



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

Dissertação de Mestrado

Bianca Vasconcelos Gomes Ferreira

**Estudo das proteínas centrinas de *Phytomonas serpens***

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Beatriz Dolabela de Lima**

Brasília, Distrito Federal

2020

BIANCA VASCONCELOS GOMES FERREIRA

ESTUDO DAS PROTEÍNAS CENTRINAS DE *Phytomonas serpens*

ORIENTADOR: BEATRIZ DOLABELA DE LIMA

Brasília

Março de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Beatriz Dolabela de Lima, pela orientação dada, por todos os ensinamentos, por toda a paciência e por toda a confiança. Muito Obrigada professora!

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Gene: Agnelo, Giulia, Juliana, Lucas, Mariana, Sarah, Agenor, Lívia e Fabiana, muito obrigada pelas risadas, pelas conversas, conselhos, palavras de incentivo e por toda a ajuda nos experimentos.

À professora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Izabela Marques Dourado Bastos Charneau pelo fornecimento dos anticorpos utilizados neste trabalho e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro: Alessandro, Arthur, Camila, Clênia, Izabela, Milene e Marta, muito obrigada por toda a paciência e pela grande ajuda neste trabalho.

À minha querida mãe, muito obrigada por acreditar em mim, pelo incentivo e pelas palavras de encorajamento. Obrigada por me apoiar nos meus projetos e nas minhas decisões. Ao meu pai que me faz tanta falta e que me ensinou o valor do trabalho duro.

Aos meus amigos Angélica, Ana Paula, Bárbara, Gabriella, Nathália, Luanna e Paulo, obrigada por estarem ao meu lado e por todos os momentos e histórias compartilhados.

À CAPES pelo auxílio financeiro e ao programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana.

## RESUMO

O gênero *Phytomonas* é composto por protozoários parasitas de plantas de diversas espécies, inclusive de importância econômica como a mandioca, milho e café. Esse gênero pertence à família Trypanosomatidae, a mesma dos protozoários parasitas humanos *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos das doenças de Chagas, do sono e das leishmanioses, respectivamente. Neste trabalho, foram estudadas as centrinas de *Phytomonas serpens*, espécie que parasita plantas de tomate. Centrinas são proteínas conservadas em organismos eucariotos e desempenham funções associadas à divisão e à motilidade celular. Como não há relatos na literatura sobre estas proteínas em *P. serpens*, o objetivo deste trabalho foi estudar as centrinas desse parasita. Para tanto, análises *in silico* foram realizadas a partir do genoma de *P. serpens* que ainda não foi anotado, mas está disponibilizado no *GeneBank*. Foram identificados cinco genes para centrinas e baseados na similaridade com outros organismos denominados de PsCEN1 a PsCEN4, e o quinto PsCEN5 com similares apenas na família *Trypanosomatidae*. As sequências proteicas preditas de cada centrina foram alinhadas pelo programa Muscle e as taxas de similaridade e identidade foram analisadas. As proteínas centrinas 1 e 2 apresentaram a maior taxa de identidade, sendo igual a 40,59%. Já em relação a centrina 5, a maior taxa de identidade foi quando comparada a proteína centrina 1 apresentando 28,76% de identidade. As estruturas tridimensionais de cada centrina foram preditas no servidor SWISS MODEL através de modelagem por homologia. Os modelos tridimensionais destas proteínas apresentaram estruturas similares a halteres, sendo que somente os modelos das centrinas 1 e 2 apresentaram domínios de ligação ao cálcio. Nas análises experimentais, os genes correspondentes às centrinas 1 a 5 foram amplificados e clonados em *Escherichia coli*. Como a centrina 5 parece estar restrita aos tripanossomatídeos foi escolhida para a expressão heteróloga em *E. coli*, o qual resultou na sua hiperexpressão na forma insolúvel sob diferentes condições de indução. Os dados obtidos neste trabalho vão auxiliar nos estudos futuros sobre divisão celular e motilidade celular em *P. serpens*, bem como no controle dos tripanossomatídeos parasitas.

**Palavras-chave:** *Phytomonas serpens*; centrinas; parasita de tomate; expressão heteróloga.

## ABSTRACT

The *Phytomonas* genus is composed of protozoa parasites of diverse plant species, including the ones with economic importance such as cassava, corn, and coffee. This genus belongs to the Trypanosomatidae family, the same as the human parasitic protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and the *Leishmania* genus, etiologic agents of Chagas' disease, sleep and leishmaniasis, respectively. In this work, we studied the centrins of *Phytomonas serpens*, a species that parasites tomato plants. Centrins are proteins conserved in eukaryotic organisms whose functions are associated with cell division and motility. Since there are no reports in the literature about these proteins in *P. serpens*, the objective of this work was to study the centrins of this parasite. For that, *in silico* analysis were carried out using the *P. serpens* genome that has not yet been annotated, but is available on *GeneBank*. Five genes for centrins were identified and based on similarity with other organisms called *PsCEN1* to *PsCEN4*, and the fifth *PsCEN5* with similar ones only in the Trypanosomatidae family. The predicted protein sequences for each centrin were aligned by the Muscle program and the similarity and identity rates were analyzed. Centrin proteins 1 and 2 showed the highest identity rate, being 40.59%. About centrin 5, the highest identity rate was when compared to the protein centrin 1, with 28.76% of identity. The three-dimensional structures of each centrin were predicted on the SWISS-MODEL server through homology modeling. The three-dimensional models of these proteins showed similar structures to dumbbells, and only the models of centrins 1 and 2 showed calcium-binding domains. In the experimental analysis, the genes corresponding to centrins 1 to 5 were amplified and cloned in *Escherichia coli*. As centrin 5 appears to be restricted to trypanosomatids, it was chosen for heterologous expression in *E. coli*, which resulted in its hyperexpression in the insoluble form under different conditions of induction. The data obtained in this work will assist in future studies on cell division and cell motility in *P. serpens*, as well as in the control of parasitic trypanosomatids.

**Keywords:** *Phytomonas serpens*; centrins; tomato parasite; heterologous expression.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes morfologias dos tripanossomatídeos .....	2
Figura 2 - Ciclo de vida dos tripanossomatídeos do gênero <i>Phytomonas</i> .....	5
Figura 3 – Representação do motivo EF-Hand .....	7
Figura 4- Estrutura da proteína centrina .....	8
Figura 5 - Níveis de expressão de mRNA dos genes TcCen1(C1), TcCen2(C2), TcCen3 (C3), TcCen4(C4), TcCen5 (C5) em relação ao gene endógeno GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase).....	11
Figura 6 - Expressão de mRNA dos genes correspondentes as centrinas 1 a 5 de <i>Phytomonas serpens</i> 9T.....	12
Figura 7 - Estratégia experimental utilizada para a execução deste trabalho. ....	15
Figura 8 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy. ....	20
Figura 9 - Mapa do vetor de expressão em <i>Escherichia coli</i> pET28a(+). ....	21
Figura 10- Representação da digestão da construção pGEM-TPsCEN5 com as enzimas NdeI e BglII e ligação no vetor pET28a(+) digerido com as enzimas NdeI e BamHI. ....	30
Figura 11 - Alinhamento entre as sequências das centrinas de <i>P. serpens</i> 9T no programa MUSCLE e no software MEGA 7. ....	33
Figura 12 - Representação dos domínios EF-Hands de cada centrina de <i>P. serpens</i> 9T, obtidos no banco de dados PROSITE. ....	34
Figura 13 - Cladograma das centrinas dos tripanossomatídeos. ....	35
Figura 14 – Representação dos ângulos $\phi$ e $\psi$ em torno do $C\alpha$ . ....	36
Figura 15 - Modelo tridimensional da proteína centrina 1. ....	37
Figura 16 - Mapa de Ramachandran do modelo tridimensional da centrina 1. ....	38
Figura 17 - Modelo tridimensional da centrina 2. ....	39
Figura 18 - Mapa de Ramachandran da centrina 2. ....	40
Figura 19 - Modelo tridimensional da centrina 3. ....	41
Figura 20 - Mapa de Ramachandran da centrina 3. ....	43
Figura 21- Modelo tridimensional da centrina 4. ....	43
Figura 22 - Mapa de Ramachandran centrina 4. ....	44
Figura 23 - Modelo tridimensional da centrina 5 de <i>Phytomonas serpens</i> 9T. ....	45
Figura 24 - Mapa de Ramachandran da proteína centrina 5. ....	46
Figura 25- Amplificação dos genes PsCEN1, PsCEN2, PsCEN3, PsCEN4 e PsCEN5 por PCR. ....	47
Figura 26 – Análise da inserção dos sítios para as enzimas NdeI e BglII. ....	48
Figura 27 – Alinhamento da sequência senso obtida com o sequenciamento do gene PsCEN5 clonado no vetor pGEM-T Easy (subject) com a sequência do gene PsCEN5 obtido nos bancos de dados. ....	49

Figura 28- Alinhamento da sequência antisense obtida com o sequenciamento do gene PsCEN5 clonado no vetor pGEM-T Easy (query) com a sequência do gene PsCEN5 obtido nos bancos de dados (subject)..	50
Figura 29 - Digestão do vetor pET28a(+) com as enzimas de restrição NdeI e BamHI.....	51
Figura 30 - Digestão do vetor pET28a(+) e da construção pGEM-TPsCEN5 com as enzimas de restrição NdeI e BglII. ....	52
Figura 31 – Análise da subclonagem do gene PsCEN5 no vetor pET28a(+) com a amplificação do gene PsCEN5 por PCR. G.....	53
Figura 32 - Alinhamento da sequência sense obtida com o sequenciamento do gene PsCEN5 (subject) na construção pET28a(+)PsCEN5 com a sequência do gene PsCEN5 obtido nos bancos de dados.....	54
Figura 33 – Análise da expressão heteróloga da proteína PsCEN5 em gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%.....	55
Figura 34 –Análise da expressão da proteína centrina 5 sob diferentes condições de indução. B. Western Blot do gel A utilizando anticorpo anti His tag.....	56
Figura 35 - Alinhamento obtido no servidor SWISS MODEL entre a sequência da centrina 5 de <i>P. serpens</i> 9T (Chain: A) e a sequência modelo (3qrx.1)....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação morfológica entre os gêneros de tripanossomatídeos....	2
Tabela 2 - Família de insetos vetores dos protozoários do gênero <i>Phytomonas</i> . .....	4
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação dos genes correspondentes as centrinas de <i>Phytomonas serpens</i> 9T.....	25
Tabela 4 - Ciclos de amplificação dos genes PsCEN1, PsCEN2 e PsCEN5 por PCR.....	26
Tabela 5 - Ciclos de amplificação do gene PsCEN3 por PCR. ....	26
Tabela 6 - Ciclo de amplificação do gene PsCEN4 por PCR. ....	26
Tabela 7- Tamanho de cada fragmento amplificado por PCR e a quantidade de DNA empregada para a ligação com o vetor pGEM-T Easy (Promega).....	27
Tabela 8 - Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento. ....	29
Tabela 9- Taxa de identidade obtida ao comparar as sequências de aminoácidos de <i>P. serpens</i> 9T.....	33
Tabela 10 – Taxa de similaridade entre as sequências de aminoácidos de <i>P. serpens</i> 9T. ....	33
Tabela 11 - Modelos selecionados para a modelagem por homologia das proteínas centrinas de <i>P. serpens</i> . ....	35
Tabela 12 - Tamanhos correspondentes aos genes correspondentes as centrinas de 1 a 5 de <i>Phytomonas serpens</i> 9T.....	47

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	1
1. Família Trypanosomatidae .....	1
2. Gênero <i>Phytomonas</i> .....	3
3. Centrinas .....	6
JUSTIFICATIVA .....	13
OBJETIVO .....	14
MATERIAL E MÉTODOS .....	15
1. Estratégia experimental .....	15
2. Material .....	15
3. Métodos .....	21
RESULTADOS .....	32
1. Análise da similaridade entre as centrinas de <i>Phytomonas</i> .....	33
2. Árvore filogenética .....	34
3. Estrutural tridimensional das centrinas .....	35
4. Amplificação e clonagem dos genes <i>PsCEN1</i> , <i>PsCEN2</i> , <i>PsCEN3</i> , <i>PsCEN4</i> e <i>PsCEN5</i> por PCR .....	47
4. Expressão heteróloga da proteína centrina 5 de <i>P. serpens</i> .....	50
DISCUSSÃO .....	57
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
ANEXO I .....	68
ANEXO II .....	69
ANEXO III .....	71

## INTRODUÇÃO

O gênero *Phytomonas* é formado por protozoários parasitas de plantas de diversas famílias, inclusive de importância econômica. Este gênero pertence à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Desta mesma classificação também fazem parte os protozoários de importância médica e veterinária das espécies *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, agentes etiológicos da Doença do sono (ou tripanossomíase africana) e da Doença de Chagas (ou tripanossomíase americana), respectivamente (CAVALIER-SMITH, 2016; SERRANO *et al.*, 1999; STUART *et al.*, 2008).

