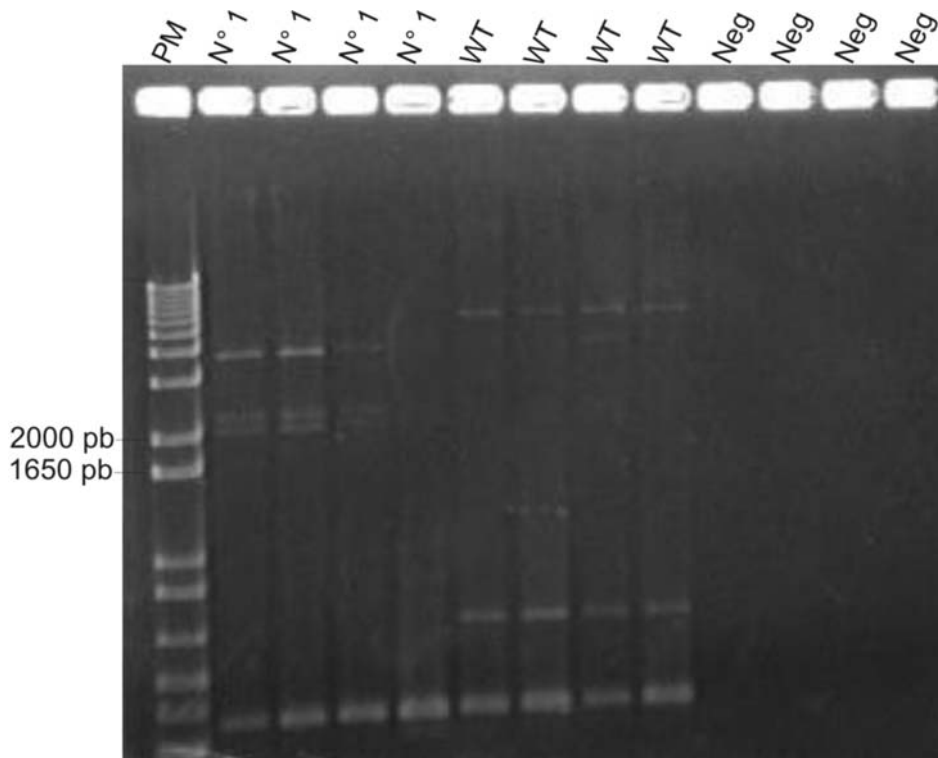
Mesmo após o aumento da estringência, não foi observada na Figura 13 a banda de 1.9 kb indicativa da reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub>. Segundo Uccelletti *et al.* (2007), a *K. lactis* apresenta baixa eficiência para alvos gênicos, com alguns casos reportados onde a integração homóloga ocorre com uma eficiência de menos de 1%. Sendo assim esses resultados podem evidenciar a possibilidade de não ter ocorrido a reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub>, uma vez que esse processo é dependente de uma recombinação homóloga seguida da correta integração do cassete de expressão.



**Figura 11:** Esquema evidenciando a correta integração do cassete de expressão no genoma de *K. lactis*, bem como a reconstituição do promotor  $P_{LAC4}$  responsável por dirigir a expressão do gene de interesse segundo manual do fabricante do kit *K. lactis Protein Expression Kit* (New England Biolabs).



**Figura 12:** VERIFICAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO DO PROMOTOR  $P_{LAC4}$ . Fracionamento em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TBE 0,5x do produto de amplificação do promotor reconstituído  $P_{LAC4}$  a partir de 1  $\mu$ g de DNA genômico extraído das células de *K. lactis* transformantes N° 1, N° 2, N° 3 e N° 5, das cepas de *K. lactis* Seq 1 e Seq 4 e da cepa selvagem (WT). PM) Padrão de tamanho molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen). Temperatura de anelamento de 65 °C.

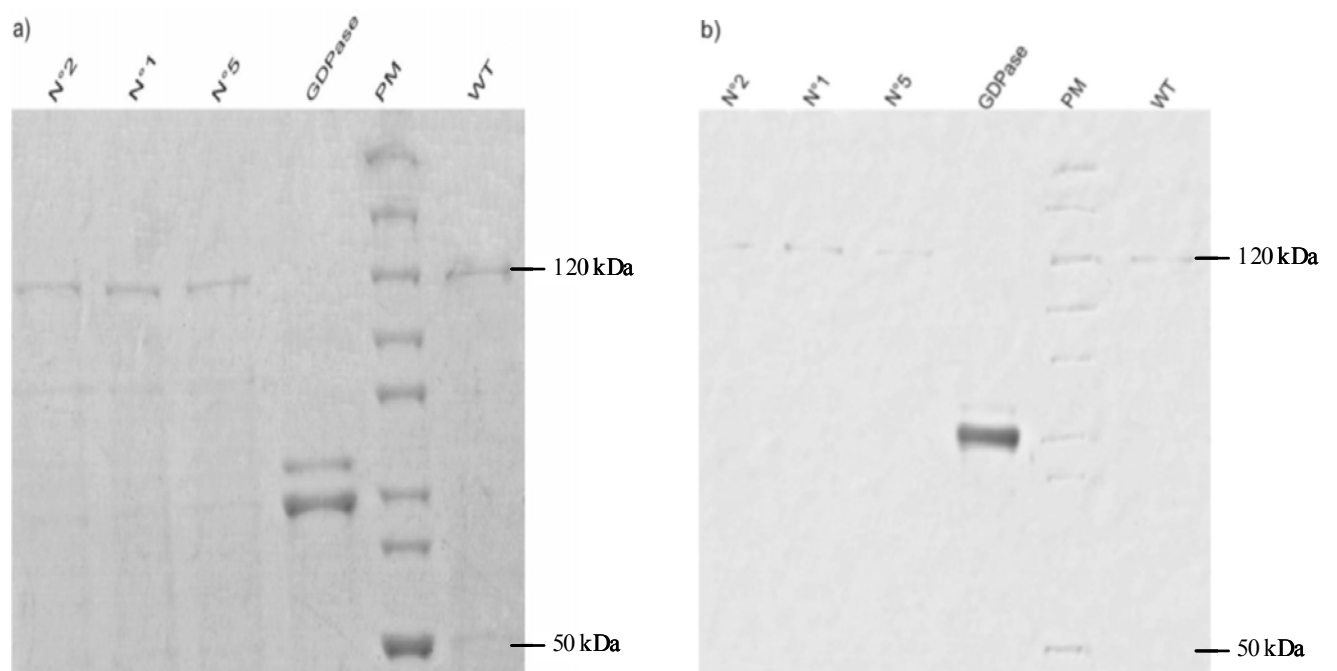


**Figura 13:** VERIFICAÇÃO DA RECONSTITUIÇÃO DO PROMOTOR  $P_{LAC4}$  USANDO TEMPERATURA EM GRADIENTE. Fracionamento em gel de agarose 1% (p/v) do produto de amplificação do promotor reconstituído  $P_{LAC4}$  a partir do DNA genômico extraído das células de *K. lactis* transformante N° 1 e cepa selvagem (WT). As reações relativas as temperaturas de anelamento 65.2, 65.4, 65.5 e 65.7 °C foram aplicadas em ordem crescente no gel. Controle negativo (Neg). O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV.

#### **4.4. Verificação da presença da GDPase de *L. major* no sobrenadante e extrato dos transformantes por Western blotting**

Concomitantemente as tentativas de comprovar a presença do gene da GDPase no genoma da *K. lactis* e a correta integração do cassete de expressão, foi verificado que os transformantes obtidos cresciam vigorosamente em meio seletivo. Assim, foram realizados ensaios preliminares de expressão em meio líquido e indução por galactose de alguns dos transformantes para avaliar a possibilidade da expressão por *Western Blot* usando antisoro policlonal anti-GDPase de *L. major* expressa em sistema bacteriano.

O *Western Blot* (Painel B, Figura 14) revelou uma única banda de aproximadamente 120 kDa tanto para os transformantes N° 5, N° 1 e N° 2, como para a cepa selvagem (WT) e que parece ser uma proteína majoritária no SDS-PAGE (Painel A, Figura 14). Este resultado nos leva a sugerir que não há expressão da proteína heteróloga e sim o reconhecimento de uma proteína da própria levedura que tenha epítomos em comum com a proteína de *L. major* usada na imunização para produção do soro policlonal.



**Figura 14:** VERIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEINA HETERÓLOGA POR SDS-PAGE E WESTERN BLOT DO SOBRENADANTE DAS CULTURAS INDUZIDAS POR 96 h a) Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (p/v) SDS-PAGE b) Western blot usando antisoro policlonal anti-GDPase de *L.major*, das amostras de sobrenadante dos transformantes N° 5, N° 1 e N° 2 e da cepa selvagem (WT) cultivadas sob condições de indução em meio YPGal por 96H horas. Como controle foram usados 1 µg da proteína GDPase de *L. major* recombinante purificada, expressa em *E. coli*. O antisoro primário produzido em coelho foi usado na diluição 1:2000 e o conjugado anti IgG de coelho-peroxidase (SIGMA) foi usado 1:20000.