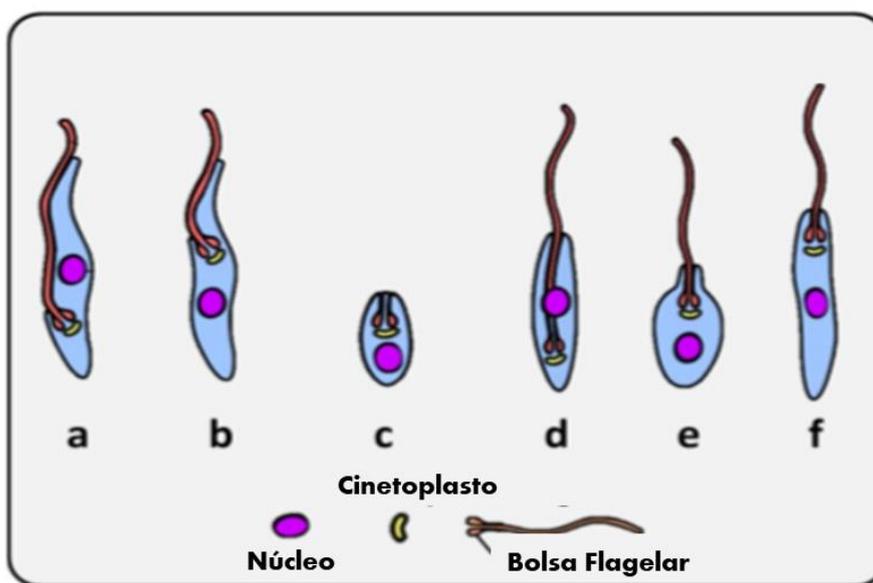
### 1. Família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos (membros da família Trypanosomatidae) são protozoários parasitas de plantas e animais (vertebrados ou invertebrados), possuem um único flagelo e o ciclo de vida pode ser monoxênico ou dixênico. Durante o ciclo de vida destes parasitas há uma variação da morfologia celular e entre os gêneros também existem diferenças morfológicas. As formas são classificadas como amastigota, coamastigota, epimastigota, opistomastigota e promastigota e tripomastigota (**Fig. 1**), sendo que a palavra “-mastigota” deriva do grego e significa “flagelo”. Esta classificação é baseada no comprimento do flagelo livre, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, a localização e a profundidade da bolsa flagelar e a fixação do flagelo no corpo da célula (REY, 2008; HOARE, WALLACE, 1966; WHEELER, GLUENZ, GULL, 2013). As diferentes morfologias e seus respectivos gêneros estão descritos na **Tabela 1**.

**Tabela 1 - Variação morfológica entre os gêneros de tripanossomatídeos** (adaptado de Wheeler, Gluenz e Gull, 2013).

Morfologias	Gêneros
Amastigota	<i>Crithidia</i> , <i>Herpetomonas</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Leptomonas</i> e <i>Trypanosoma</i>
Coamastigota	<i>Crithidia</i>
Epimastigota	<i>Trypanosoma</i>
Opistomastigota	<i>Herpetomonas</i>
Promastigota	<i>Phytomonas</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Leptomonas</i> e <i>Herpetomonas</i>
Tripomastigota	<i>Trypanosoma</i>

Durante todo o ciclo de vida, os protozoários do gênero *Phytomonas* permanecem na forma promastigota. Esta forma é caracterizada pela presença do flagelo na região anterior da célula e o cinetoplasto anterior ao núcleo, o qual encontra-se na porção média da célula. Além disso, estas células possuem uma forma mais alongada e achatada (**Fig.1-f**) (REY, 2008; NEVES *et al.*, 2004; KAUFER *et al.*, 2017).



**Figura 1 - Diferentes morfologias dos tripanossomatídeos. a.** Tripomastigota; **b.** Epimastigota; **c.** Amastigota; **d.** Opistomastigota; **e.** Coamastigota; **f.** Promastigota (KAUFER *et al.*, 2017).

## 2. Gênero *Phytomonas*

Os protozoários do gênero *Phytomonas* são encontrados em plantas de diversas famílias tais como Apocynaceae, Euphorbiaceae, Palmae e Solanaceae. E em diversos tecidos vegetais como em vasos floemáticos, látex, frutos e sementes. Estes protozoários foram descritos pela primeira vez por Alexandre Lafont no ano de 1909 na ilha Maurício, localizada no continente africano. Este pesquisador encontrou protozoários flagelados no látex da planta da espécie *Euphorbia pilulifera*, os quais foram classificados como *Leptomonas daividi*. No mesmo ano, Charles Donovan observou estes mesmos micro-organismos no látex de plantas da mesma espécie observada por Lafont e propôs um novo gênero para a classificação destes organismos: o gênero *Phytomonas* (LAFONT, 1909; DONOVAN, 1909; JANKEVICIUS et al., 1989; JASKOWSKA et al., 2015). Este novo gênero não foi inicialmente aceito pela comunidade científica e somente na década de 1970 é que passou a ser utilizado para a classificação destes protozoários (CAMARGO, 1999).

A descoberta destes protozoários em plantas ampliou o campo de pesquisas nesta área e conforme dito anteriormente estes micro-organismos estão presentes em diferentes plantas, inclusive de importância econômica como café, tomate e coqueiro. Nos estudos realizados foi observado que estes parasitas permanecem em sua maioria localizados nos tecidos vegetais. Mas em alguns casos, a infecção por *Phytomonas* está associada a doenças letais, por exemplo, a necrose do floema em plantas de café (*P. leptovorum*) (GIBBS, 1957; JANKEVICIUS et al., 1988).

A necrose floema em café é uma fitopatologia que tem como agente etiológico a espécie *P. leptovorum*. Essa patologia foi descrita por Gerold Stahel em 1931 que analisou o floema de plantas de café da espécie *Coffea liberica* no Suriname. Os sintomas desta fitopatologia incluem: as folhas tornam-se amarelas e caem prematuramente, as novas folhas surgem em quantidade e tamanho menor do que, quando comparadas com plantas saudáveis, as folhas vão ficando escassas até que a planta não tenha mais folhas e ocorra a necrose dos vasos floemáticos. A morte se dá em um período de 3 a 12 meses (DOLLET, 2001). Plantas de café parasitadas por estes organismos e com os mesmos sintomas foram encontradas

em outros locais da América do Sul, inclusive no Brasil (JANKEVICIUS, 1988; SERRANO *et al.*, 1999; VERMEULEN, 1963).

## 2.1. Ciclo de Vida

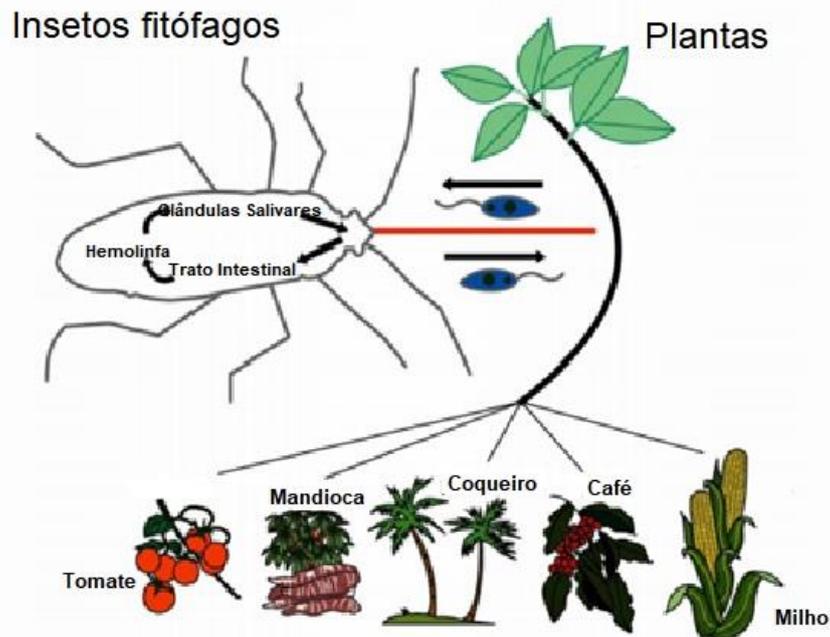
Os protozoários do gênero *Phytomonas* possuem um ciclo de vida dixênico, sendo os vetores de transmissão insetos fitófagos e as plantas os hospedeiros definitivos. Os insetos vetores pertencem à ordem Hemiptera e estão classificados entre as três famílias: Coreidae, Lygaeidae e Pentatomidae (**Tabela 2**).

**Tabela 2 - Família de insetos vetores dos protozoários do gênero *Phytomonas* (adaptado de CAMARGO; WALLACE, 1994).**

Parasita	Planta	Inseto	Família
<i>Phytomonas elmassiani</i>	<i>Asclepias spp.</i>	<i>Oncopeltus fasciculatus</i>	Lygaeidae
<i>P. elmassiani</i>	<i>Asclepias spp.</i>	<i>Oncopeltus sandarachatus</i>	Lygaeidae
<i>P. elmassiani</i>	<i>Asclepias spp.</i>	<i>Lygaeus kalmii</i>	Lygaeidae
<i>P. elmassiani</i>	<i>Asclepias spp.</i>	<i>Oncopeltus cingulifer</i>	Lygaeidae
<i>P. elmassiani</i>	<i>Asclepias spp.</i>	<i>Oncopeltus unifasciatellus</i>	Lygaeidae
<i>P. elmassiani</i>	<i>Pergularia extensa</i>	<i>Oncopeltus famelicus</i>	Lygaeidae
<i>Phytomonas davidi</i>	<i>Euphorbia pilulifera</i>	<i>Nysius euphorbiae</i>	Lygaeidae
<i>P. davidi</i>	<i>Euphorbia hypericifolia</i>	<i>Nysius euphorbiae</i>	Lygaeidae
<i>P. davidi</i>	<i>Euphorbia hirta</i>	<i>Dieuches humilis</i>	Lygaeidae
<i>P. davidi</i>	<i>E. pinea</i>	<i>Dicranocephalus agilis</i>	Coreidae
<i>P. davidi</i>	<i>E. peplus</i>	<i>Dicranocephalus agilis</i>	Coreidae
<i>P. davidi</i>	<i>E. pilulifera</i>	<i>Pachybrachius bilobata scutellatus</i>	Coreidae
<i>P. davidi</i>	<i>E. hypericifolia</i>	<i>P. bilobata scutellatus</i>	Coreidae
<i>P. davidi</i>	<i>E. hirta</i>	<i>P. bilobata</i>	Coreidae
<i>P. davidi</i>	<i>E. hyssopifolia</i>	<i>P. bilobata</i>	Coreidae
<i>Phytomonas sp.</i>	<i>Cecropia palmata</i>	<i>Edessa loxdali</i>	Pentatomidae
<i>P. staheli</i>	<i>Elaeis guineenses</i>	<i>Lincus lethifer</i>	Pentatomidae
<i>P. staheli</i>	<i>Elaeis guineenses</i>	<i>Lincus lobuliger</i>	Pentatomidae
<i>P. staheli</i>	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Lincus croupius</i>	Pentatomidae
<i>Phytomonas serpens</i>	<i>Lycopersicon esculenta</i>	<i>Nezara viridula</i>	Pentatomidae
<i>P. serpens</i>	<i>Lycopersicon esculenta</i>	<i>Phthia picta</i>	Coreidae

O ciclo de vida tem início quando o inseto se alimenta de tecidos vegetais, tais como sementes, látex, vasos floemáticos, frutos e flores que contém os

protozoários flagelados na forma promastigota. Estes micro-organismos migram para o trato intestinal do inseto, posteriormente para a hemolinfa e para as glândulas salivares. Quando o vetor se alimenta de tecidos vegetais ocorre a transmissão dos flagelados via saliva, conforme mostrado na **Figura 2** (LOPES, 2010).



**Figura 2** - Ciclo de vida dos tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* (adaptado de LOPES, 2010).

## 2.2. *Phytomonas serpens*

Em 1957, o pesquisador Adrian J. Gibbs observou na seiva de tomates (*Solanum lycopersicum*) localizados na África do Sul a presença de protozoários flagelados, com movimentos similares aos de serpentes e os classificou como *Leptomonas serpens*, tendo em vista, que o gênero *Phytomonas* ainda não havia sido aceito. Além de identificar os parasitas, ele também observou que a transmissão para a planta era realizada pelo inseto vetor *Nezara viridula* (GIBBS, 1957; JANKEVICIUS *et al.*, 1989).

Jankevicius *et al.* (1989) também observaram estes mesmos protozoários no território brasileiro. O estudo foi realizado com tomates de diferentes localidades do Brasil: na cidade de Rolândia, no estado do Paraná e na cidade de Palmital em São

Paulo. Na seiva dos tomates, foram observados protozoários flagelados, que apresentavam a forma promastigota, mas com algumas diferenças entre as células. Algumas apresentavam torções, outras o tamanho do flagelo reduzido, ou um corpo mais achatado ou alongado. O vetor identificado foi o inseto fitófago *Phthia picta*. Os parasitas também isolados e cultivados em meio de cultura e foi observado o mesmo polimorfismo da seiva do tomate.

Não há relatos de patogenicidade por *P. serpens*, porém foi observado que há uma formação de pontos amarelos nos frutos de tomate onde ocorre a picada do vetor, o que acarreta a desvalorização dos frutos para a sua comercialização (MEDINA *et al.*, 2015).

Durante o ciclo de maturação do tomate há uma diferença na concentração dos protozoários *P. serpens*. A concentração dos parasitas é maior em tomates maduros do que em tomates verdes, e isto provavelmente ocorre porque as plantas de tomate produzem um composto químico denominado de tomatina. A tomatina inibe o crescimento dos parasitas e é degradada ao longo do tempo, sendo a maior concentração em tomates verdes (MEDINA *et al.*, 2015).

### **3. Centrinas**

As centrinas são proteínas conservadas encontradas em organismos eucariotos, também conhecidas como caltractinas e pertencem à superfamília de proteínas denominada *EF-Hands* com massa molecular em torno de 20 kDa. São encontradas nos centros organizadores de microtúbulos ou em fibras contráteis associadas aos microtúbulos, principalmente nos organismos unicelulares (GOGENDEAU *et al.*, 2008; SALISBURY, 1995).

#### *3.1. Superfamília das EF-Hands*

A superfamília de proteínas *EF-Hands* é composta por proteínas que apresentam em sua estrutura motivos *EF-Hands*. O nome deste motivo foi dado pelos pesquisadores Robert H. Kretsinger e Clive E. Nockolds ao estudarem a estrutura da proteína parvoalbumina (KRETSINGER; NOCKOLDS, 1972). Desta

superfamília também fazem parte as famílias de proteínas das calmodulinas, proteínas S100, troponina C, caltractinas (centrinas) e parvoalbuminas.

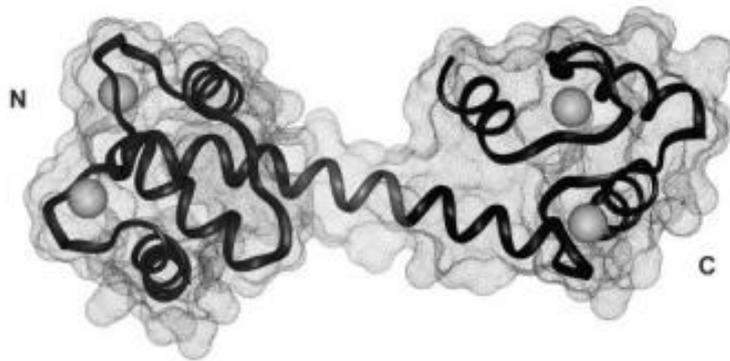
O motivo *EF-Hand* é formado por uma estrutura de “hélice-volta-hélice”, a qual é composta por duas  $\alpha$ -hélices unidas por uma região formando a volta, onde pode ocorrer a ligação ao cálcio. A primeira  $\alpha$ -hélice é denominada “E” e a segunda “F” e geralmente o domínio *EF-Hand* que ocorre em pares. A ligação do íon de cálcio à volta faz com que a hélice “F” mova-se promovendo uma conformação “aberta” da proteína expondo os resíduos hidrofóbicos (**Fig. 3**) (NAKAYAMA *et al.*, 1994; LEWIT-BENTLEY; RÉTY, 2000; KAWASAKI *et al.*, 2012).



**Figura 3 – Representação do motivo *EF-Hand*** (adaptado de LEWIT-BENTLEY; RÉTY, 2000).

### 3.2. *Estrutura das proteínas centrinas*

A estrutura das centrinas é similar a um haltere, formada por domínios separados por uma  $\alpha$ -hélice (**Fig. 4**). Cada domínio é formado por dois motivos *EF-Hand*, sendo que estes podem apresentar um ou mais sítios de ligação ao cálcio não funcionais (HU *et al.*, 2004).



**Figura 4- Estrutura da proteína centrina (N. região N-terminal e C. região C-terminal)** (adaptado de HU et al., 2004).

### 3.3. Funções em organismos eucariotos

As centrinas já foram descritas em diversos organismos eucariotos como algas, protozoários, fungos, plantas e animais (vertebrados e invertebrados), sendo que a primeira descrição foi realizada nas raízes flageladas de algas verdes da espécie *Tetraselmis striata* (SALISBURY et al., 1984). Em protozoários da espécie *Toxoplasma gondii* foram descritas três centrinas encontradas nos centríolos, porém a centrina 2 também foi citolocalizada no complexo basal e anéis pré-conoidais e periféricos (HU et al. 2006). Além disso, foi demonstrado que a depleção da centrina 2 afetou a divisão do protozoário e a invasão das células hospedeiras (HU et al. 2006; LEUNG et al., 2019).

No protozoário da espécie *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, foram encontrados quatro genes correspondentes às centrinas (*PfCEN1*, *PfCEN2*, *PfCEN3* e *PfCEN4*). As centrinas foram citolocalizadas em células das diferentes formas do parasita no seu ciclo de vida. No estágio de gametócito, todas foram identificadas por imunofluorescência, sendo que as centrinas 2 e 3 apresentaram sinal mais forte de fluorescência. Já no estágio oocisto, foram localizadas apenas as centrinas 1 e 3 e por fim na morfologia de esquizonte todas as quatro proteínas foram observadas, sendo que o sinal mais forte foi observado nas centrinas 2 e 3 (MAHAJAN et al., 2008).

Em mamíferos, a centrina 2 foi localizada ao redor do material pericentriolar e nos centríolos, relacionada à duplicação dos centríolos (SALISBURY et al., 2002).

A centrina 4 foi citolocalizada nos corpos basais de células ciliares localizadas no cérebro de camundongos da espécie *Mus musculus*. Além disso, estudos também avaliaram a expressão de mRNA em diferentes células, onde foi observado que havia alta expressão no cérebro, pulmão, rins e ovários (GAVET *et al.*, 2003).

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a centrina CDC31 está associada com a duplicação dos corpos polares do fuso. Além disso, foi descrita como associada a diferentes funções como a exportação de mRNA do núcleo para o citoplasma (BAUM *et al.*, 1986; FISCHER *et al.*, 2004).

Além de funções associadas aos centríolos, centrossomos e corpos basais, as centrinas também foram relatadas como relacionadas com o reparo de DNA. Células de galinha DT40 deficientes em centrinas 2, 3 e 4 apresentaram uma taxa menor de reparo de DNA, quando foram expostas a raios ultravioleta (DANTAS *et al.*, 2011).

### 3.4. Centrinas em tripanossomatídeos

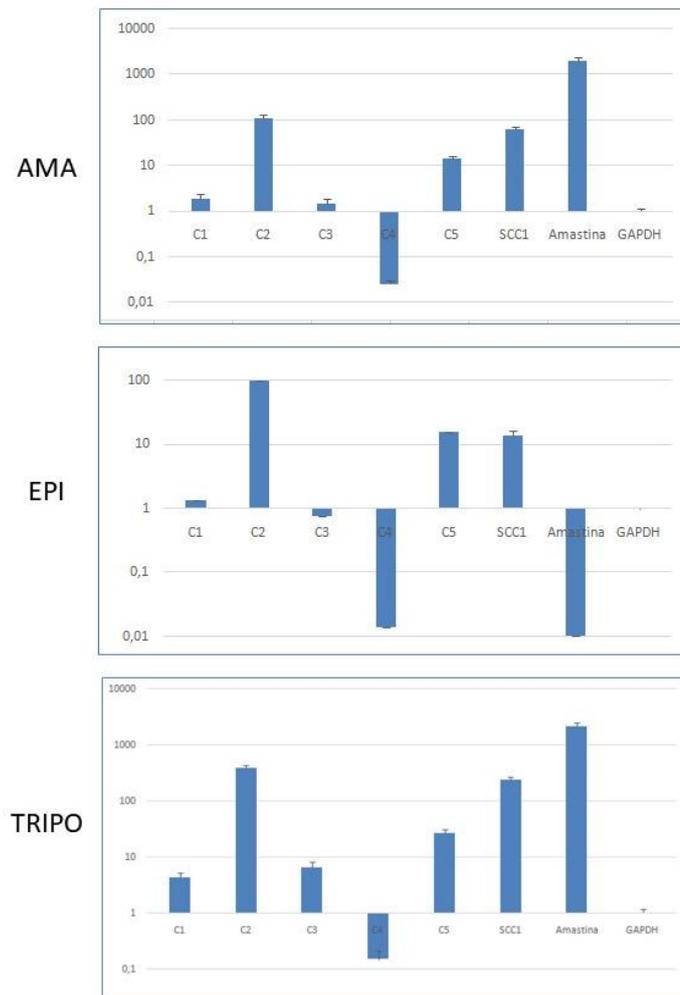
Com o sequenciamento do genoma dos parasitas *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* foram identificados cinco genes para centrinas e foram indicadas as funções e localização de algumas destas centrinas, sendo que a maioria foi caracterizada no protozoário *T. brucei* (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2012).

Em *T. brucei* foram identificadas as centrinas: TbCen1, TbCen2, TbCen3, TbCen4 e recentemente a TbCen5. A TbCen1 (centrina 1) foi descrita como envolvida na duplicação do corpo basal. Já a TbCen2 (centrina 2) foi encontrada próxima ao corpo basal e participa do processo de duplicação do complexo de Golgi (HE *et al.*, 2005). A TbCen3 (centrina 3) foi localizada no flagelo e associada à motilidade celular (WEI *et al.*, 2014). A TbCen4 (centrina 4) foi relacionada a processos de duplicação de organelas e citocinese (HE *et al.*, 2005; SHI *et al.*, 2008). A TbCen 5 de *T. brucei* liga-se a dois íons de  $Ca^{2+}$  e foi encontrada principalmente enriquecida no flagelo, mas também no núcleo celular mudando sua distribuição ao longo do ciclo celular (SHAN *et al.*, 2019).

Estudos *in vitro* com células de *Leishmania donovani* e macrófagos demonstraram que a centrina LdCenp está associada à proteínas presentes nos corpos basais e encontra-se relacionada aos processos de divisão celular e

citocinese na forma de amastigota, a qual é encontrada dentro das células hospedeiras (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2004).

Em relação ao protozoário *Trypanosoma cruzi*, o nosso grupo de pesquisa avaliou os níveis de expressão de mRNA correspondentes aos genes *TcCEN1*, *TcCEN2*, *TcCEN3*, *TcCEN4* e *TcCEN5* nas diferentes formas do protozoário (amastigota, tripomastigota e epimastigota) por PCR em tempo real. Os níveis de mRNA foram normalizados com os níveis de mRNA da enzima gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH). De acordo com os resultados, estes genes são expressos em todas as formas analisadas e os níveis relativos de mRNA das centrinas 2 e 5 são os maiores em relação às outras centrinas. Além disso, os níveis relativos de mRNA da centrina 3 foram equivalentes ao da GAPDH nas formas epimastigotas e amastigotas, mas foi maior nas formas tripomastigotas. A centrina 4 apresentou o menor nível relativo de mRNA nas três formas, em relação às outras centrinas e à GAPDH (**Figura 5**) (SOUZA, 2016).



**Figura 5 - Níveis de expressão de mRNA dos genes *TcCen1*(C1), *TcCen2*(C2), *TcCen3* (C3), *TcCen4*(C4), *TcCen5* (C5) em relação ao gene endógeno GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) (SOUZA, 2016).**

Além disso, no nosso grupo também foram avaliados os níveis de expressão de mRNA dos genes correspondentes as centrinas 1 a 5 de *P. serpens* 9T que também foram normalizados com os níveis de expressão de GAPDH. De acordo com os resultados obtidos, a centrina 1 apresentou os maiores níveis relativos de expressão e a centrina 2, os menores. A centrina 5 obteve o segundo menor nível de expressão (**Fig.6**) (CARNEIRO *et al.*, 2017).

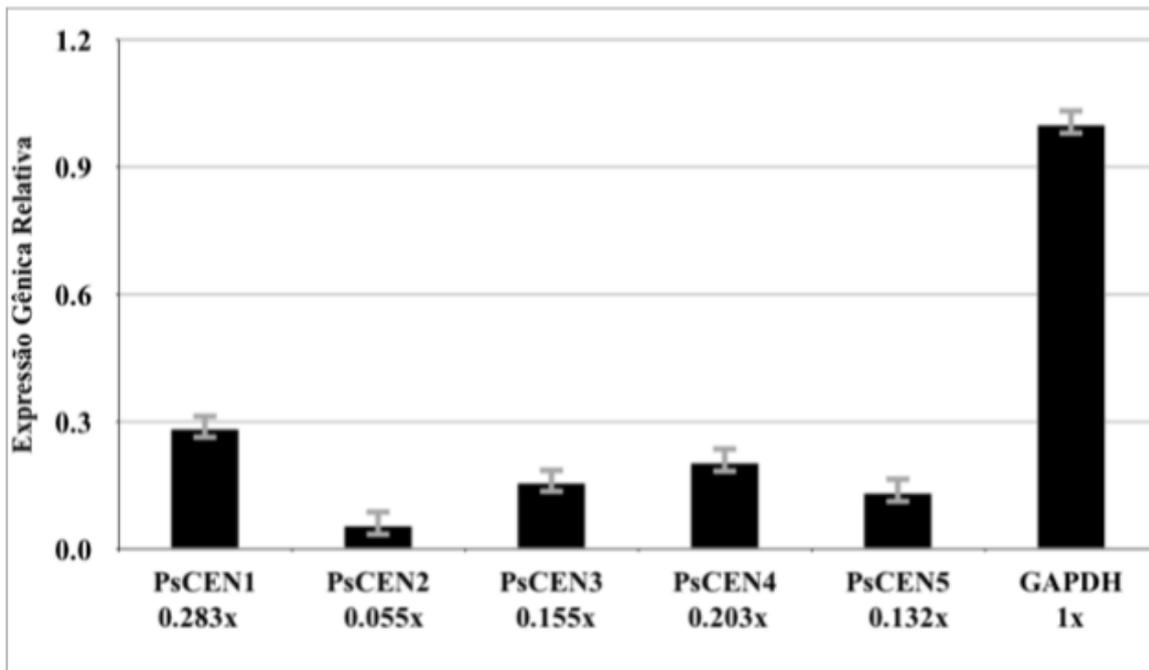


Figura 6 - Expressão de mRNA dos genes correspondentes as centrinas 1 a 5 de *Phytomonas serpens* 9T. *PsCEN1* (centrina 1); *PsCEN2* (Centrina 2); *PsCEN3* (centrina 3); *PsCEN4* (Centrina 4); *PsCEN5* (Centrina 5) e GAPDH (CARNEIRO et al., 2017).

## JUSTIFICATIVA

O gênero *Phytomonas* pertence à família Trypanosomatidae, mesma família de protozoários parasitas de humanos e animais domésticos, tendo assim grande importância médica e veterinária. Deste modo, o gênero *Phytomonas* compartilha algumas características com os outros tripanossomatídeos, sendo um modelo seguro para o estudo da família, já que não são patógenos animais.