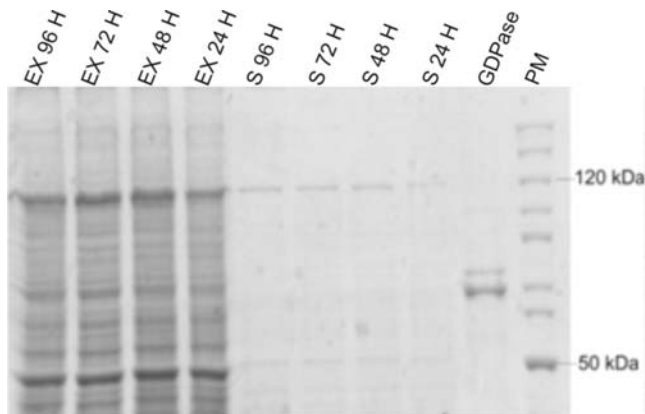
Com base na Figura 14, suspeita-se que a proteína identificada seja uma proteína de *K. lactis*, passível de reconhecimento pelo anti-soro anti-GDPase de leishmania (anticorpo primário), produzido a partir da GDPase de *L. major* expressa em *E. coli*. Esse resultado leva à conclusão de que não houve a correta integração do cassete de expressão no genoma da levedura, o que é reforçado pelo mesmo perfil de banda apresentado tanto para os transformantes como para a célula selvagem quando da análise do *Western Blot*. Sabe-se que a similaridade de aminoácidos do domínio catalítico de diferentes apirases é especificamente alta em cinco regiões conservadas, chamadas “Apyrase Conserved Regions” (ACRs) (Yang *et al.*, 2001). Como o anti-soro produzido em coelho a partir da GDPase de *L. major* reconheceu muito bem uma proteína de aproximadamente 120 kDa na cepa selvagem de *K. lactis*, resolveu-se pesquisar sobre a presença de proteínas homólogas em *K. lactis*. Segundo Lopez-Avalos *et al.* (2001) e Uccelletti *et al.* (2007), *K. lactis* contém duas apirases conhecidas como KIGDA1 e KIYND1, ambas com atividade GDPase localizadas no lúmen do aparato de golgi, envolvidas no processo de manosiilação terminal de proteínas e lipídios. Logo existe a possibilidade das proteínas KIGDA1 e KIYND1 estarem sendo transportadas para o meio extracelular, levando ao reconhecimento de tais proteínas pelo anti-soro primário anti-leishmania, em detrimento da GDPase de *L. major*, que pode não estar sendo secretada, permanecendo retida intracelularmente. Para verificar esta hipótese foram realizados novos experimentos. Portanto análises em *Western Blot* e SDS-PAGE foram realizadas usando amostras de células selvagens (WT) e transformadas (transformante N° 5), induzidas por diferentes tempos e avaliando amostras do sobrenadante e do extrato protéico total de células rompidas. Estes resultados são apresentados nas Figuras 15 e 16.

Como pode ser observada na Figura 15, a banda supostamente referente à apirase de *K. lactis* selvagem mantém o mesmo perfil eletroforético nos diferentes tempos de indução tanto no extrato celular como no sobrenadante. No tempo de 24 horas a banda pode ser visualizada no gel, mas não no *Western Blot*, devido a problemas de digitalização e pelo fato de estar muito delgada, porém na membrana original ela pôde ser observada. Segundo Rodríguez *et al.* (2006), a viabilidade celular da *K. lactis* permanece em aproximadamente 100% mesmo depois de 80 a 100 horas de crescimento em meio completo. Levando-se em consideração que em 24 horas de crescimento a cultura celular de *K. lactis* ainda se mantém em fase log de crescimento (dados não mostrado), de alguma forma as proteínas KIGDA1 e KIYND1 parecem estar sendo transportadas para o sobrenadante da cultura, apesar de estarem descritas

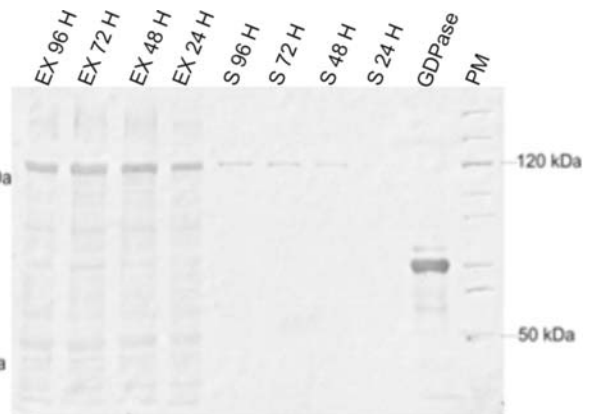
originalmente como presentes no complexo de Golgi, sendo esse transporte aparentemente não decorrente de morte celular.

A análise da figura 16 revela que o transformante N° 5 apresenta o mesmo perfil de banda reconhecida no *Western Blot* da cepa selvagem. Porém quando se analisa o extrato no *Western Blot*, observa-se que logo abaixo da banda de 120 kDa uma possível outra banda parece revelar-se. Seria o caso da banda referente à GDPase de *L. major* estar sobreposta pela banda referente a proteína nativa de *K. lactis*, uma vez que o SDS-PAGE foi realizado em mini-gel, logo não havendo tempo hábil para a separação das respectivas bandas, provavelmente com perfil eletroforético muito similar. Sendo assim um novo SDS-PAGE foi realizado em max-gel, com o objetivo de separar as bandas devido a um maior tempo de corrida em gel de poliacrilamida.

a)

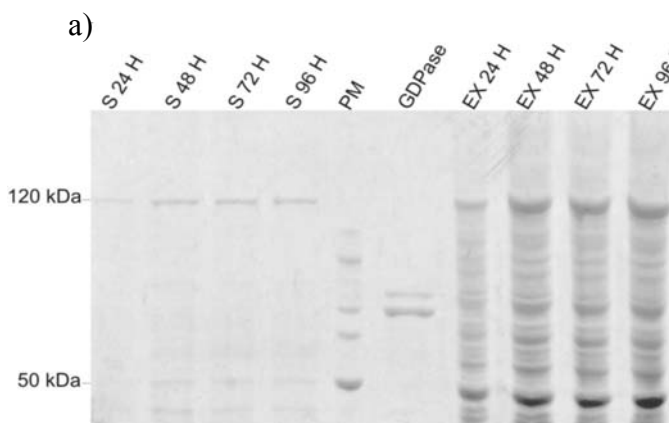


b)

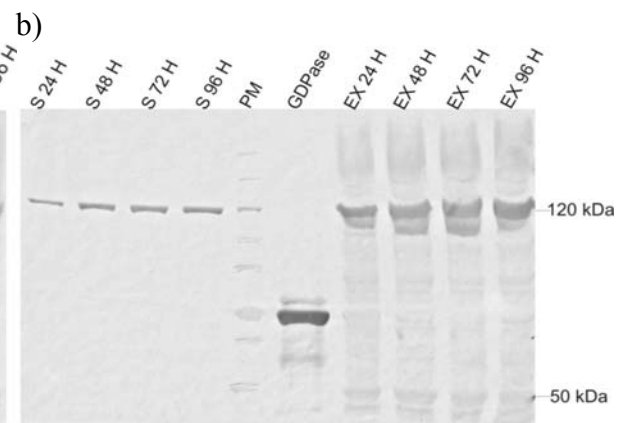


**Figura 15:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS À GDPase DE *L.major* NA CEPA SELVAGEM DE *K. lactis* a) SDS-PAGE das amostras de sobrenadante (S) e extrato protéico (EX) da cepa selvagem cultivada em meio YPGal b) Western blot das proteínas presentes no sobrenadante (S) e no extrato protéico (EX) da cepa selvagem (WT) cultivada em meio YPGal. Como controle positivo foi usada uma alíquota de 1  $\mu$ g da GDPase de *L. major* expressa em *E. coli* e purificada.

a)

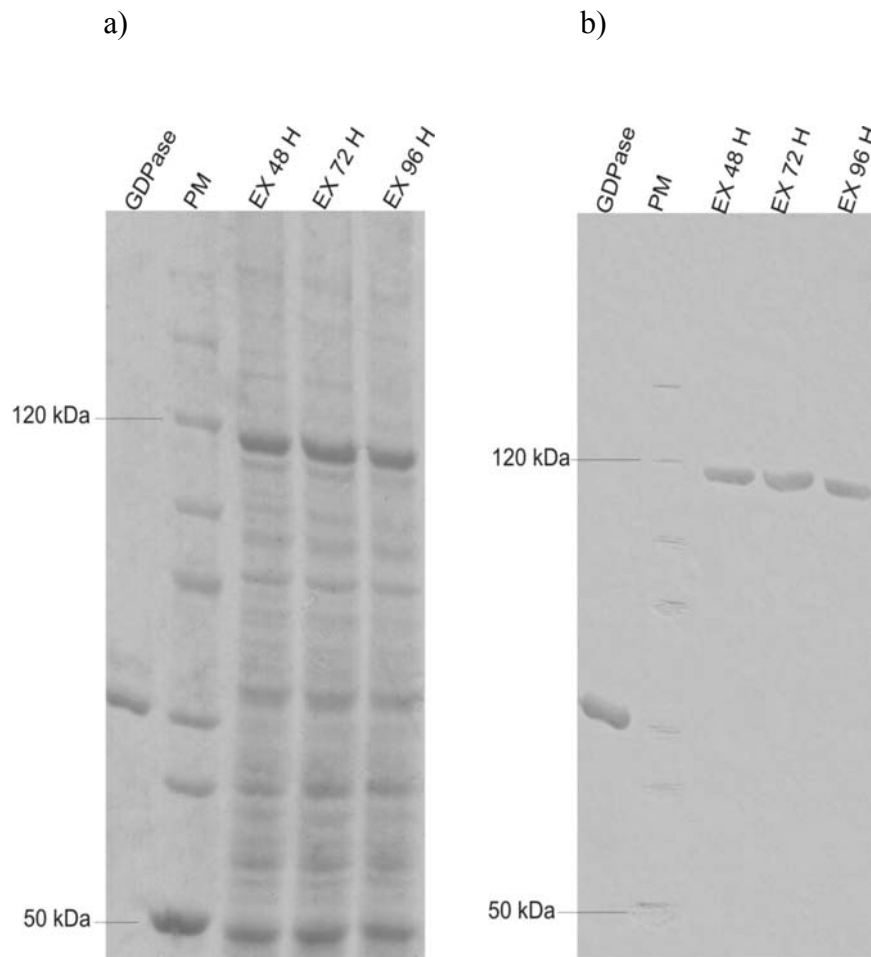


b)