Além disso, não existem muitos dados na literatura sobre este gênero e não há nenhum estudo em relação às centrinas destes parasitas. O estudo das centrinas pode fornecer informações sobre o ciclo celular e/ou motilidade celular de *Phytomonas serpens* e dos outros tripanossomatídeos, principalmente a centrina 5 que parece ser restrita à família Trypanosomatidae.

Ademais, o parasitismo por *Phytomonas sp.*, em alguns casos pode ocasionar doenças letais a plantas, inclusive de importância econômica como o café e a mandioca, por exemplo. Então, o estudo destes micro-organismos, além de contribuir para o maior entendimento dos tripanossomatídeos, pode fornecer dados que ajudem no controle destes parasitas.

## OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é estudar as proteínas centrinas do protozoário parasita de tomate *Phytomonas serpens*.

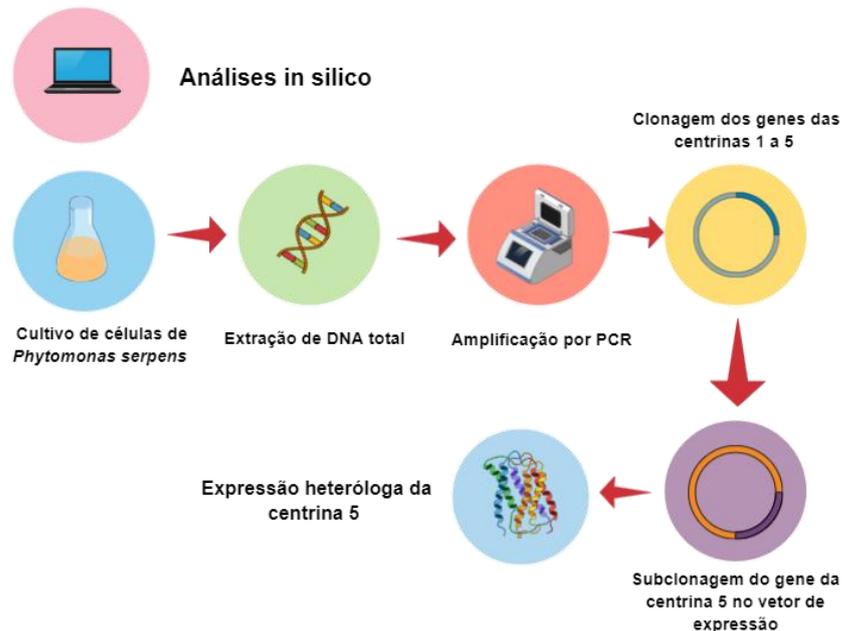
### Objetivos específicos

- ✓ Analisar *in silico* genes e proteínas preditas de centrinas em *P. serpens*;
- ✓ Clonar os genes correspondentes às centrinas 1 a 5 de *P. serpens*;
- ✓ Produzir a proteína centrina 5 de *P. serpens* em células de *Escherichia coli*.

# MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Estratégia experimental

Este trabalho tem o objetivo de estudar as proteínas centrinas de *P. serpens* linhagem 9T, principalmente a proteína centrina 5, através de análises *in silico* e da expressão heteróloga da proteína centrina 5. Para isso a estratégia experimental empregada neste trabalho foi: 1. O cultivo de células de *P. serpens* linhagem 9T em meio BHI; 2. Extração de DNA total dos parasitas; 3. Amplificação dos genes correspondentes às centrinas de *P. serpens* por PCR com a utilização de iniciadores específicos a partir do DNA total; 4. Clonagem dos genes correspondentes às centrinas 1 a 5 no vetor de clonagem pGEM-T Easy de *Escherichia coli* (Promega); 5. Digestão do fragmento correspondente à centrina 5 de *P. serpens* e subclonagem no vetor de expressão pET28a(+) de *Escherichia coli*; 7. Expressão heteróloga da proteína centrina 5 em células de *E. coli* linhagem BL21(DE3) (Figura 7).



**Figura 7 - Estratégia experimental utilizada para a execução deste trabalho.** Análises *in silico*, clonagens dos genes correspondentes as centrinas 1 a 5 de *Phytomonas serpens* e a expressão heteróloga da proteína centrina 5.

## 2. Material

## 2.1. *Linhagens celulares*

### 2.1.1. ***Phytomonas serpens* 9T**

Para este trabalho foram utilizadas células de *Phytomonas serpens* linhagem 9T, provenientes da coleção microbiológica do Laboratório de Biologia do Gene, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.

### 2.1.2. ***Escherichia coli* DH5 $\alpha$**

A linhagem de *E. coli* DH5 $\alpha$  [F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1] foi utilizada neste trabalho para a clonagem dos genes *PsCEN1*, *PsCEN2*, *PsCEN3*, *PsCEN4* e *PsCEN5*.

### 2.1.3. ***Escherichia coli* BL21(DE3)**

A linhagem BL21(DE3) [fhuA2 [lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm]  $\Delta$ hsdS  $\lambda$  DE3 =  $\lambda$  sBamHI  $\Delta$ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21  $\Delta$ nin5] da bactéria *E. coli* foi utilizada neste trabalho para a expressão da proteína heteróloga.

## 2.2. *Soluções utilizadas*

### **Solução de lise**

A solução de lise é composta por Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,1 M (pH 8,0), SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 0,5%. Para o preparo os compostos foram misturados e no momento do uso da solução foram adicionados 20  $\mu$ g/ml de RNase pancreática DNase-free (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

### **Solução de Lise (Gel de Poliacrilamida)**

A solução de lise de células de *Escherichia coli* para a extração de proteínas  
Composição: 80 mM de Tris-HCl (pH 6,8); Sacarose 12%; 2 % de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio); 0,01% de azul de bromofenol, 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol e água deionizada para completar o volume (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Solução de Ressuspensão (Extração de DNA plasmidial por lise Alcalina)**

Composição: 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0 e água deionizada para completar o volume (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Solução de lise (Extração de DNA plasmidial por lise alcalina)**

Composição: 0,2 N de NaOH e 1% (p/v) de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Solução de Neutralização (Extração de DNA plasmidial por lise alcalina)**

Composição: 60 ml de acetato de potássio 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial e 28,5 ml de água deionizada (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Solução X-Gal 2% (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo)**

Composição: 20 mg de X-gal dissolvidos em 1 ml de dimetilformamida (SAMBROOK, RUSSELL; 2001).

### **Tampão de Amostra 2 X (Gel de Poliacrilamida)**

Composição: 100 mM de Tris-Cl (pH 6,8), SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 4%, azul de bromofenol 0,2%, 20% de glicerol, 200 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (SAMBROOK, RUSSELL; 2001).

### **Tampão TB**

Composição: 2,39 g/L de Hepes, 1,66 g/L de CaCl<sub>2</sub>, 18,64 g/L de KCl e 10,88 g/L de MnCl<sub>2</sub>. O pH é ajustado para 6,7 com KOH (Inoue, Nojima e Okayama, 1990) e a esterilização é realizada por filtração utilizando filtros de 0,45  $\mu$ m.

### **Tampão TE (pH 8,0) – Tris-EDTA**

Composição: 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de EDTA (pH 8,0). A solução é esterilizada em autoclave por 20 min a 121°C (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

### **Tampão de Transferência**

Composição: 24 mM de Tris base, 192 mM de glicina e 20% de metanol (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

### **IPTG 100 mM (Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo)**

Composição: 2,38 g de IPTG dissolvidos em 100 mL de água deionizada e a solução é esterilizada por filtração em filtros de 0,22  $\mu$ m e armazenada a -20 °C (NOVAGEN, 2011).

### **Tampão PBS 1 X (Phosphate Buffered Saline)**

Composição: NaCl (8 g/L), KCl (0,2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,44 g/L) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,240 g/L). O pH é ajustado para 7,4 e a solução é esterilizada por filtração em filtro de 0,22  $\mu$ m e armazenada a 4 °C.

## **2.3. Soluções para geis de agarose e poliacrilamida**

### **Solução de Coloração Coomassie**

Composição: 0,25 g de Coomassie Brilliant Blue R-250 em 90 ml de solução de metanol:água (45 ml de metanol:45 ml de água) e 10 ml de ácido acético glacial. A solução é filtrada em filtro Whatman nº 1 (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

### **Tampão de corrida 10 X (solução estoque)**

Composição: Tris 250 mM, 2% de SDS e glicina (pH 8,3) 2,5 M (SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

### **Tampão TBE 5X (solução estoque) – Tris/Borato/EDTA**

Composição: 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico e 20 ml de 0,5 M EDTA (pH 8,0) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Tampão TBE 0,5 X (solução de uso)**

Composição: 45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Brometo de Etídio (Invitrogen™)**

Concentração estoque: 10 mg/ml

Concentração de uso do brometo de etídio: 5 µg/ml

### **Tampão de amostra SDS 1 X**

Composição: 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8), SDS 2% (m/v), azul de bromofenol 0,1% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β-mercaptoetanol 100 mM (adaptado SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **Solução Azul de bromofenol 0,4% (m/v)**

Composição: 0,4 g de azul de bromofenol dissolvidos em 1 ml de água deionizada estéril (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

## *2.4. Meios de Cultura*

### **Meio BHI (Broth Heart Infusion – Infusão cérebro-coração)**

Composição: 17,5 g/L de infusão de cérebro-coração, 10 g/L de digestão enzimática de gelatina, 2 g/L de dextrose, 5 g/L de cloreto de sódio e 2,5 g/L de fosfato de sódio. O pH é ajustado para 7,4 e esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 min (ACUMEDIA).

### **Meio LB ágar (Luria-Bertani)**

Composição: triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), NaCl (10 g/L) e bactor ágar (15 g/L). O pH é ajustado para 7,0 com NaOH 5 N. A esterilização é realizada em autoclave a 121°C por 20 minutos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

#### **Meio SOB**

O meio de cultura SOB é composto por: triptona (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L), NaCl (0,5 g/L) e 10 ml de cloreto de potássio 250mM. Para o preparo do meio os solutos são diluídos em água deionizada. O pH da solução é ajustado para 7,0, utilizando hidróxido de sódio 5 N. A esterilização é realizada em autoclave a 121 °C por 20 min. Após a esterilização são adicionados 5 ml de solução de MgCl<sub>2</sub> 2 M (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

#### **Meio SOC**

O meio SOC é composto pelo meio SOB, com a adição de glicose 1 M estéril, para que a concentração final seja de glicose 20 mM (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

#### **Meio LB (Luria-Bertani)**

Composição: triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e NaCl (10g/L). O pH é ajustado para 7,0 com NaOH 5 N e esterilizado em autoclave por 20 min a 121 °C (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### *2.5. Vetores plasmidiais*

#### **Vetor de clonagem em *E. coli* (pGEM<sup>®</sup>-T Easy)**

Para a clonagem dos genes foi utilizado o vetor de clonagem pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega) (**Fig. 8**). O vetor possui em sua estrutura o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Amp<sup>r</sup>), que permite a seleção das células transformadas.

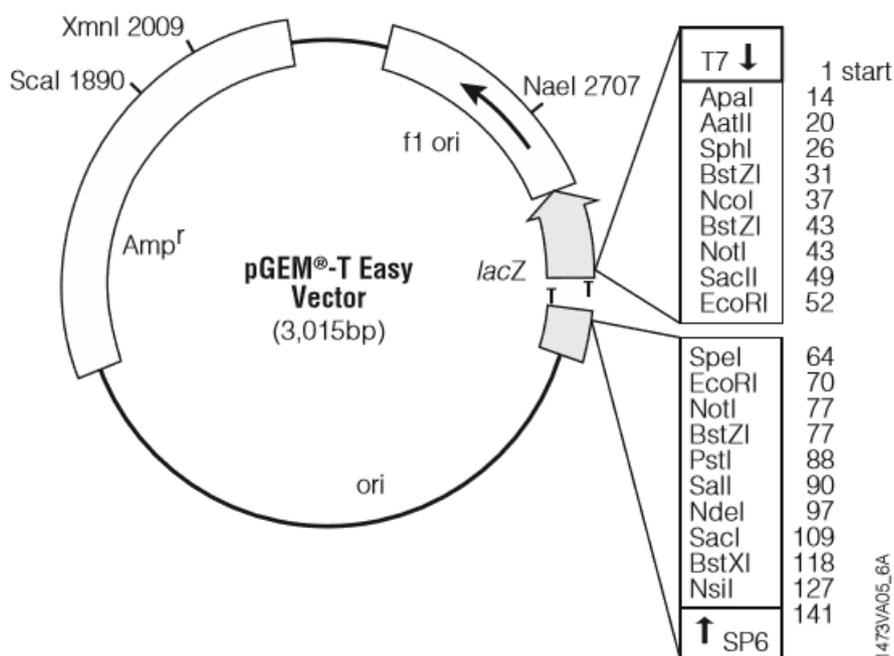


Figura 8 - Mapa do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy.

O pGEM<sup>®</sup>-T Easy é um vetor linearizado e possui em cada uma das extremidades 3' um resíduo "T". A enzima *Taq* Polimerase utilizada para a amplificação por PCR adiciona em cada extremidade 3' um resíduo "A", o que permite a ligação do produto de PCR com o vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega).

### Vetor de Expressão em *Escherichia coli* (pET28a(+)) (Novagen<sup>®</sup>)

Para a expressão da proteína heteróloga foi utilizado o vetor de expressão em *Escherichia coli* pET28a(+) (Novagen<sup>®</sup>). Este vetor apresenta em sua estrutura o gene de resistência ao antibiótico Canamicina (Kan) que permite a seleção das células transformadas com este plasmídeo. Outra característica deste vetor é que ele possui uma sequência denominada His-tag, a qual codifica seis aminoácidos histidina na região N-terminal que permite a purificação das proteínas recombinantes em coluna de afinidade de níquel.

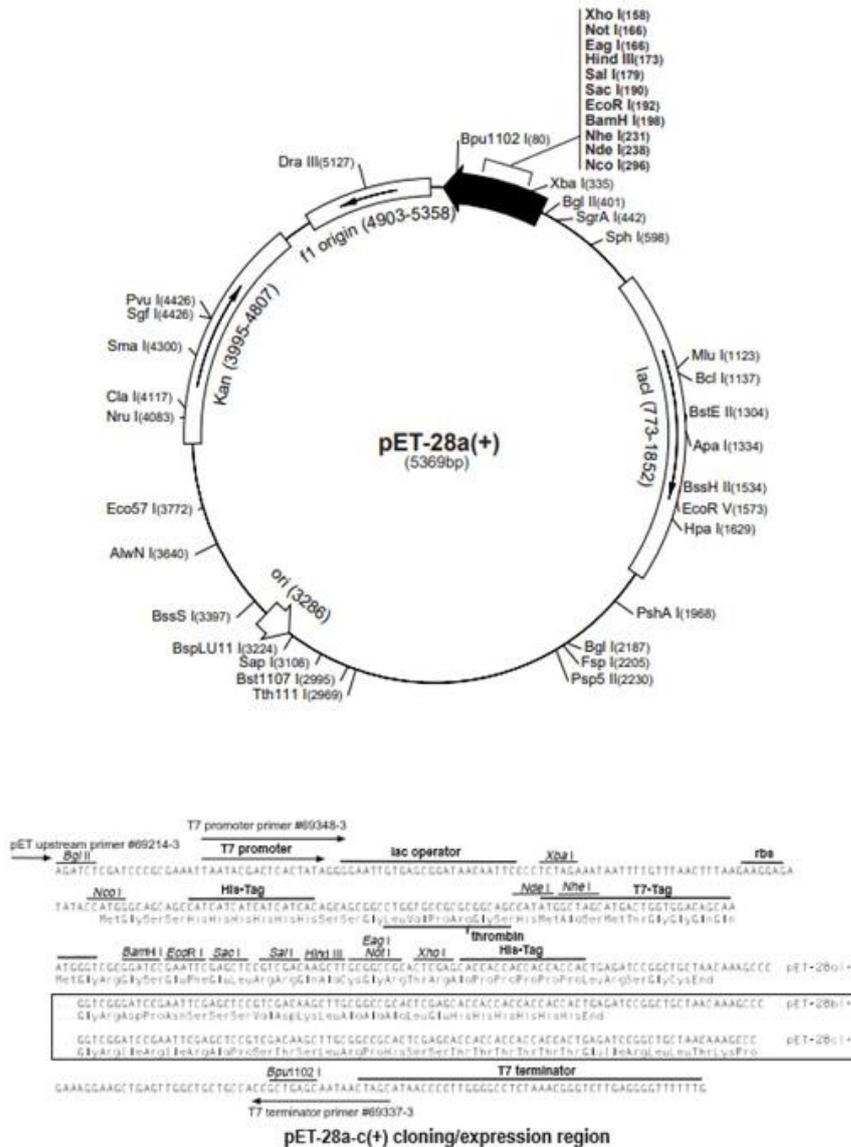


Figura 9 - Mapa do vetor de expressão em *Escherichia coli* pET28a(+).

### 3. Métodos

#### 3.1. Busca das seqüências nos bancos de dados

Para a análise das relações filogenéticas das centrinas, as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos dos diferentes organismos foram pesquisadas no banco de dados NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Os números de acesso de cada sequência encontram-se no **ANEXO I**.

O genoma de *P. serpens* 9T foi sequenciado, mas ainda não foi anotado. A anotação dos genes consiste em definir as regiões que correspondem a possíveis genes e a função destes baseada na similaridade entre as sequências conservadas.

O tripanossomatídeo *T. brucei* tem o genoma sequenciado e anotado. A partir das sequências das centrinas deste protozoário foram obtidas as sequências de *P. serpens*. Para isso, as sequências de nucleotídeos correspondentes às centrinas do *T. brucei* foram submetidas no blastx (disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>). O blastx é um programa da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) no qual a partir da sequência de nucleotídeos depositada são geradas sequências de aminoácidos, as quais são alinhadas com as sequências disponíveis no banco de dados.

A partir dos alinhamentos foram encontradas sequências de aminoácidos similares aos isolados *Phytomonas* sp. (EM1) e *Phytomonas* sp. (HART1). Com estas sequências obtidas, as centrinas de *P. serpens* 9T foram buscadas através do alinhamento entre as sequências de aminoácidos dos isolados e as sequências presentes no banco de dados *GenBank* no sítio: <[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROG\\_DEF=blastn&BLAST\\_SPEC=Assembly&ASSEMBLY\\_NAME=GCA\\_000331125.1](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_SPEC=Assembly&ASSEMBLY_NAME=GCA_000331125.1)>, onde encontra-se disponível o genoma de *P. serpens* 9T. As sequências obtidas estão disponíveis no **ANEXO II**.

### 3.2. Análise da similaridade entre as centrinas de *P. serpens*

As sequências de aminoácidos de cada centrina de *P. serpens* foram alinhadas, com o objetivo de analisar a similaridade entre elas. Para o alinhamento, foi utilizado o programa Muscle (**Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation**) e o software MEGA (**Molecular Evolutionary Genetics Analysis**) versão 7.0.21. As imagens correspondentes aos alinhamentos foram produzidas no software Geneious versão 10.0.5.

Os domínios de ligação ao cálcio foram analisados no banco de dados de domínios proteicos, famílias e sítios funcionais: PROSITE (disponível em:<

<https://prosite.expasy.org/>) e as massas moleculares foram calculadas no software SnapGene® Viewer 4.3.11.

### 3.3. Construção do Cladograma

As sequências de aminoácidos correspondentes às centrinas obtidas nos bancos de dados foram alinhadas no programa ClustalW e o cladograma foi construído pelo método de aproximação de vizinhos no programa BioEdit versão 7.0.4.1. (HALL, 1999).

### 3.4. Modelagem por homologia

As estruturas tridimensionais das proteínas centrinas de *P. serpens* foram preditas através da utilização do servidor da web, de modelagem por homologia, SWISS-MODEL (disponível em: <<https://swissmodel.expasy.org/>>). Neste tipo de análise a sequência da proteína alvo é comparada com a sequência primária de proteínas denominadas modelo. Estas estão armazenadas em bancos de dados de proteínas e suas estruturas tridimensionais já foram resolvidas experimentalmente. A partir da comparação entre a proteína alvo e os modelos, as estruturas tridimensionais para a proteína alvo são preditas (WATERHOUSE, A. *et al.*, 2018).

Para a modelagem das centrinas, as sequências de aminoácidos correspondentes as proteínas foram submetidas no servidor e então possíveis modelos foram buscados. Os modelos foram selecionados com base na identidade entre as sequências e o valor GMQE (*Global Model Quality Estimation*), este está associado a qualidade do alinhamento entre as sequências alvo e modelo e varia entre 0 e 1, sendo que, quanto maior o número melhor é a qualidade do alinhamento (WATERHOUSE, A. *et al.*, 2018).

### 3.5. Cultivo de células de *P. serpens* em meio BHI

As células de *P. serpens* linhagem 9T foram cultivadas em meio BHI (*Brain Heart Infusion* – Infusão cérebro-coração) com os antibióticos penicilina 100 µg/ml e estreptomicina 100 µg/ml, em estufa microbiológica a 28°C. O crescimento da

cultura foi monitorado através de sucessivas contagens na Câmara de Neubauer (a cada 24 h) e a cultura foi mantida através de repiques diários.

### 3.6. *Extração de DNA total de células de P. serpens*

O DNA total de *P. serpens* foi obtido utilizando o protocolo de extração de DNA por fenol:clorofórmio. Para isso, a cultura foi centrifugada a 1.500 g por 10 min a 4°C. Logo após, as células foram lavadas em tampão TBS e centrifugadas a 1.500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em tampão TE (pH 8,0). Depois, foram adicionados 10 ml de tampão de lise e a solução foi incubada durante 1 h a 37 °C.

A solução foi transferida para tubos de centrifugação. Logo após, foi adicionada proteinase K para obter a concentração 100 µg/ml e o tubo foi incubado a 50°C durante 3 h. A solução foi resfriada até atingir a temperatura ambiente e então foi adicionado fenol equilibrado com 0,1 M de Tris-HCl (pH 8,0). O fenol foi misturado vertendo o tubo, e as fases foram separadas por centrifugação a 5.000g por 15 min à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A extração foi repetida com ½ volume de fenol equilibrado e ½ volume de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (50:1) e uma extração final foi realizada com 1 volume de solução clorofórmio-álcool isoamílico.

Na solução aquosa final foram adicionados 0,3 M de NaCl e 2,5 volumes de álcool etílico a 100% para a precipitação do DNA. O DNA foi coletado por centrifugação a 10.000 g por 20 min a 4°C. O DNA precipitado foi lavado com álcool etílico 70% e a solução centrifugada a 10.000g a 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em água ultrapura esterilizada (adaptado de SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

### 3.7. *Amplificação dos genes PsCEN1, PsCEN2, PsCEN3, PsCEN4 e PsCEN5 por PCR*

O DNA cromossomal proveniente da extração de células de *P. serpens* foi diluído em água deionizada na proporção 1:10, sendo que a concentração final foi de aproximadamente 10 ng/µL. A partir desta diluição foram montados sistemas de

volume igual a 30 µL (em tubos para PCR), para a amplificação por PCR dos genes *PsCEN1*, *PsCEN2*, *PsCEN3*, *PsCEN4* e *PsCEN5*. Cada sistema continha: 3 µL de tampão para PCR (sem Mg) 10 X (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 2 U da enzima *Taq DNA Polimerase Platinum* (Invitrogen™) e aproximadamente 10 ng de DNA. Os iniciadores utilizados para a amplificação de cada gene, assim como suas temperaturas de anelamento e o tamanho de cada fragmento estão na **Tabela 3**.

**Tabela 3 - Iniciadores utilizados para amplificação dos genes correspondentes as centrinas de *Phytomonas serpens* 9T.**

Iniciadores	Sequência (5'→3')	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento
PR602 ( <i>PsCEN1</i> + sítio <i>NdeI</i> ) – iniciador 5'	CAT <u>CATATG</u> CAGGCTTGGACTCGC	58°C	
PR603 ( <i>PsCEN1</i> + sítio <i>BamHI</i> ) – iniciador 3'	GTC <u>GGATCC</u> TTAGTAGTCATCCTCTTCCAAC	62°C	579 bp
PR604 ( <i>PsCEN2</i> + sítio <i>NdeI</i> ) – iniciador 5'	CAT <u>CATATG</u> CAGTCTGGAAGCTTTTCTG	64°C	
PR605 ( <i>PsCEN2</i> + sítio <i>EcoRI</i> ) – iniciador 3'	GCT <u>GAAATC</u> TTAGTACAGGGAGGTCTTTTTC	62°C	569 bp
PR606 ( <i>PsCEN3</i> + sítio <i>NdeI</i> ) – iniciador 5'	CAT <u>CATATG</u> AGCCAGAGAAGCTTCTCTAC	68°C	
PR607 ( <i>PsCEN3</i> + sítio <i>BamHI</i> ) – iniciador 3'	GTC <u>GGATCC</u> TTAATTCTTCTCAGATGACAACAT TTTC	72°C	507 bp
PR608 ( <i>PsCEN4</i> + sítio <i>NdeI</i> ) – iniciador 5'	GTC <u>CATATG</u> GCTGCGCTTACTGATG	58°C	
PR609 ( <i>PsCEN4</i> + sítio <i>EcoRI</i> )	CT <u>GGAATC</u> TTATTTTCCCTTCATTTGAATCA	58°C	456 bp
PR610 ( <i>PsCEN5</i> + sítio <i>NdeI</i> )	CAT <u>CATATG</u> TCAGCTCGCATTCCCAG	62°C	
PR692 ( <i>PsCEN5</i> + sítio <i>BglII</i> + stop codon)	GAT <u>AGATC</u> TGAATAAATAAGACTCGGCTTGC	62°C	687 bp

\* As sequências sublinhadas correspondem aos sítios para as enzimas de restrição. Os nucleotídeos em negrito correspondem ao códon de parada.

Os tubos com os sistemas foram transferidos para o termociclador iCycle (BioRad®), que foi configurado conforme o descrito: na **Tabela 4** (*PsCEN1*, *PsCEN2* e *PsCEN5*), **Tabela 5** (*PsCEN3*) e **Tabela 6** (*PsCEN4*).

**Tabela 4 - Ciclos de amplificação dos genes *PsCEN1*, *PsCEN2* e *PsCEN5* por PCR.**

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (seg.)</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	1	94	60
<b>Desnaturação</b>		94	30
<b>Anelamento</b>	35	60	30
<b>Extensão</b>		72	30
<b>Extensão final</b>	1	72	60

**Tabela 5 - Ciclos de amplificação do gene *PsCEN3* por PCR.**

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (seg.)</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	1	94	60
<b>Desnaturação</b>		94	30
<b>Anelamento</b>	35	62	30
<b>Extensão</b>		72	30
<b>Extensão final</b>	1	72	60

**Tabela 6 - Ciclo de amplificação do gene *PsCEN4* por PCR.**

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (seg.)</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	1	94	60
<b>Desnaturação</b>		94	30
<b>Anelamento</b>	35	56	30
<b>Extensão</b>		72	30
<b>Extensão final</b>	1	72	60

### 3.8. *Ligação das sequências amplificadas por PCR ao vetor pGEM®-T Easy*

Os genes amplificados por PCR foram clonados no vetor pGEM®-T Easy (Promega). As ligações entre o vetor e cada inserto foram feitas na proporção 3:1 (inserto:vetor). Para calcular a quantidade de inserto empregado em cada reação foi utilizada a fórmula abaixo:

$$ng \text{ de inserto} = \frac{ng \text{ de vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} \times \frac{3}{1}$$

O tamanho de cada inserto e a quantidade de DNA aplicada na ligação encontra-se na **Tabela 7**.