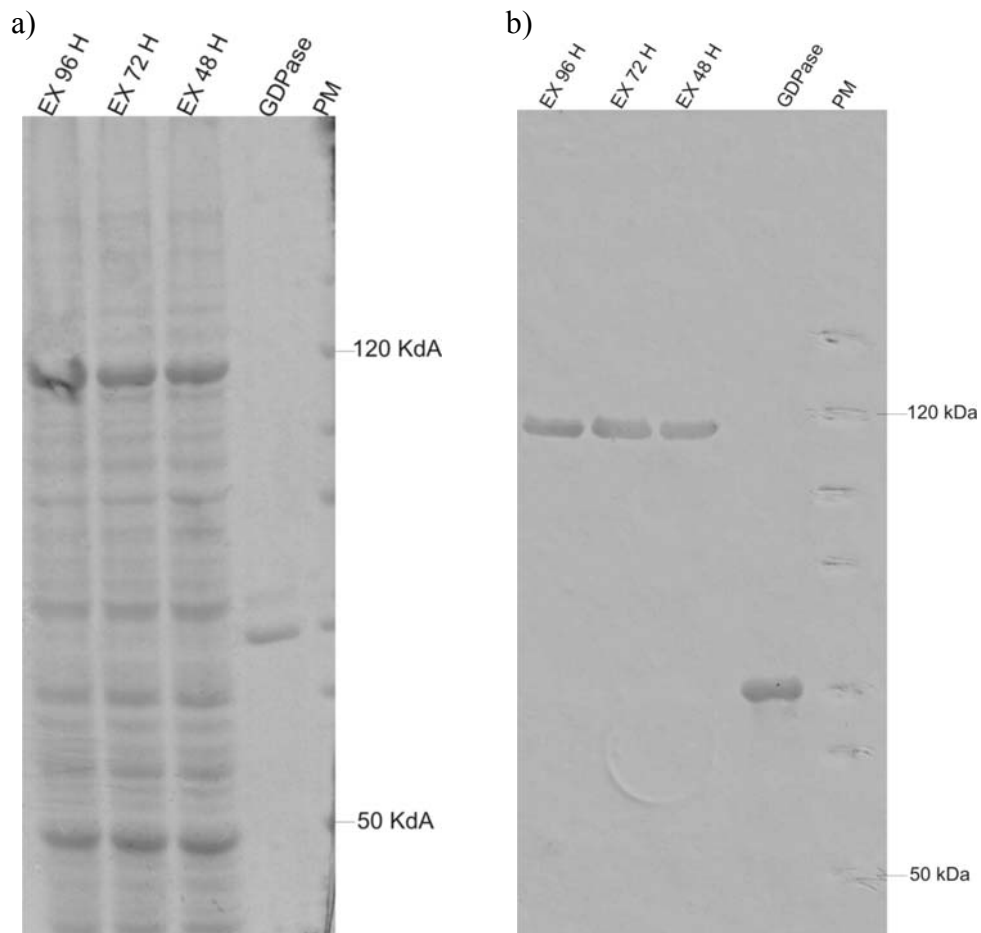


**Figura 16:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS À GDPase DE *L.major* NO TRANSFORMANTE DE *K. lactis* N°5 a) SDS-PAGE das amostras de sobrenadante (S) e extrato protéico (EX) da cepa transformante N° 5 cultivada em meio YPGal b) *Western Blot* das proteínas presentes no sobrenadante (S) e no extrato protéico (EX) da cepa transformante N° 5 cultivada em meio YPGal. Como controle positivo foi usada uma alíquota de 1  $\mu$ g da GDPase de *L. major* expressa em *E. coli* e purificada.

Foram realizadas novas análises por SDS-PAGE e *Western Blot*, agora com melhor definição de separação de bandas em gel de tamanho médio (Figuras 17 e 18). Analisando-se as Figuras 17 e 18, observa-se que o perfil de bandas permaneceu o mesmo, nenhuma outra banda foi revelada no Western blot referente ao transformante N° 5 que possa diferir da banda de aproximadamente 120 kDa. Conseqüentemente, os resultados revelaram que a hipótese anterior não procedia: não haviam bandas sobrepostas e a banda de 120 kDa provavelmente refere-se a uma apirase de *K. lactis*, provavelmente uma das proteínas K1GDA1 e K1YND1; descartando assim a possibilidade da expressão do gene da GDPase de *L. major* em *K. lactis* ter sido eficiente e sugerindo que a proteína reconhecida pelo *Western Blot*, agora com um pouco menos de 120 kDa deve mesmo ser relativa a alguns ou ambos os homólogos nesta levedura.



**Figura 17:** PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO EXTRATO DA WT COM MAIOR TEMPO DE CORRIDA a) SDS-PAGE em max-gel das proteínas presentes no extrato protéico da cepa selvagem (WT), cultivadas sob condições de indução em meio YPGal nos tempos 48, 72 e 96 horas. b) *Western Blot* das proteínas presentes no extrato protéico (EX) da cepa selvagem cultivada sob condições de indução em meio YPGal. Como controle positivo foi usada uma alíquota de 1  $\mu$ g da GDPase de *L. major* expressa em *E. coli* e purificada.



**Figura 18:** PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS PRESENTES NO EXTRATO DO TRANSFORMANTE N° 5 COM UM MAIOR TEMPO DE CORRIDA a) SDS-PAGE em max-gel das proteínas presentes no extrato protéico do transformante N° 5 cultivado sob condições de indução em meio YPGal nos tempos 48, 72 e 96 horas. b) *Western Blot* das proteínas presentes no extrato protéico (EX) do transformante N° 5 cultivado sob condições de indução em meio YPGal. Como controle positivo foi usada uma alíquota de 1 µg da GDPase de *L. major* expressa em *E. coli* e purificada.

A análise da Figura 19 revela a presença das “Apyrase Conserved Regions” (ACRs) nas diferentes seqüências de apirases selecionadas e disponíveis no banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). As ACRs estão presentes nas apirases do complexo de Golgi de *K. lactis* (KIGDA1 e KIYND1) e essa evidência reforça a possibilidade de que tais proteínas sejam a mesma proteína de 120 kDa identificada por Wester blot nas cepas selvagem e transformantes de *K. lactis*.

Apesar das evidências experimentais apontarem para o insucesso na tentativa de clonagem do gene da GDPase de *L. major* em *K. lactis*, a literatura continua a apontar a *K. lactis* como potencial hospedeira para produção de proteínas heterólogas. Assim sendo, novas estratégias de clonagem podem ser adotadas, inclusive com a possibilidade de modificações no atual kit de expressão, uma vez que as dificuldades no processo de clonagem parecem advir desse sistema. Além disso, nossos dados revelaram o possível tamanho das apirases do complexo de Golgi de *K. lactis* (KIGDA1 e KIYND1) e novos experimentos podem evidenciar a dinâmica dessas proteínas.



```

K_lactis_gi_122 SANWCKVSEV-----
K_lactis_gi_496 SANWCKVSEV-----
K_lactis_gi_503 SANWCKVSEV-----
GPAI_XM7A_gi_4 SANWCKVSEV-----
K_lactis_gi_496 GLVYAGDASATVQDNPSPND EERDGGDFCPGALISLGGPVVHNASFGVSLRQIIEHFICSLVLSGIIYICRFPFALGPPFERRIFGGIWA
K_lactis_gi_406 GLVYAGDASATVQDNPSPND EERDGGDFCPGALISLGGPVVHNASFGVSLRQIIEHFICSLVLSGIIYICRFPFALGPPFERRIFGGIWA
K_lactis_gi_5_6 GLVYAGDASATVQDNPSPND EERDGGDFCPGALISLGGPVVHNASFGVSLRQIIEHFICSLVLSGIIYICRFPFALGPPFERRIFGGIWA
GDPase_L.major_
NTPDase_L.major_
consensus
741.....730.....740.....750.....760.....770.....780.....790.....800.....

K_lactis_gi_122
K_lactis_gi_496
K_lactis_gi_503
GPAI_XM7A_gi_4
K_lactis_gi_496 VRTSPCKLRTYSILAQEEMLGRLEEGTWRGCFQGIEMNSGIFRSRSMKMLGDSLESDSTPLSDRREKNTSLPQCKLQVYKNAQFS
K_lactis_gi_406 VRTSPCKLRTYSILAQEEMLGRLEEGTWRGCFQGIEMNSGIFRSRSMKMLGDSLESDSTPLSDRREKNTSLPQCKLQVYKNAQFS
K_lactis_gi_5_6 VRTSPCKLRTYSILAQEEMLGRLEEGTWRGCFQGIEMNSGIFRSRSMKMLGDSLESDSTPLSDRREKNTSLPQCKLQVYKNAQFS
GDPase_L.major_
NTPDase_L.major_
consensus
811.....820.....830.....840.....850.....860.....870.....880.....890.....

K_lactis_gi_122
K_lactis_gi_496
K_lactis_gi_503
GPAI_XM7A_gi_4
K_lactis_gi_496 KFRNTYRD
K_lactis_gi_406 KFRNTYRD
K_lactis_gi_5_6 KFRNTYRD
GDPase_L.major_
NTPDase_L.major_
consensus
901.....