**Tabela 7- Tamanho de cada fragmento amplificado por PCR e a quantidade de DNA empregada para a ligação com o vetor pGEM-T Easy (Promega).**

Gene	Tamanho do fragmento	Quantidade de DNA
<i>PsCEN1</i>	579 bp	29,00 ng
<i>PsCEN2</i>	569 bp	28,30 ng
<i>PsCEN3</i>	507 bp	25,22 ng
<i>PsCEN4</i>	456 bp	22,70 ng
<i>PsCEN5</i>	687 bp	34,18 ng

Para a reação de ligação foram montados cinco sistemas de volume igual a 10  $\mu$ L. Cada sistema continha: 50 ng de vetor (pGEM<sup>®</sup>-T Easy), o DNA correspondente ao inserto na proporção calculada, 5  $\mu$ L do tampão 2X *Rapid Ligation*, 3 U da enzima T4 DNA Ligase (Promega) (3 U/ $\mu$ L), água deionizada estéril para completar o volume. Os tubos contendo as reações de ligação foram incubados a 16 °C durante a noite.

### 3.9. Preparo de células competentes para transformação

As células de *E. coli* foram submetidas a um protocolo de preparo de células competentes utilizando cloreto de cálcio (Inoue, Nojima e Okayama, 1990). As células foram espalhadas em meio LB ágar e incubadas a 37°C por 16 h. Da placa foram selecionadas cinco colônias, que foram inoculadas em 100 ml de meio SOB com MgCl<sub>2</sub> e incubadas a 18 °C a rotação igual a 220 rpm, até o crescimento atingir a OD<sub>600</sub>= 0,6. A cultura foi incubada no gelo por 10 min e centrifugada a 2.500 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em tampão TB (composição descrita na seção Material) e centrifugadas novamente a 2.500 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em meio TB com 7% de DMSO (dimetilsulfóxido), o volume foi dividido em alíquotas de 200  $\mu$ L e as células estocadas a - 80°C.

### 3.10. Transformação de células de *Escherichia coli* linhagem DH5 $\alpha$

Os produtos resultantes das ligações foram utilizados para a transformação de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Nas transformações foram utilizadas as reações de ligação do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy com os genes correspondentes as centrinas de 1 a 5 de *P. serpens* 9T. Para a transformação, cinco alíquotas das células de *E. coli* competentes foram descongeladas e então em cada tubo foram adicionados 5  $\mu$ L de DNA provenientes da ligação do vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy com o gene correspondente. Os tubos com as células foram incubados no gelo durante 30 min e depois incubados a 42°C durante 90 s. Em seguida, os tubos foram transferidos para o gelo onde permaneceram durante 2 min para finalizar o choque térmico. Depois, em cada tubo foram adicionados 800  $\mu$ L de meio SOC e seguido de incubação a 37°C durante 60 min (Inoue, Nojima e Okayama, 1990)).

Após a transformação, foram transferidos 150  $\mu$ L da suspensão de células para uma placa de Petri contendo ágar LB adicionado de 0,1 M de IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo), 80  $\mu$ g/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo) e 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

Após a formação de colônias na placa de LB ágar, foram selecionadas colônias brancas e cada uma foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio LB com 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação a 220 rpm durante a noite.

### 3.11. Extração de DNA plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial das células transformadas foi empregado o protocolo de lise alcalina. Para isso, 1,5 ml de cada tubo com a suspensão de células foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células ressuspensionado em 100  $\mu$ L da solução de ressuspensão (composição na seção material). Em seguida, foram acrescentados 200  $\mu$ L de solução de lise e misturados por inversão do tubo. Os tubos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente e então 150  $\mu$ L da solução

de neutralização foram adicionados e misturados por inversão do tubo. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga novo e então foram adicionados 450 µL de álcool isopropílico 100% e misturados por inversão do tubo. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 min. Depois foi feita a lavagem dos tubos com etanol 70% e centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. O sedimento de DNA foi deixado secar à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspensionado em 40 µL de água deionizada (adaptado de SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

As construções resultantes foram denominadas pGEM-TPsCEN1, pGEM-TPsCEN2, pGEM-TPsCEN3, pGEM-TPsCEN4 e pGEM-TPsCEN5.

As construções pGEM-TPsCEN5 e pET28a(+)*PsCEN5* foram encaminhadas para o sequenciamento com os iniciadores descritos na **Tabela 8**.

**Tabela 8 - Iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento.**

Identificação	Sequência (5'→3')	
T7 primer	TAATACGACTCACTATAGGG	pGEMTPsCEN5 (fita senso) e
PR692	GATAGATCTGAATAAATAAGACTCGGCTTGC	pET28a(+) <i>PsCEN5</i> (fita senso)
PR627 (M13 antisense)	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	pGEMTPsCEN5 (fita antisense)
PR610	CATCATATGTCAGCTCGCATTCCAG	

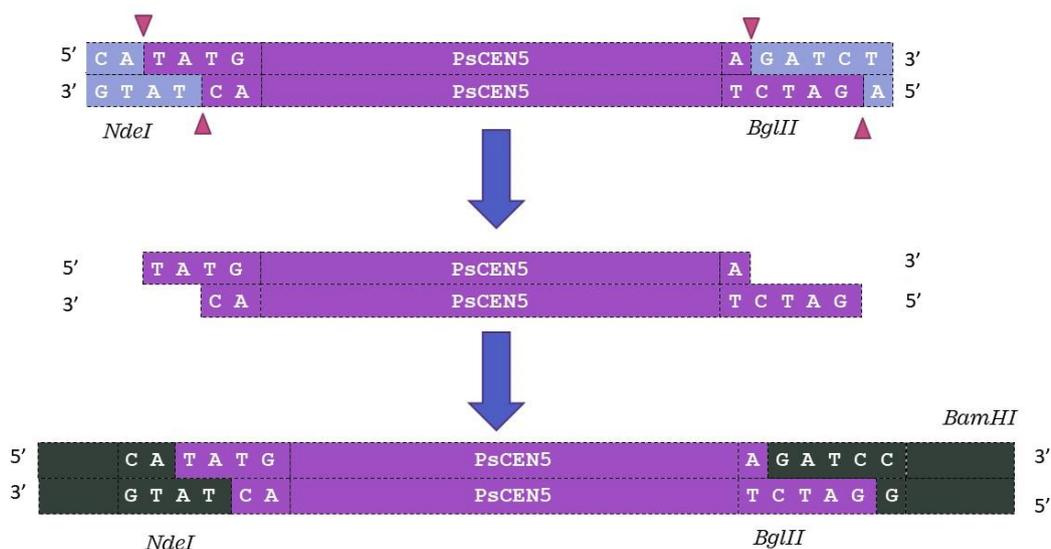
As sequências obtidas no sequenciamento foram alinhadas no programa BLAST (*Basic Local Alignment search tool*) disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

### 3.12. Expressão heteróloga da proteína centrina 5

A construção pGEM-TPsCEN5 foi digerida com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII*, com o objetivo de confirmar a inserção dos sítios. Para isso, foram realizadas duas digestões simples e uma dupla. Para a digestão foram montados três sistemas de volume igual a 15 µL contendo 1 µg de DNA plasmidial. Os sistemas foram montados conforme as orientações do fabricante e as reações foram incubadas a 37°C durante 2 h. Após a confirmação da inserção dos sítios, 5 µg de DNA correspondente à construção pGEM-TPsCEN5 foram digeridos com as

mesmas enzimas, conforme as orientações do fabricante, sendo que a reação foi incubada a 37°C durante 4 h. Os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,2% e a região do gel contendo o fragmento correspondente ao gene *PsCEN5* foi retirado com auxílio de um bisturi e luz UV no comprimento de onda de 365 nm e o DNA foi eluído do gel utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), conforme as orientações do fabricante.

O vetor pET28a(+) foi linearizado com as enzimas *NdeI* e *BamHI* para a posterior ligação ao gene *PsCEN5* digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *BglII*. A digestão com a enzima *BamHI* forma extremidades coesivas com o DNA digerido com a enzima *BglII* (Fig. 10), permitindo assim a ligação entre o vetor e o gene. Para a digestão foram utilizados 5 µg de DNA plasmidial e foi realizada conforme o descrito anteriormente e o fragmento correspondente ao vetor linearizado foi purificado a partir do gel, assim como o descrito anteriormente com o fragmento *PsCEN5*.



**Figura 10- Representação da digestão da construção pGEM-T*PsCEN5* com as enzimas *NdeI* e *BglII* e ligação no vetor pET28a(+) digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*.**

A ligação do vetor pET28a(+) com o gene *PsCEN5* foi feita na proporção 3:1 (inserto:vetor) com 100 ng de vetor pET28a(+). As células de *E. coli* DH5α, submetidas a competência, foram transformadas com 5 µL da reação de ligação. A construção resultante (pET28a(+)*PsCEN5*) foi selecionada através de PCR com os

iniciadores T7 primer (5'- CATCATATGTCAGCTCGCATTCCCAG -3') e PR692 (5'- GATAGATCTGAATAAATAAGACTCGGCTTGC-3').

Para a expressão heteróloga da proteína centrina 5, células de *E. coli* BL21(DE3) competentes foram transformadas com 10 ng da construção pET28a(+)*PsCEN5*. A partir da suspensão de células foram retirados 150 µL e estes foram espalhados em uma placa de Petri contendo 30 mL de meio LB ágar e 30 µg/mL do antibiótico Canamicina, para a seleção das células transformadas. A placa foi incubada durante a noite em estufa a 37°C.

Das colônias resultantes, uma colônia foi selecionada e transferida para um tubo contendo 3 ml de meio LB líquido com 30 µg/mL de Canamicina. O tubo foi incubado a 37°C sob agitação a 220 rpm até cultura atingir uma OD<sub>600</sub> igual a 0,6. Desta suspensão de células foi retirado um volume igual a 1,5 ml e transferido para um frasco Erlenmeyer contendo 50 ml de meio LB com 30 µg/mL de Canamicina. A OD<sub>600</sub> foi monitorada até atingir o valor igual a 0,6. Neste momento, foi retirada uma alíquota de volume igual a 1 ml e transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml (amostra não induzida). O tubo foi centrifugado a 12.000 x g durante 1 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células foi armazenado a -20°C. Além disso, uma alíquota da cultura foi retirada e congelada em glicerol 20% a -80°C.

Para a indução da expressão heteróloga da proteína foi adicionado 1 mM de IPTG na cultura do frasco Erlenmeyer. O frasco foi incubado a 37°C a 220 rpm durante 5 h, sendo que a cada 1 h foram retiradas alíquotas de 1 ml. Cada alíquota foi transferida para tubos de microcentrifuga de 1,5 ml, os quais foram centrifugados a 12.000 g durante 1 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de células armazenado a -20°C.

Com o objetivo de analisar a expressão heteróloga da proteína centrina 5 foi confeccionado um gel de poliacrilamida desnaturante na concentração igual a 12%. Para o preparo das amostras, os tubos contendo os sedimentos foram descongelados em banho de gelo e em cada um foram adicionados 100 µL de tampão de lise. Logo após, os tubos foram fervidos a 100°C durante 5 min e então, foram aplicados 20 µL do lisado celular no gel.

A expressão da proteína centrina 5 também foi testada sob diferentes condições: a 25°C durante 3 h indução a 1 mM de IPTG e a 20°C indução a 0,1 mM de IPTG durante a noite. Após os períodos de indução, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em reagente *BugBuster*<sup>™</sup> (na proporção de 5 ml de reagente para cada 1 g de células) que é próprio para a lise de células de *E. coli*. O reagente foi homogeneizado na plataforma com agitação durante 20 min à temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados e a porção solúvel (sobrenadante) foi transferida para um tubo de microcentrífuga novo. Na porção insolúvel foram adicionados 50 µL de tampão de amostra 1 x e na porção solúvel foi adicionado tampão de amostra 5 X para que a concentração final fosse igual a 1X. Os tubos foram fervidos a 100°C durante 5 min e as amostras foram aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida na concentração igual a 15%.

Para analisar a expressão da proteína fusionada ao His tag, experimento de Western blot foi realizado. Deste modo, o gel desnaturante foi transferido para a membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham) no tampão de transferência, durante 20 min no equipamento Trans-Blot<sup>®</sup> Turbo Transfer System (BioRad). Logo após, a membrana foi incubada durante 1 h em solução bloqueadora (5% de leite desnatado em tampão PBS). A membrana foi lavada em tampão PBS e então foi incubada com anticorpo Anti-His tag em solução de 1% de leite desnatado em tampão PBS durante 1 h. Depois, a membrana foi lavada sete vezes com tampão PBS, e foi incubada com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase em solução de 1% de leite desnatado em tampão PBS durante 1 h. Em seguida a membrana foi lavada sete vezes em tampão PBS e o substrato foi adicionado proveniente do kit comercial ECL Prime Western Blotting System (GE Healthcare). As imagens foram obtidas no equipamento ImageQuant<sup>™</sup> LAS 4000.