```

**Figura 19:** Alinhamento das seqüências das apirases de *K. lactis* juntamente com as apirases de *L. major*. Em verde estão os aminoácido completamente conservados, em amarelo estão os resíduos idênticos, em azul estão os resíduos similares e em branco os completamente diferentes. As caixas vermelhas identificam as regiões conservadas de apirases (ACRs- 1 à 5). Os números de acesso nos bancos de dados são: **gi|12214255|**(guanosine diphosphatase [*Kluyveromyces lactis*]strain MG1/2), **gi|49644973** (KLLA0F16863p [*Kluyveromyces lactis*] NRRL Y-1140 chromosome="F" Locus:KLLA-ORF1021), **gi|50311623|**(unnamed protein product [*Kluyveromyces lactis*] chromosome="F" locus\_tag="KLLA0F16863g"), **gi|46395993** (Full=Guanosine-diphosphatase; Short=GDPase [KIGda1]STRAIN=ATCC 201343/MG1/2 locus\_tag="KLLA0F16863g"), **gi|49642806** (KLLA0D13662p [*Kluyveromyces lactis*] strain="NRRL Y-1140" old\_locus\_tag="KLLA-ORF5529" chromosome="D"), **gi|40644057** (apyrase K1Ynd1 [*Kluyveromyces lactis*]), **gi|50307387** (unnamed protein product [*Kluyveromyces lactis*] *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-1140 chromosome="D" locus\_tag="KLLA0D13662g")**gi|15487213|**(guanosine diphosphatase [*Leishmania major*]) e **gi|45120584|**(putative NTPDase [*Leishmania major*]). Alinhamento realizado no programa ClustalW dentro do programa MEGA usando diferentes parâmetros de abertura e extensão de "gap". A divergência máxima foi fixada em 85% e o alinhamento direcionado de modo a alinhar corretamente as ACRs. A visualização do alinhamento foi feita pelo WorkBench (ferramenta Boxshade) usando condições padrão.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho a seqüência de 2073 pb, relativa à região codificante da GDPase de *L. major*, foi amplificada e isolada a partir da reação de PCR que utilizou o plasmídeo pET21b-GDPase-*L.major* como DNA molde. Este amplicon foi inserido no plasmídeo pKLAC1 com a finalidade de obter um sistema de expressão e secreção desta proteína em *Kluyveromyces lactis*. Como o inserto clonado não pôde ser seqüenciado, devido as dificuldades relacionadas aos primers de seqüenciamento, para verificação da sua identidade e integridade com a região codificadora do gene da GDPase, este ponto constitui uma das perspectivas deste trabalho.

A construção pKLAC1-GDPase, confirmada por PCR, foi usada para transformar a cepa de *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. Foram obtidos 5 transformantes com capacidade de crescimento em acetamida como única fonte de nitrogênio (característica conferida pelo pKLAC1). Os transformantes analisados por PCR quanto à reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> não apresentaram a banda de 1.9 kb referente à correta remontagem do promotor, porém não existe no *kit* de expressão um procedimento para mostrar que esta reação de PCR funcione com os *primers* que são disponibilizados no *kit*, por exemplo com algum controle positivo para esta reação. Por isto, foi feita uma reconstituição *in silico* do que seria a região promotora reconstituída (Anexo 1) e foram desenhados novos primers para verificação da reconstituição do promotor e estes deverão ser testados em transformantes de *K. lactis* que foram citados anteriormente como capazes de expressar proteínas heterólogas (Santos, 2007; Rosa, 2007). Uma vez que se obtenha um controle positivo para verificação da reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> utilizando os novos *primers* e as amostras controle positivo, esses novos *primers* serão utilizados para verificar se houve ou não a correta integração nos transformantes contendo o gene da GDPase de *L. major*.

A verificação da presença do gene da GDPase no genoma dos transformante não pôde ser constatada devido ao grande número de bandas inespecíficas geradas pela amplificação utilizando os *primers* GDPase F (Bgl II) e GDPase R (Sal I) e pela possível contaminação da reação que utilizou os primers internos levando ao aparecimento do fragmento referente a GDPase no genoma da cepa selvagem. Apesar disso, os dados indicam uma possível cópia do gene da GDPase no genoma dos transformante N° 1, N° 2, N° 3, N° 5 e N° 8.

Cinco transformantes apresentaram ampla capacidade de crescimento no meio seletivo YCB com 5 mM de acetamida como única fonte de nitrogênio, mas não expressaram a GDPase de *L. major*, quando analisados por *Western Blot*. Esse dado revela uma deficiência do sistema *K. lactis Protein Expression Kit* (New England Biolabs), uma vez que o gene de seleção *amdS* é dirigido por um promotor constitutivo ( $P_{ADH2}$ ) e a *K. lactis* apresenta uma alta tendência a recombinação ectópica, sendo a integração de moléculas não homologas no genoma cerca de 1000 vezes mais freqüente do que em *S. cerevisiae* (Kegel *et al.*, 2006). Assim, muitos transformantes que cresceram no meio de seleção (pela expressão do *amdS*) não irão expressar o gene de interesse, devido a uma incorreta integração.

Outra característica desfavorável ao kit é que o êxito na expressão do gene de interesse depende de uma recombinação homóloga que conduza a correta integração do cassete de expressão para proporcionar a reconstituição do promotor  $P_{LAC4}$ . Porém, segundo Uccelletti *et al.* (2007), a *K. lactis* apresenta baixa eficiência para alvos gênicos, com casos reportados onde a integração homóloga ocorreu com uma eficiência de menos de 1%. Sendo assim, essa característica foi mais um ponto desfavorável para o sucesso do experimento.

As análises por *Western blot* que foram feitas concomitantemente às tentativas de comprovação da correta inserção do cassete de expressão, revelaram que o anti-soro produzido contra a GDPase de *L. major* reconhece muito bem uma proteína de aproximadamente 120 kDa natural na cepa selvagem de *K. lactis*. Sendo que essa proteína provavelmente deve ser relativa às apirases do complexo de Golgi: KIGDA1 e KIYND1, que já foram descritas (Lopez-Avalos *et al.*, 2001; Uccelletti *et al.*, 2007). O alinhamento reforçou essa possibilidade, mostrando a presença das “Apyrase Conserved Regions” (ACRs) nas apirases KIGDA1 e KIYND1. Para comprovar melhor este dado e gerar dados para uma publicação iremos como perspectiva deste trabalho mostrar a secreção da atividade ecto-nucleotidásica e mostrar a ecto-localização por microscopia confocal.

Apesar do anti-soro primário não ser composto por anticorpos monoclonais e das seqüências conservadas entre apirases de diferentes espécies, o reconhecimento cruzado foi muito específico e acentuado. Esse resultado pode levantar a hipótese de que a cepa selvagem possa ser testada quanto à indução da produção de anticorpos contra a leishmania. Logo estudos são necessários para verificar o potencial uso da apirase nativa da *K. lactis* em interesses biotecnológicos. Porém é possível também que sendo os epítomos reconhecidos no *Western Blot* direcionados somente às regiões conservadas entre as apirases (ACRs) estes não

gerem resposta imune nos hospedeiros vertebrados que também possuem proteínas homólogas desta família.

Como perspectivas futuras, o plasmídeo pKALC1 deve ser remodelado, tendo parte da porção do promotor  $P_{LAC4-PBI}$  3' substituída pelo promotor constitutivo  $P_{ADH2}$ , onde o  $P_{ADH2}$  será amplificado a partir do pKLAC1 e clonado no sitio entre as enzimas Hind III e SnaB I no próprio pKLAC1, evitando assim a necessidade de reconstituição correta do promotor  $P_{LAC4}$ . Sendo também estudada a troca do gene de seleção, por exemplo por geneticina, bem como a diminuição do tamanho do plasmídeo, que atualmente é de 9091 pb, o que pode acarretar em problemas como recombinações no processo de transformação das células de *E. coli*.

A troca do gene de expressão da GDPase de *L. major* para NTPDase de *Leishmania braziliensis* também é outra possibilidade, já que as apirases de *L. braziliensis* são mais apropriada para formulação de uma vacina e sua seqüência nucleotídica não contém sítios de restrição para a enzima *Sac II* utilizada para linearização do plasmídeo e recomendada pelo manual do kit de expressão do pKLAC1.

Assim a principal conclusão deste trabalho está relacionada com o fato de o sistema de expressão em *K. lactis* baseado no pKLAC1 conter falhas que tornam seu uso comprometido, porém o trabalho aponta também as principais modificações que podem ser feitas no vetor de expressão para que o sistema seja melhor adaptado ao papel biotecnológico que propõe.

## 7. REFERÊNCIAS

- Asai, T., Miura, S., Sibley, L. D., Okabayashi, H., and Takeuchi, T. (1995): Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **270**, 11391-7.
- Asai, T., Takeuchi, T., Diffenderfer, J., and Sibley, L. D. (2002): Identification of small-molecule inhibitors of nucleoside triphosphate hydrolase in *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2393-9.
- Barros, F. S., De Menezes, L. F., Pinheiro, A. A., Silva, E. F., Lopes, A. H., De Souza, W., and Meyer-Fernandes, J. R. (2000): Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in *Entamoeba histolytica*. *Arch Biochem Biophys* **375**, 304-14.
- Bartkeviciute, D., and Sasnauskas, K. (2004): Disruption of the MNN10 gene enhances protein secretion in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**, 833-40.
- Bartkeviciute, D., and Sasnauskas, K. (2004): Disruption of the MNN10 gene enhances protein secretion in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **4**, 833-40.
- Belem, M. A., and Lee, B. H. (1998): Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. *Crit Rev Food Sci Nutr* **38**, 565-98.
- Berredo-Pinho, M., Peres-Sampaio, C. E., Chrispim, P. P., Belmont-Firpo, R., Lemos, A. P., Martiny, A., Vannier-Santos, M. A., and Meyer-Fernandes, J. R. (2001): A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys* **391**, 16-24.
- Bhat, P. J., and Murthy, T. V. (2001): Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Mol Microbiol* **40**, 1059-66.
- Borges, F. P., de Brum Vieira, P., Wiltuschnig, R. C., Tasca, T., De Carli, G. A., and Bonan, C. D. (2008): Characterization of nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity

in *Trichomonas gallinae* and the influence of penicillin and streptomycin in extracellular nucleotide hydrolysis. *FEMS Microbiol Lett* **283**, 189-95.

Borja-Cabrera, G. P., Correia Pontes, N. N., da Silva, V. O., Paraguai de Souza, E., Santos, W. R., Gomes, E. M., Luz, K. G., Palatnik, M., and Palatnik de Sousa, C. B. (2002): Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine* **20**, 3277-84.

Bours, M. J., Swennen, E. L., Di Virgilio, F., Cronstein, B. N., and Dagnelie, P. C. (2006): Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* **112**, 358-404.

Breunig, K. D., Dahlems, U., Das, S., and Hollenberg, C. P. (1984): Analysis of a eukaryotic beta-galactosidase gene: the N-terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *Escherichia coli* lacZ gene product. *Nucleic Acids Res* **12**, 2327-41.

Burnstock, G. (2006): Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S172-81.

Burnstock, G. (2008): Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 575-90.

Cabrera, G. P., Da Silva, V. O., Da Costa, R. T., Reis, A. B., Mayrink, W., Genaro, O., and Palatnik-de-Sousa, C. B. (1999): The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **61**, 296-301.

Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., and Boelaert, M. (2007): Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**, 873-82.

Chen, X., Gao, B., Shi, W., and Li, Y. (1992): [Expression and secretion of human interferon alpha A in yeast *Kluyveromyces lactis*]. *Yi Chuan Xue Bao* **19**, 284-8.

- Colussi, P. A., and Taron, C. H. (2005): Kluyveromyces lactis LAC4 promoter variants that lack function in bacteria but retain full function in K. lactis. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7092-8.
- Dantas-Torres, F. (2006): Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet Parasitol* **141**, 1-8.
- Dantas-Torres, F. (2007): The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. *Vet Parasitol* **149**, 139-46.
- de Aguiar Matos, J. A., Borges, F. P., Tasca, T., Bogo, M. R., De Carli, G. A., da Graca Fauth, M., Dias, R. D., and Bonan, C. D. (2001): Characterisation of an ATP diphosphohydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) activity in Trichomonas vaginalis. *Int J Parasitol* **31**, 770-5.
- de Almeida Marques-da-Silva, E., de Oliveira, J. C., Figueiredo, A. B., de Souza Lima Junior, D., Carneiro, C. M., Rangel Fietto, J. L., and Crocco Afonso, L. C. (2008): Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect* **10**, 850-7.
- Dombrowski, K. E., Ke, Y., Brewer, K. A., and Kapp, J. A. (1998): Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev* **161**, 111-8.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G. F., Straub, M. L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaiia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C.,

- Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., and Souciet, J. L. (2004): Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44.
- Fietto, J. L., DeMarco, R., Nascimento, I. P., Castro, I. M., Carvalho, T. M., de Souza, W., Bahia, M. T., Alves, M. J., and Verjovski-Almeida, S. (2004): Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* **316**, 454-60.
- Fleer, R., Chen, X. J., Amellal, N., Yeh, P., Fournier, A., Guinet, F., Gault, N., Faucher, D., Folliard, F., Fukuhara, H., and et al. (1991): High-level secretion of correctly processed recombinant human interleukin-1 beta in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **107**, 285-95.
- Ghaly, A. E., and Kamal, M. A. (2004): Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Res* **38**, 631-44.
- Gomes, A. H., Ferreira, I. M., Lima, M. L., Cunha, E. A., Garcia, A. S., Araujo, M. F., and Pereira-Chiocola, V. L. (2007): PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol* **144**, 234-41.
- Gounaris, K., and Selkirk, M. E. (2005): Parasite nucleotide-metabolizing enzymes and host purinergic signalling. *Trends Parasitol* **21**, 17-21.
- Haag, F., Adriouch, S., Brass, A., Jung, C., Moller, S., Scheuplein, F., Bannas, P., Seman, M., and Koch-Nolte, F. (2007): Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal* **3**, 71-81.
- Hill, J., Donald, K. A., and Griffiths, D. E. (1991): DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* **19**, 5791.
- Hsieh, H. B., and Da Silva, N. A. (2000): Development of a LAC4 promoter-based gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Bioeng* **67**, 408-16.
- Hsieh, H. B., and Da Silva, N. A. (2000): Development of a LAC4 promoter-based gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Bioeng* **67**, 408-16.

- Hua, Z., Liang, X., and Zhu, D. (1994): Expression and purification of a truncated macrophage colony stimulating factor in *Kluyveromyces lactis*. *Biochem Mol Biol Int* **34**, 419-27.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.
- Iwata, T., Tanaka, R., Suetsugu, M., Ishibashi, M., Tokunaga, H., Kikuchi, M., and Tokunaga, M. (2004): Efficient secretion of human lysozyme from the yeast, *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnol Lett* **26**, 1803-8.
- Jablonowski, D., and Schaffrath, R. (2007): Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans* **35**, 1533-7.
- Jeske, S., Tiggemann, M., and Meinhardt, F. (2006): Yeast autonomous linear plasmid pGKL2: ORF9 is an actively transcribed essential gene with multiple transcription start points. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 321-7.
- Kegel, A., Martinez, P., Carter, S. D., and Astrom, S. U. (2006): Genome wide distribution of illegitimate recombination events in *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res* **34**, 1633-45.
- Kellis, M., Birren, B. W., and Lander, E. S. (2004): Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-24.
- Lemos, E. M., Laurenti, M. D., Moreira, M. A., Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Raychaudhuri, S., and Dietze, R. (2008): Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop* **107**, 205-7.
- Lopez-Avalos, M. D., Uccelletti, D., Abeijon, C., and Hirschberg, C. B. (2001): The UDPase activity of the *Kluyveromyces lactis* Golgi GDPase has a role in uridine nucleotide sugar transport into Golgi vesicles. *Glycobiology* **11**, 413-22.
- Maioli, T. U., Takane, E., Arantes, R. M., Fietto, J. L., and Afonso, L. C. (2004): Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol Res* **94**, 207-12.

- Manfredi, J. P., Klein, C., Herrero, J. J., Byrd, D. R., Trueheart, J., Wiesler, W. T., Fowlkes, D. M., and Broach, J. R. (1996): Yeast alpha mating factor structure-activity relationship derived from genetically selected peptide agonists and antagonists of Ste2p. *Mol Cell Biol* **16**, 4700-9.
- Maullu, C., Lampis, G., Desogus, A., Ingianni, A., Rossolini, G. M., and Pompei, R. (1999): High-level production of heterologous protein by engineered yeasts grown in cottage cheese whey. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2745-7.
- Ministério da Saúde do Brasil, and Secretaria de Vigilância em Saúde (2005): Nota Técnica da Vacina anti-leishmaniose visceral canina leishimune. *Editora do Ministério da Saúde*.
- Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de Vigilância Epidemiológica (2006): Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. *Editora do Ministério da Saúde*.
- Ministério da Saúde do Brasil, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de Vigilância Epidemiológica (2007): Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Editora do Ministério da Saúde*.
- Moreira, M. A., Luvizotto, M. C., Garcia, J. F., Corbett, C. E., and Laurenti, M. D. (2007): Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* **145**, 245-52.
- Nogueira, F. S., Moreira, M. A., Borja-Cabrera, G. P., Santos, F. N., Menz, I., Parra, L. E., Xu, Z., Chu, H. J., Palatnik-de-Sousa, C. B., and Luvizotto, M. C. (2005): Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* **23**, 4805-10.
- Palatnik, C. B., Borojevic, R., Previato, J. O., and Mendonca-Previato, L. (1989): Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote internalization into murine macrophages by chemically defined parasite glycoconjugate ligands. *Infect Immun* **57**, 754-63.

- Palatnik de Sousa, C. B., Gomes, E. M., de Souza, E. P., dos Santos, W. R., de Macedo, S. R., de Medeiros, L. V., and Luz, K. (1996): The FML (Fucose Mannose Ligand) of *Leishmania donovani*. a new tool in diagnosis, prognosis, transfusional control and vaccination against human kala-azar. *Rev Soc Bras Med Trop* **29**, 153-63.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., dos Santos, W. R., Franca-Silva, J. C., da Costa, R. T., Reis, A. B., Palatnik, M., Mayrink, W., and Genaro, O. (2001): Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **65**, 510-7.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., Dutra, H. S., and Borojevic, R. (1993): *Leishmania donovani* surface glycoconjugate GP36 is the major immunogen component of the fucose-mannose ligand (FML). *Acta Trop* **53**, 59-72.
- Palatnik-de-Sousa, C. B., Gomes, E. M., Paraguai-de-Souza, E., Palatnik, M., Luz, K., and Borojevic, R. (1995): *Leishmania donovani*: titration of antibodies to the fucose-mannose ligand as an aid in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **89**, 390-3.
- Panuwatsuk, W., and Da Silva, N. A. (2002): Evaluation of pKD1-based plasmid systems for heterologous protein production in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* **58**, 195-201.
- Panuwatsuk, W., and Da Silva, N. A. (2003): Application of a gratuitous induction system in *Kluyveromyces lactis* for the expression of intracellular and secreted proteins during fed-batch culture. *Biotechnol Bioeng* **81**, 712-8.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Mazzoni, C., and Sannia, G. (2005): Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 428-39.
- Porro, D., and Mattanovich, D. (2004): Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol* **267**, 241-58.
- Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998): Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**, 413-92.