## RESULTADOS

## 1. Análise da similaridade entre as centrinas de *Phytomonas*

As sequências correspondentes às centrinas obtidas no banco de dados foram alinhadas com o objetivo de obter as taxas de similaridade e identidade entre elas (Fig. 11). Ao comparar as centrinas de *P. serpens* foi observado que a centrina 1 e centrina 2 apresentam as maiores taxas de identidade sendo igual a 40,59%. Em relação a centrina 5 a maior taxa de identidade foi observada quando comparada com a centrina 1 (28,76%). A menor identidade foi observada entre a centrina 3 e a centrina 5 (16,81%) (Tabela 9).

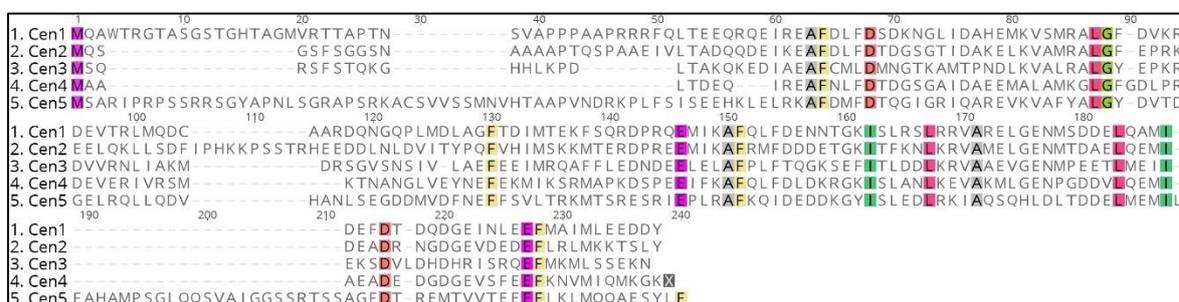


Figura 11 - Alinhamento entre as sequências das centrinas de *P. serpens* 9T no programa MUSCLE e no software MEGA 7. Os quadrados coloridos representam os aminoácidos com 100% de identidade. Os eventos de *indels* (inserção ou deleção) estão representados por "-". Cen1 (centrina 1); Cen2 (centrina 2); Cen3 (centrina 3); Cen4 (centrina 4); Cen5 (centrina 5).

Tabela 9- Taxa de identidade obtida ao comparar as sequências de aminoácidos de *P. serpens* 9T.

	Centrina 1	Centrina 2	Centrina 3	Centrina 4	Centrina 5
Centrina 1	-	40,59%	28,65%	36,79%	28,76%
Centrina 2	40,59%	-	29,03%	35,83%	25,42%
Centrina 3	28,65%	29,03%	-	29,76%	16,81%
Centrina 4	36,79%	35,83%	29,76%	-	22,03%
Centrina 5	28,76%	25,42%	16,81%	22,03%	-

As taxas de similaridade entre as sequências também foram calculadas (Tabela 10), sendo que as maiores taxas de similaridade foram entre as centrinas 1 e 2 (61,39%), e as menores taxas entre a centrina 3 e 5 (35,40%).

Tabela 10 – Taxa de similaridade entre as sequências de aminoácidos de *P. serpens* 9T.

	Centrina 1	Centrina 2	Centrina 3	Centrina 4	Centrina 5
Centrina 1	-	61,39%	47,92%	51,81%	46,90%
Centrina 2	61,39%	-	51,08%	52,94%	43,22%
Centrina 3	47,92%	51,08%	-	51,19%	35,40%
Centrina 4	51,81%	52,94%	51,19%	-	39,47%
Centrina 5	46,90%	43,22%	35,40%	39,47%	-

Os motivos *EF-hands* e os domínios de ligação ao cálcio de cada sequência de aminoácidos foram avaliados no banco de dados PROSITE. A partir dos dados obtidos, foram montados gráficos com os domínios no programa SnapGene® Viewer (**Fig.12**). As centrinas 1, 2, 3 e 5 apresentaram três domínios *EF-Hands* e a centrina 4 é a única entre elas que apresentou quatro motivos *EF-Hands*, com três domínios de ligação ao cálcio. A centrina 5 não apresentou nenhum domínio de ligação ao cálcio. As massas moleculares das centrinas também foram calculadas sendo iguais a: ~21,9 kDa (centrina 1), ~21 kDa(centrina 2), ~19 kDa(centrina 3), ~16,8 kDa(centrina 4), ~25,7 kDa (centrina 5).

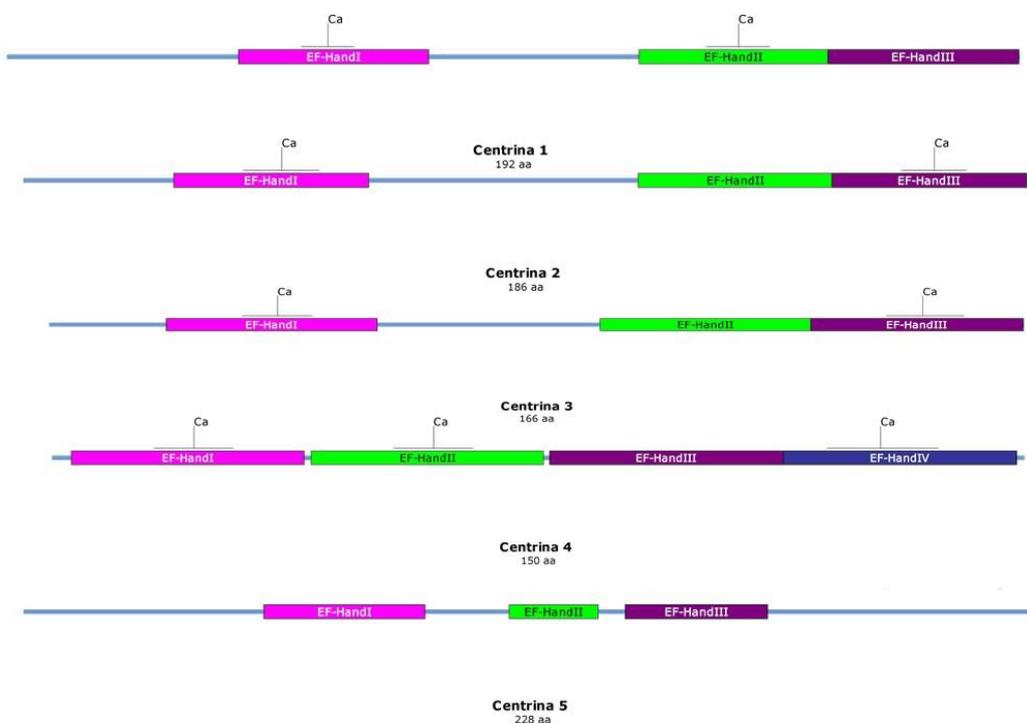
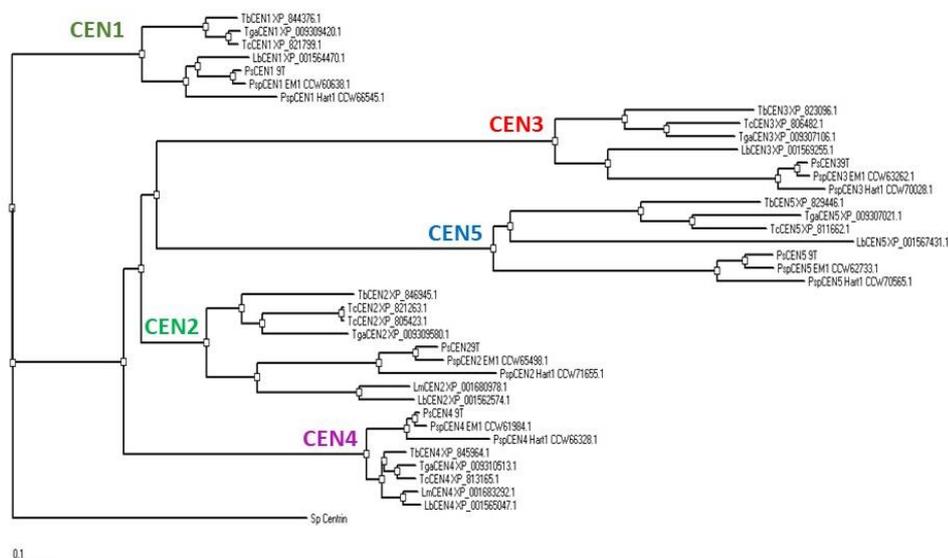


Figura 12 - Representação dos domínios *EF-Hands* de cada centrina de *P. serpens* 9T, obtidos no banco de dados PROSITE. Imagem criada no programa SnapGene® Viewer.

## 2. Árvore filogenética

As sequências obtidas das centrinas de *P. serpens* 9T, dos isolados de *Phytomonas* spp. (HART1 e EM1) e dos outros tripanossomatídeos nos bancos de dados foram alinhadas e a árvore filogenética foi construída com base na

similaridade entre elas (**Fig. 13**). As centrinas foram agrupadas em cinco grupos diferentes correspondentes às cinco diferentes centrinas dos tripanossomatídeos.



**Figura 13 - Cladograma das centrinas dos tripanossomatídeos.** Tb: *Trypanosoma brucei*, Tga: *Trypanosoma grayi*, Tc: *Trypanosoma cruzi*, Sp: *Schizosaccharomyces pombe*, Lb: *Leishmania braziliensis*; Ps: *Phytomonas serpens*, Lm: *Leishmania major*, Psp EM1: *Phytomonas sp. EM1* e Psp HART1: *Phytomonas sp. HART1*.

### 3. Estrutural tridimensional das centrinas

As estruturas das cinco centrinas de *P. serpens* foram preditas por homologia no servidor SWISS MODEL. As sequências de aminoácidos de cada centrina foram submetidas e analisadas, onde foram encontrados possíveis modelos para estas proteínas. Destes foram selecionados modelos com base na taxa de identidade e no valor de GMQE. Os modelos escolhidos para cada proteína estão descritos na **Tabela 11**.

**Tabela 11 - Modelos selecionados para a modelagem por homologia das proteínas centrinas de *P. serpens*.**

Modelos	Número de Acesso (SMTL*)	Identidade	GMQE*	Referência	Proteína alvo
<b>Centrin 1 <i>Mus musculus</i></b>	5d43.1	50,34	0,66	Kim, S.Y. et al., Crystal Structure of Wild-Type Centrin 1 from <i>Mus musculus</i> Occupied by Ca2. <i>Biochemistry Mosc.</i> (2017)	Centrina 1
<b><i>Chlamydomonas reinhardtii</i> centrin</b>	3qrx.1	67,33	0,71	Sosa Ldel, V. et al., The structure, molecular dynamics, and energetics of centrin-melittin complex. <i>Proteins</i> (2011)	Centrina 2

<i>Human centrin 2</i>	2ggm.1	38,36	0,67	Thompson, J.R. et al., The structure of the human centrin 2-xeroderma pigmentosum group C protein complex. J.Biol.Chem. (2006)	Centrina 3
<i>Trypanosoma brucei centrin 4</i>	5zor.1	89,26	0,97	Shan, F.Z. et al., Solution structure of TbCentrin4 from <i>Trypanosoma brucei</i> and its interactions with Ca <sup>2+</sup> and other centrins. Biochem. J. (2018)	Centrina 4
<i>Chlamydomonas reinhardtii centrin</i>	3qrx.1	42,96	0,58	Sosa Ldel, V. et al., The structure, molecular dynamics, and energetics of centrin-melittin complex. Proteins (2011)	Centrina 5

Após a seleção dos moldes, as estruturas tridimensionais de cada centrina foram preditas. Para a validação da qualidade estereoquímica do modelo, foi utilizado o programa PROCHECK. Neste programa, é gerado um mapa de Ramachandran, o qual descreve as posições mais favoráveis e desfavoráveis dos ângulos  $\psi$  (psi) e  $\phi$  (phi) que ocorrem em torno do C $\alpha$  (**Fig. 14**).

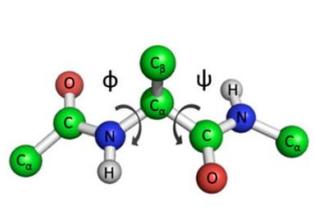
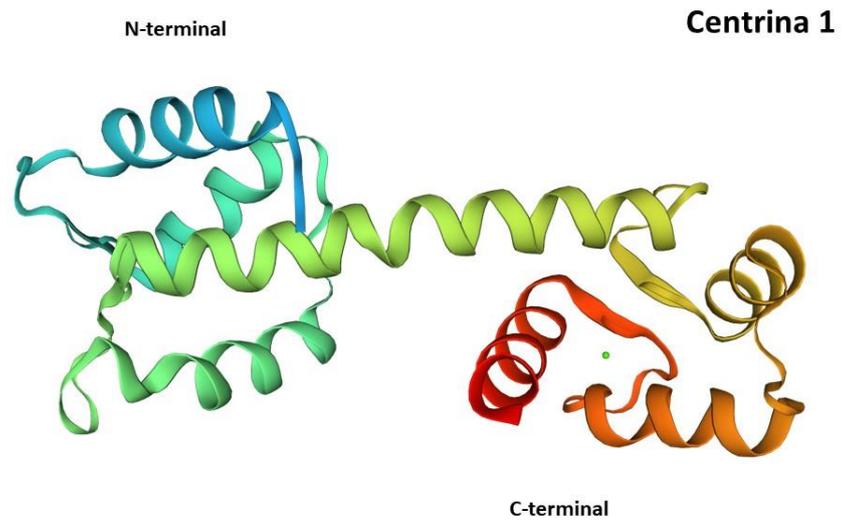


Figura 14 – Representação dos ângulos  $\phi$  e  $\psi$  em torno do C $\alpha$ .

A estrutura tridimensional da centrina 1 apresentou um total de sete  $\alpha$ -hélices com um domínio de ligação ao cálcio na região C-terminal (**Fig. 15**). O mapa de Ramachandran exibiu 95 % dos resíduos nas regiões favoráveis (região vermelha), 4,3% dos resíduos nas regiões permitidas (região amarela) e 1,1% em regiões desfavoráveis (**Fig. 16**).