- Read, J. D., Colussi, P. A., Ganatra, M. B., and Taron, C. H. (2007): Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with an integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. *Appl Environ Microbiol* **73**, 5088-96.
- Rocha, T. L., Paterson, G., Crimmins, K., Boyd, A., Sawyer, L., and Fothergill-Gilmore, L. A. (1996): Expression and secretion of recombinant ovine beta-lactoglobulin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Biochem J* **313** ( Pt 3), 927-32.
- Rodriguez, A. P., Leiro, R. F., Trillo, M. C., Cerdan, M. E., Siso, M. I., and Becerra, M. (2006): Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis*-*Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Microb Cell Fact* **5**, 41.
- Rodriguez, A. P., Leiro, R. F., Trillo, M. C., Cerdan, M. E., Siso, M. I., and Becerra, M. (2006): Secretion and properties of a hybrid *Kluyveromyces lactis*-*Aspergillus niger* beta-galactosidase. *Microb Cell Fact* **5**, 41.
- ROSA, J. C. C. (2007): OBTENÇÃO DE LINHAGENS DE *Kluyveromyces lactis* RECOMBINANTES PRODUTORAS DE ESTREPTAVIDINA pp. 50: *Microbiologia*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Rubio-Teixeira, M. (2005): A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **5**, 1115-28.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1987): Molecular cloning. A laboratory manual: *Cold Spring Harbor Laboratory Pr.*
- Santos, R. F., Possa, M. A., Bastos, M. S., Guedes, P. M., Almeida, M. R., Demarco, R., Verjovski-Almeida, S., Bahia, M. T., and Fietto, J. L. (2009): Influence of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase Activity on *Trypanosoma cruzi* Infectivity and Virulence. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e387.
- Santos, V. C. d. (2007): Obtenção de linhagens de *Kluyveromyces lactis* recombinantes produtoras do imunógeno SBm 7462 contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: *Microbiologia*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

- Schaffrath, R., and Breunig, K. D. (2000): Genetics and molecular physiology of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* **30**, 173-90.
- Shabbir, M., Ryten, M., Thompson, C., Mikhailidis, D., and Burnstock, G. (2008): Purinergic receptor-mediated effects of ATP in high-grade bladder cancer. *BJU Int* **101**, 106-12.
- Singh, S. (2006): New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res* **123**, 311-30.
- Singh, S., and Sivakumar, R. (2003): Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* **49**, 55-60.
- Souza, R. F. d. (2009): Expressão heteróloga, purificação e utilização da GDPase de *L. major* no diagnóstico da Leishmaniose canina: *Bioquímica e Biologia Molecular*, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Sreekrishna, K., and Dickson, R. C. (1985): Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 7909-13.
- Tesh, R. B. (1995): Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg* **52**, 287-92.
- Uccelletti, D., Anticoli, S., and Palleschi, C. (2007): The apyrase K1Ynd1p of *Kluyveromyces lactis* affects glycosylation, secretion, and cell wall properties. *FEMS Yeast Res* **7**, 731-9.
- van den Berg, J. A., van der Laken, K. J., van Ooyen, A. J., Renniers, T. C., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A. J., Bishop, R. J., Schultz, K., Moyer, D., and et al. (1990): *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology (N Y)* **8**, 135-9.
- van Ooyen, A. J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M. M., Jacobs, D. I., Colussi, P. A., and Taron, C. H. (2006): Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* **6**, 381-92.
- Woulfe, D., Yang, J., and Brass, L. (2001): ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest* **107**, 1503-5.

- Yang, F., Hicks-Berger, C. A., Smith, T. M., and Kirley, T. L. (2001): Site-directed mutagenesis of human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3: the importance of residues in the apyrase conserved regions. *Biochemistry* **40**, 3943-50.
- Yang, S. T., and Silva, E. M. (1995): Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *J Dairy Sci* **78**, 2541-62.
- Zimmermann, H. (2000): Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**, 299-309.

## 8. ANEXO

AAGCTTGAAGAAAAATGAAATTTCTACTATATATAGCCGCATCTACTGCTTTAATTTCCGTTGTTATGGCT  
GCTCCAGTTTCTACCGAACTGACATCGACGATCTTCCAATATCGGTTCCAGAAAGCCCTGATTGGAT  
TCATTGACTTAACCGGGGATGAAGTTTCCTTGTTCGCTGTTAATAACGGAAACCCACTGGTATTCTATT  
CTTAAACACCACCATCGCTGAAGCTGCTTTCGCTGACAAGGATGATCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT  
AGAAGAGCTAGATCTCCTAGGGGTACCGTCGACGGCGCCTCGCGCCGCTTAATTAAGCCCTGAATCG  
AGAATTTACTTAGATAAGTATGTACTTACAGGTATATTTCTATGAGATACTGATGTATACATGCATGA  
TAATATTTAAACGGTTATAGTCCGATGTCTTGTGCGATAATGACGTTCTATCAAAGCAATACACTT  
ACCACCTATTACATGGGCCAAGAAAATTTTTCGAACTTGTTTAGAATATTAGCACAGAGTATATGATGA  
TATCCGTTAGATTATGCATGATTCATTCCTACAACTTTTTCGTAGCATAAAGGATTAATTACTTGGATGCC  
AATAAAAAAAAAAATCGAGAAAATTTACAGCATGCTCAGAAACAATTGCAGTGTATCAAAGTAAAAA  
AAGATTTTCACTACATGTTCCTTTTGAAGAAAAGAAAATCATGGAACATTAGATTTACAAAAATTAACCA  
CCGCTGATTAACGATTAGACCGTTAAGCGCACAAACAGGTTATAGTACAGAGAAAGCATTCTGTGGTGT  
GCCCGGACTTTCTTTTGGCAGATAGGTAATCGAATACCATCATACTATCTTTTCCAATGACTCCCTAA  
AGAAAGACTCTTCTTCGATGTTGTATACGTTGGAGCATAGGGCAAGAAATTTGGCTTGGATCATCTTTT  
TGTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCTCTTTTTCGCAACCAAAACCATAACATCGGGATTCCTAT  
AATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACAGACA  
AGACATAAATGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCTCATTGATGGTGGTACATACCAAGCAAT  
ACTGTAGCCCTAGACTTGTAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTAT  
TGAAGTAATAATAGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTCTTTTCTCTCTCCCCCGTTGTGTCTCA  
CCATATCCGCAATGACAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAATTAACGACAAAGACAGCACCA  
CAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAAACTTTTTCTCTTCATTCA  
CGCACACTACTCTAATGAGCAACGGTATACGGCTTCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATAAAAA  
AGTTTGTCTGTTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTAATCTTTTGTTCCTCGTCATTGTTCT  
TCGTTCCCTTCTCTTGTGTTCTTTTTCTGACACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATACAATCAAGGAA  
TTCCGGATCCGCCACCATGCTCAATCCTGGGAAGAACTGGCCGCTGATAAGCGGCCCCGCTCGAAAA  
ACCATCCCTGATGAATGGAAGTCCAGACGCTGCCTGCGGAAGACAGCGTTATTGATTTCCAAAGAAAT  
CGGGATCCCTTTCAGAGCCGAACGAAGATCACAGAGGCTCCGCTGCGGATCTTGTGTCAAAGTGGC  
GGCCGAGAGTTGACCTCGGTGGAAGTTACGCTAGCATTCTGTAAACGGGCGAGCAATCGCCAGCAGTTA  
ACAAACTGCGCCACAGGTTCTTCCCTGACGCGCTCTCGCGCAGGCAAGGAACTCGATGAATACTACG  
CAAAGCACAAGAGACCCGTTGGTCCACTCCATGGCCTCCCATCTCTCTCAAAGACCAGCTTCGAGTCAA  
GGCTACGAAACATCAATGGGCTACATCTCATGGCTAAACAAGTACGACGAAGGGGACTCGGTTCTGACA  
ACCATGCTCCGCAAAGCCGGTGCCTTCTACGTCAAGACCTCTGTCCCGCAGACCCTGATGGTCTCGG  
AGACGTCAACAACATCATCGGGCGCACCGTCAACCCACGCAACAAGAACTGGTGTGCGGGCGCAGTTCT  
TGGTGTGAGGGTGCATCGTTGGGATTCGTTGGCTGCTCATCGGTGAGAACGGATATCGGTGGCTCG  
ATTCGAGTGGCGGCGCTTCAACTTCTGTACGGTCTAAGGCCGAGTTCATGGGCGGCTGCGGTATGCAA  
AGATGGCGAACAGCATGGAGGGTCCAGGAGACGGTGCACAGCGTTGTGCGGGCGATTACGCACTCTGTTGA  
GGACCTCCGCTCTTACCAAATCCGCTCCTGGTCCAGGACCTGGAATACGACTCCAAGGTCACTCCCT  
ATGCCCTGGCCAGTCCGAGTCGGACTTATTGCTTCAAAGTCAAGAACGGGCGGGCTCAATATCGGCT  
ACTACAACCTTCGACGGCAATGTCTTCCACACCCTCCTATCTGCGGGGCTGGAAACTACGCTCGCCGC  
TCTCGCCAAAGCCGCTCACACCGTACCCCGTGGACGCCATACAAGCAGATTTCCGGCCAGATCTCATC  
TCCATATCTACGCGGCTGACGGCAGCGCCGACGTAATGCGGATATCAGTGCATCCGGGAGCGGCGA  
TTCCAAATATCAAAGACCTACTGAACCCGAACATCAAAGCTGTTAACAATGAACGAGCTCTGGGACCGCA  
TCTCCAGAAGTGAATTAACAGATGGAGTACCTTGAAGAAATGGCGGGAGGCTGAAGAAAAGGCCGGGAG  
GAATGGACGCCATCATCGCCGATTAACGCTACCGCTGCGGTACGGCATGACCAGTTCCGGTACTATG  
GGTATCCCTCTGTGATCAACTGCTGGATTTACAGAGCGTGGTGTGTTCCGGTTACCTTTGCGGATAAGAA  
CATCGATAAAGAAATGAGAGTTTCAAGGCGGTTAGTGAGCTTGTATGCCCTCGTGCAGGAAGATGATGAT  
CCGGAGGCGTACCATGGGGCACCGGTTGACGTGACGGTTATCGGACGGAGACTCAGTGAAGAGAGGACGT  
TGGCGATTGCAGAGGAAGTGGGGAAGTTGCTGGGAAATGTGGTACTCCATAGCCCGGGGGGCTCGAT  
CCCTCGCGAGTTGGTTCAGTGTGCTGCTGAGGCTGGACGACCTCGCGGAGTTCTACCGGCAGTGCAAA  
CCGTCGGCATCCAGGAAACCAGCGCGGCTATCCGCGCATCCATGCCCCGAACCTGCAGGAGTGGGAGG  
CACGATGGCCGCTTTGGTGCATCTAGATTACGTGGAAGAAAGTGTAGTAAAGTGTAGTATAGTAAAGTAA  
AAAGAGGTAAGAAAGAGAAAACCGGCTACATACTAGAGAAGCACGTACACAAAAACTCATAGGCCTTCAT  
CATACGACAGTTTCTGATGCATTATAATAGTGTATTAGATATTTTCAGAAATATGCATAGAACCCTCCTC  
TTGCCTTTACTTTTTATACATAGAACATTGGCAGATTTACTTACACTACTTTGTTTCTACGCCATTTCTT  
TTGTTTTCAACACTTAGACAAAGTTGTTGAGAACCAGGACTACTAAAAAGCAATGTTCCCACTGAAAAATCAT  
GTACCTGCAGGATAATAACCCCTAATCTGCATCGATCCAGTATGTTTTTTTTTCTACTCATTTTTTA  
CCTGAAGATAGAGCTTCTAAAAAATAAATCAGTGATTACATGCATATTGTGTGTTCTAGTAACCAA  
GGAAAGGAACAGATAGATAAAAATCCGAGACTGTCAAATTAGTTTTTTTTTTTTTTGGCGGGAGTCT  
AGTGGGCGGAAATATGTTCTTGGCCTAGAACTTAATCTGTTTGTATCATGCCAATACTTGCCTGAGTGC  
CGACTTTTGGCCACCCTCTTGCCTTCTGTATCTTCAAACCCACCTGTTTTCCAGCCGATCTTTCG  
TCGATCTACACATACTGTCCATATCTTGTGTAGCCGACGCTGACTATGACCAAAAAACAACAAGGA  
GAACCTGTCGCCGATTTGTAACTCTCTGCATCCATCCAAGTGGGTATGCGCTATGCAATGTTAAGCTAG  
GTCAGGTCAGACAGGTTCAAGGACAGCAACTTGACTGTATGCAACCTTTACCATCTTTGCACAGAACAT  
ACTGTAGCTAGCTAGTTACACTTATGGACCGAAAAGGCACCCACCATGTCTGTCCGGCTTTAGAGTAC  
GGCCGAGACCCGCTGATTTGCCTTGCACAGCAGTGTCAAAATGCATCGCATGAGCACACGGGCGCAGGGC  
ACGGGCACAGGAACATTGGCAAAAATACCAGATACACTAACCAGCTATATCAAGCCAGTTTAAAA  
TTCCATAAATTTCCGGCTACTTTTCAATTCCTATAGTGAGTCTGATTAATTCGTAATCATGTCTATAG  
CTGTTTCTGTGTAATTTGTTATCCGCTCAAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAA  
AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGGAGCTAACTCACATTAATTCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTC  
GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGGTTTTCGCTATTGGG  
CGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTTACGCTC  
ACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAATCAGGGGATAACGAGGAAAGAAACATGTAGCAAAAGG  
CCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGAC  
GAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGT  
TTCCCTGGAAAGCTCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTTCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTT

TCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTT  
CGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC  
GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAG  
AGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACA  
GTATTTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA  
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGGCAGAAAAAAGGATC  
TCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTACGTTAAGGGATT  
TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAAGTGGTAAATCAA  
TCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC  
GATCTGTCTATTTCTGTTCCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGC  
TTACCATCTGGCCCAGTGTGCAATGATACCGCAGACCCACGCTCACGGCTCCAGATTTATCAGCAA  
TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTAT  
TAATTTTGGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCGCAGTTAATAGTTTGGCAGCAAGTTGTTGCCATTGCT  
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGC  
GAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAA  
TAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATGCCATCC  
GTAAGATGCTTTTCTGTACTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGA  
GTTGCTTTGCCCCGGGTCAATACGGGATAATACCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCAT  
TGGAAAAGCTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCC  
ACTCTGACCCCAACTGATCTTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCGAAAAACGGAA  
GGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCA  
ATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTATTGTCCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAAT  
AAACAAATAGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTA  
GCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACCGCGACGCTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTT  
CGCTTTCTTCCCTTCTTCTGCGCAGTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCT  
TTAGGGTCCGATTTAGTGCTTACCGCACCTCGACCCAAAAAAGTGTAGGGTGTAGGTTACGTA  
GTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT  
CTTGTTCAAAAGTGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTTGAATTTATAAGGGATTTTGGCG  
ATTTCCGCTTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTAACAAAAATTTAA  
CGCTTACAATTTCCATTGCGCACTTTCAGGCTGCGCAACTGTGGGAAGGGCGATCGGTGGGGCTCTTCG  
CTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCC  
AGTCACGACCTTTGAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTCCCGGGGATCGACTCATAAAATAGTAACTT  
CTAATGCGTATCTATTGACTACCAACCATTAGTGTGGTGCAGAAAGGCGGAATTTCCCTTCTTCAAT  
CAGCTTCTTTTCAATTTTATTTTCCATTTTTCAGTTTTTGTGTTGTTGTCGAAATTTAGCCAGTTGCTTC  
TCCAAGATGAAAAAACCCCTGCGCAGTTTCTGTGCTGCAAGATCCTAATCGACTTTTCCACCCCCACA  
AAAGTAAATGTTCTTTTGTACATTCCGCTGGGTAGCTAGCTCCCGAATCTTCAAAGGACTTAGGGACT  
GCACTACATCAGAGTGTGTTACCTGGTTTTGCTGCCTGGTTTTGAAAGAAAAGAGCAGGGAATCGCGGGT  
TCCCGGCAATAATCATGCGATAGTCTTTGGCCTTCCAAGTGCATGTAGAGTAGACAACAGACAGGGA  
GGCAGGAAGGATCTTCACTGAGATCCTGTATCTTGTGGGTAAGTCCGATGAAAGGGGAATCGTATGA  
GATTGGAGAGGATGCGGAAGAGGTAACGCCTTTTGTTAACTTGTTTAATTTATTTGGGGCAGGCGAGAG  
GGGAGGAATGTATGTGTGAGGCGGGCAGACGGAGCCATCCAGGCCAGGTAGAAATAGAGAAAGCCGA  
ATGTTAGACAATATGGCAGCGTAGTAGAGTAGGTAGGTAGGCAAGTACTGCTAGCAAAGAGGAGAAGGGT  
AAGCTCACTCTTCCATTCCACACCGTTAGTGTGTCAGTTTGAACAAAAAACAATCATCATACCAATTG  
ATGGACTGTGGACTGGCTTTTGAACGGCTTTTCGGACTGCGATTATTCGTGAGGAATCAAGGTAGGAAT  
TTGGTCATATTTACGGACAACAGTGGTGTATCCCATATGGAGTAGGAAAACGAGATCATGGTATCCTCA  
GATATGTTGCGGAATCTGTTTACCGCAAAGTTCAGGGTGTCTGTTGGGTTTCGGTGGTCTTTGCTTT  
GCTTCCCTTGTCTTGCATGTTAATAATAGCCTAGCCTGTGAGCCGAACTTAGGGTAGGCTTAGTGT  
GGAACGTACATATGATACAGTTGACTTGGTTAACCAGGCGACCTGGTAGCCAGCCATACCCACACAG  
TTTTTTGTATCTCAGTATAGTTGTGAAAAGTGTAGCGGAAATTTGTGGTCCGAGCAACAGCGCTTTTT  
CTAGTAGTGGGTCGGTTACTTGGTTGACATTTGGTATTTGGACTTTGTTGCTACACCATTCACACTTGA  
AGTCGAGTGTGAAGGGTATGATTTCTAGTGGTGAACACCTTTAGTTACGTAATGTTTTTCTTGTGTT  
ACTTGAGATTTGATTGAGAAAAGGTATTTAATAGCTCGAATCAATGTGAGAACAGAGAGAAGATGTT  
TTCCCTAACTCGAAAGGTATATGAGGCTTGTGTTTCTTAGGAGAAATTTATTTCTTTGTTATGTTGCGC  
TTGTAGTTGAAAAGGTGAAGAGACAAAAGCTGGAATTTGTGAGCGGATAACAAGCTCAACACTTGAAT  
TAGGAAAGAGCAGAAATTTGGCAAAAAAATAAAAAAATAAACACACATACTCATCGAG

## Reconstituição virtual do promotor P<sub>LAC4</sub>-pKLAC1

CCCGGGGGGGCTCGATCCCTCGCGAGTTGGTTTCAGCTGCTGCTGAGGCTGGACGACCTCGCGGAGTT  
CTACCGGCAGTGCAAATCCGTCCGCATCCAGGAAACCAGCAGCGGCTATCCCGGCATCCATGCCCCCGAA  
CTGCAGGAGTGGGGAGGCACGATGGCCGCTTTGGTCGATCTAGATTACGTGGAGAAAGGTAGTAAAGT  
AGTAGTATAAGTAGTAAAAAGAGGTAAAAAGAGAAAACCGGCTACATACTAGAGAAGCAGCTACACAAA  
ACTCATAGGCATCTCATATACGACAGTTTCTTGATGCATTATAATAGTGTATTAGATATTTTCAGAAAT  
ATGCATAGAACCCTCTTGCCTTTACTTTTTATACATAGAACATTGGCAGATTTACTTACACTACTTTG  
TTTCTACGCCATTTCTTTTGTTCACACTTAGACAAGTTGTTGAGAACCAGGACTACTAAAAAGCAATG  
TTCCACTGAAATCATGTACCTGACGAGATAATAACCCCTAATCTGCATCGATCCAGTATGTTTTTTT  
TTCTCTACTCATTTTTACTGAAGATAGAGCTTCTAAAAACAAAAAAATCAGTGATTACATGCATATTGT  
GTGTTCTAGTAACCAAAGGAAAGGAACAGATAGATAAAAATCCGAGACTGTCAAATTAGTTTTTTCTT  
TTTTTTTGGCGGGAGTCAGTGGCCGAAATATGTTCTTGGCCTAGAACTTAATCTGGTTTGCATGATGCCA  
ATACCTTGCCTGAGTGCCTGACTTTTTGCCACCCTTCTGCCTTCTGTCATCCTTCAAACCCACCTGTTT  
TCCAGCGTATCTTCCGCTCGCATCTACACATACTGTCCATATCTTGTGTGTAGCCGACCTGACTATGA  
CCAAAAACAAACAGGAGAACTGTTCCGCCATTTGTAACACTCCTGCATCCATCCAAGTGGGTATGCGCT  
ATGCAATGTTAAGCTAGGTGAGTCAAGCCAGGTCCAAGGACAGCAACTTGACTGTATGCAACCTTTACC  
ATCTTTGCACAGAACATACTTGTAGCTAGCTAGTTACACTTATGGACCGAAAGGCACCCACCATGCTCT  
GTCCCGCTTTAGAGTACGGCCGACAGCCGCTGATTGCTTGCCTGCAAGCAGTAGTCACAATGCATCGCATG  
AGCACACGGGCACGGGCACGGGCACAGGAACCATTTGGCAAAAATACAGATACACTATACCGAGCTATAT  
CAAGCCCAAGTTAAAAATTCATAATTTCCCGCGCCGGGATCGACTCATAAATAGTAACCTTCTAA  
TTGCTTTTTTCATTTTTATTTCCATTTTTTCAGTTTTTGTGTGTCGAATTTAGCCAGTTGCTTCTCCA  
AGATGAAAAAACCCCTCGCGAGTTTCTGTGCTGCAAGATCTAATCGACTTTTCCACCCCCACAAAAG  
TAAATGTTCTTTTGTACATTCGCTGGGTAGCTAGCTCCCGAATCTTCAAAGGACTTAGGGACTGCAC  
TACATCAGAGTGTGTTACCTGCTTGTGCTGCTGTTTGAAGAAAAAGAGCAGGGAACCTGCGGGTTCCC  
GGCAATAATCATGCGATAGTCTTTGGCCTTCCAAGTGCATGTAGAGTAGACAAACAGACAGGGAGGGC  
AGGAAGGATCTTCACTGAGATCCTGTATCTTGTGGGTAAAGTCCGATGAAAGGGGAATCGTATGAGATT  
GGAGAGGATCCGGAAGAGGTAACGCCCTTTTGTAACTTTTAAATTAATATGTTGGGCGAGCGAGAGGGGA  
GGAATGTATGTGTGAGGCGGGCAGACGGACCATCCAGGCCAGGTAGAAATAGAGAAAGCCGAATGT  
TAGCAATAATGGCAGCCTAGTAGAGTAGGTAGGTAGGCAAGTACTGCTAGCAAAAGAGGAGAAAGGTAA  
TCACTCTTCCGATTCACACACCCTTAGTGTGTCAGTTTGAACAAAAAACAACTCATACCAATTTGATGG  
ACTGTGACTGCTTTTTGGAACGGCTTTCCGACTGCGATTATCTGTGAGGAATCAAGGTAGGAATTTGG  
TCATATTTACGGACAACAGTGGGTGATCCCATATGGAGTAGGAAAACGAGATCATGTTATCCCTCAGATA  
TGTTGCGGAATCTGTTCAACCCAAAGTTCAGGGTGTCTGTTGGGTTTCCGTTGGTCTTTGCTTTGCTT  
CTCCCTTGTCTTGCATGTTAATAATAGCCTAGCCTGTGAGCCGAAACTTAGGGTAGGCTTAGTGTGGAA  
CGTACATATGTATCAGTTGACTTGGTTTAAACAGGCGACCTGGTAGCCAGCCATACCCACACAGTTTT  
TTGATCTTCAGTATAGTTGTGAAAAGTGTAGCGGAAATTTGTGTTCCGAGCAACAGCTCTTTTCTAG  
TAGTGCCTGCTGTTACTTGGTTGACATTGGTATTGGACTTTGTTGCTACACCATTCACACTACTTGAAGTC  
GAGTGTGAAGGATATGATTTCTAGTGGTGAACACCTTTAGTTACGTAATGTTTTTCATTGCTGTTTTACTT  
GAGATTTGCATTTGAGAAAAGGTATTTAATAGCTCGAATCAATGTGAGAAACAGAGAGAAGATGTTCTCC  
CTAACTCGAAAGGTATATGAGGCTTGTGTTCTTAGGAGAATTAATTTCTTTTGTATGTTGCGCTTGT  
AGTTGAAAAGGTGAAGAGACAAAAGCTGGAATTTGAGCGGATAACAAGCTCAACACTTGAATTTAGG  
AAAGAGCAGAAATTTGGCAAAAATAAAAAAAATAAACACACATACTCATCGAGAAGCTTGAAAAAA  
ATGAAATCTCTACTATATAGCCGATCTACTGCTTTAATTTCCGTTGTTATGGCTGCTCCAGTTTCTA  
CCGAAACTGACATCGACGATCTTCCAATATCGGTTCCAGAAGAAGCCTTGATTGGATTCAATGACTTAAC  
CGGGATGAAAGTTTCTTGTGCTGTTAATAACGGAACCCACACTGGTATTCTATTCTTAAACACCACC  
ATCGCTGAAAGCTGCTTCCGCTGACAAGGATGATCTCGAAGAAAGAGAGGCTGAAAGCTAGAAAGCTAGAT  
CTGTGACGGCGCCTGCGCCGCTTAATTAAGCCCTTGAATCGAGAATTTATACTTAGATAAGTATGT  
ACTTACAGGTATATTTCTATGAGATACTGATGTATACATGCATGATAATTTTAAACGGTTATTAGTGCC  
GATTGCTTGTGCGATAATGACGTTCTATCAAAGCAATACACTTACCACCTATTACATGGGCCAAGAAA  
ATATTTTCAACTTGTTTAGAATATTAGCAGAGTATATGATGATATCCGTTAGATTATGCATGATTCA  
TTCTTCAACTTTTTTCGTAGCATAAGGATTAATTACTTGGATGCCAATAAAAAAAACATCGAGAAA  
ATTTACAGCATGCTCAGAAACAATGCAAGTATCAAAGTAAAAAAAGATTTTCACTACATGTTCTTTT  
GAAGAAAGAAATCATGGAACATTAGATTTACAAAATTTAAACCACCGCTGATTAAACGATTAGACCGTTA  
AGCGCACAAACAGGTTATTAGTACAGAGAAAGCATTCTGTGGTGTGCCCCGACCTTTCTTTGCGCATA  
GGTAAATCGAATACCATCATATCTTTTCCAATGACTCCCTAAAGAAAGACTCTTCTTCGATGTTGTA  
TACGTTGGACATAGGGCAAGAAATTTGGCTTGGATCATCTTTTGTGTTTCCGGGTGACAATATGG

Anexo 1: Esquema evidenciando os sítios presentes no vetor pKLAC1, bem com a reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> após a transformação. Em laranja as regiões de anelamento dos primers 1 e 2 fornecidos pelo kit para verificação da correta reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> gerando um produto de 1900 pb, o sublinhado corresponde as regiões 5' e 3' do promotor P<sub>LAC4</sub> bem como o promotor completo reconstituído, verde corresponde aos sítios de restrição da enzima Sac II, em vermelho a região excisada pelo processo de recombinação ou por restrição com a Sac II, em azul a região de anelamentos dos novos primer desenhados para verificação da correta reconstituição do promotor P<sub>LAC4</sub> gerando um produto de 1546 pb e em amarelo o sítio de inserção do gene da GDPase entre os sítios das enzimas Sal I e Bgl II. >gi|62467025|gb|AY968582.1| Expression vector pKLAC1.