**Figura 15 - Modelo tridimensional da proteína centrina 1.** Os íons de cálcio são representados pelas esferas verdes.

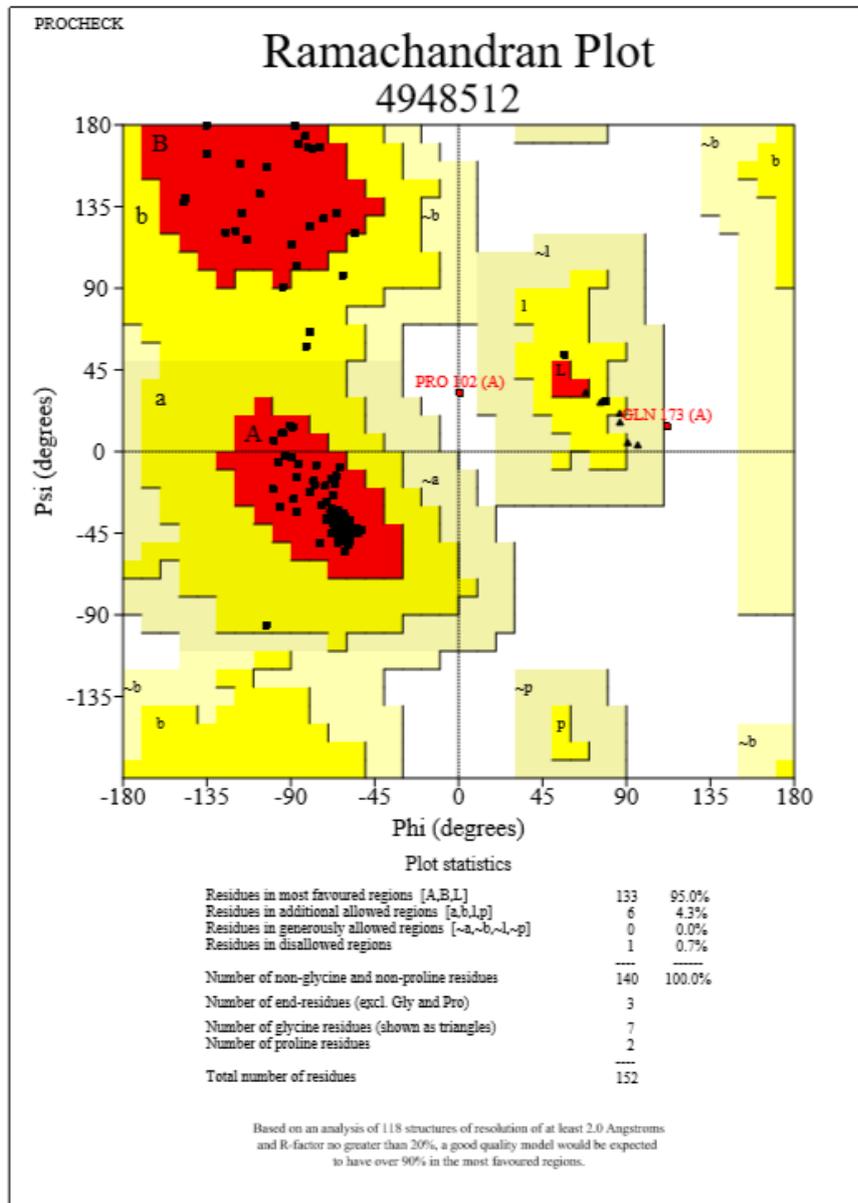
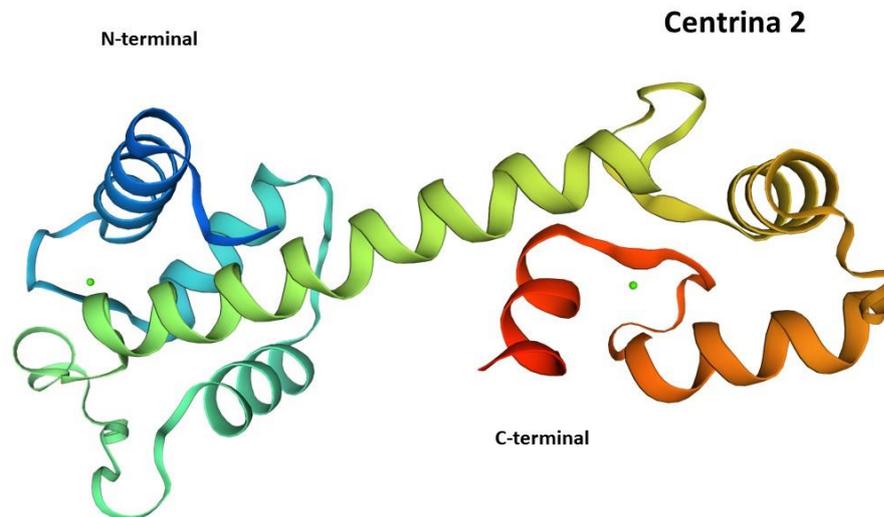
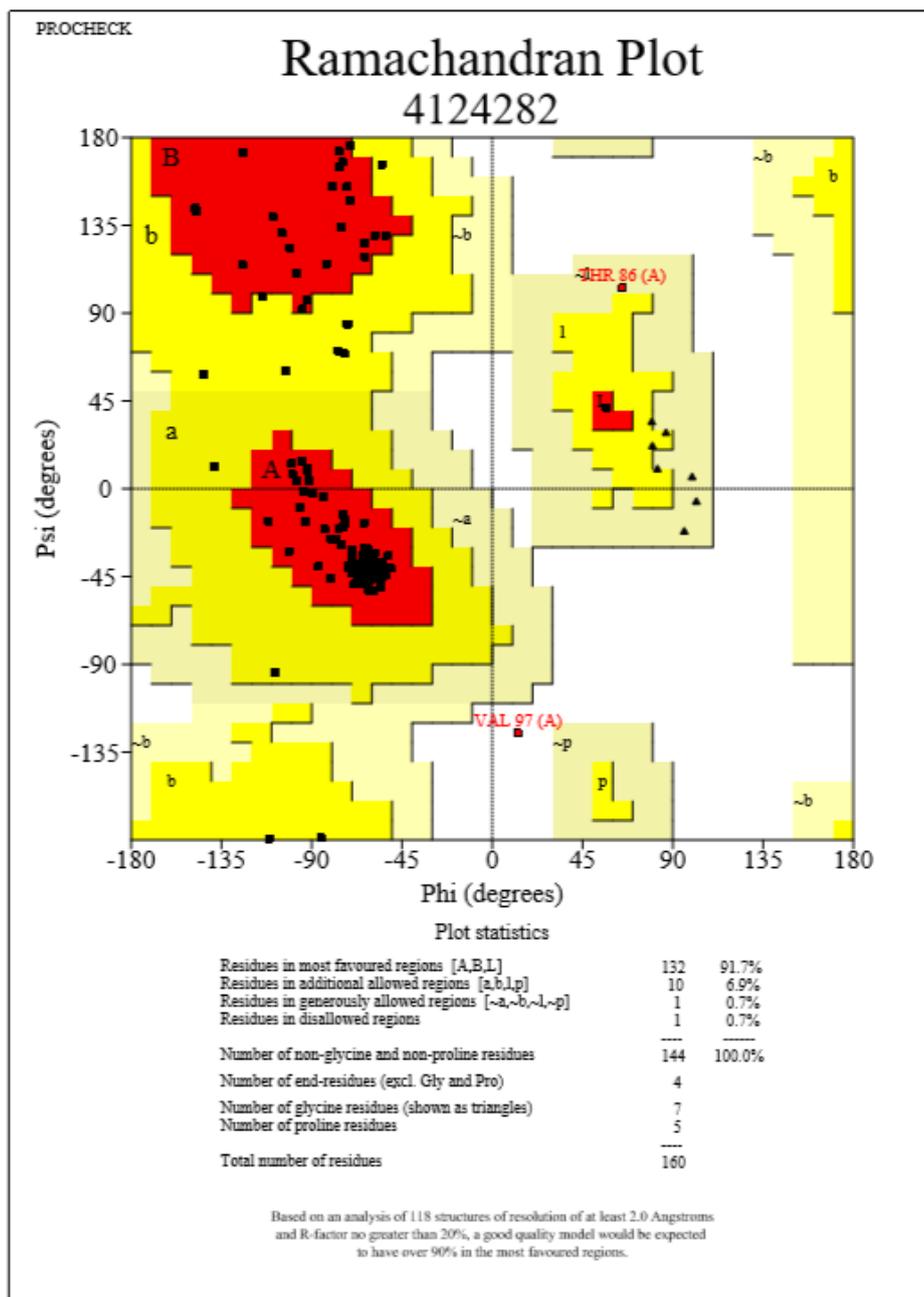


Figura 16 - Mapa de Ramachandran do modelo tridimensional da centrina 1.

O modelo da centrina 2 também apresentou sete  $\alpha$ -hélices, porém com domínios de ligação ao cálcio, um em cada região (região N-terminal e C-terminal) (**Fig. 17**). O mapa de Ramachandran mostrou 91,7 % dos resíduos nas regiões favoráveis (região vermelha), 6,9% dos resíduos nas regiões permitidas (região amarela), 0,7% em regiões generosamente permitidas (região creme) e 0,7% em regiões desfavoráveis (região branca) (**Fig. 18**).



**Figura 17 - Modelo tridimensional da centrina 2.** Os íons de cálcio são representados pelas esferas verdes.



**Figura 18 - Mapa de Ramachandran da centrina 2.**

Já o modelo tridimensional da proteína centrina 3 também apresentou sete  $\alpha$ -hélices, mas com nenhum sítio de ligação ao cálcio (**Fig. 19**). Através dos resultados obtidos no mapa de Ramachandran foram observados que 88,3% dos resíduos encontravam-se em regiões mais favoráveis (região vermelha), 9,5% dos resíduos nas regiões adicionalmente permitidas (região amarela) e 2,2% dos resíduos em regiões generosamente permitidas (região creme) (**Fig. 20**).

### Centrina 3

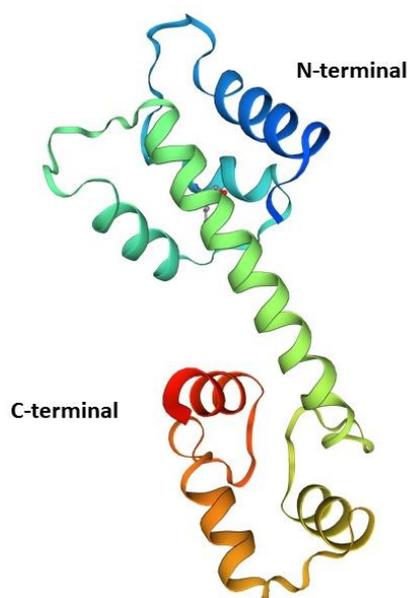
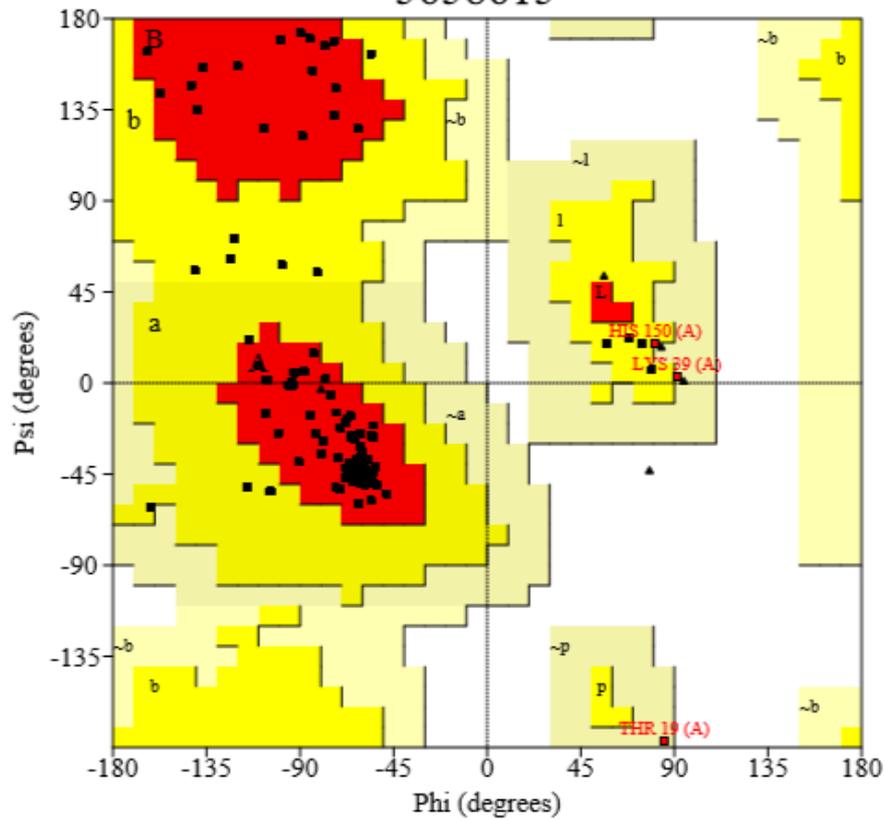


Figura 19 - Modelo tridimensional da centrina 3.

PROCHECK

## Ramachandran Plot 5658615



### Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	121	88.3%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	13	9.5%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	3	2.2%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
<hr/>		
Number of non-glycine and non-proline residues	137	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	5	
Number of proline residues	4	
<hr/>		
Total number of residues	148	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.

Figura 20 - Mapa de Ramachandran da centrina 3.

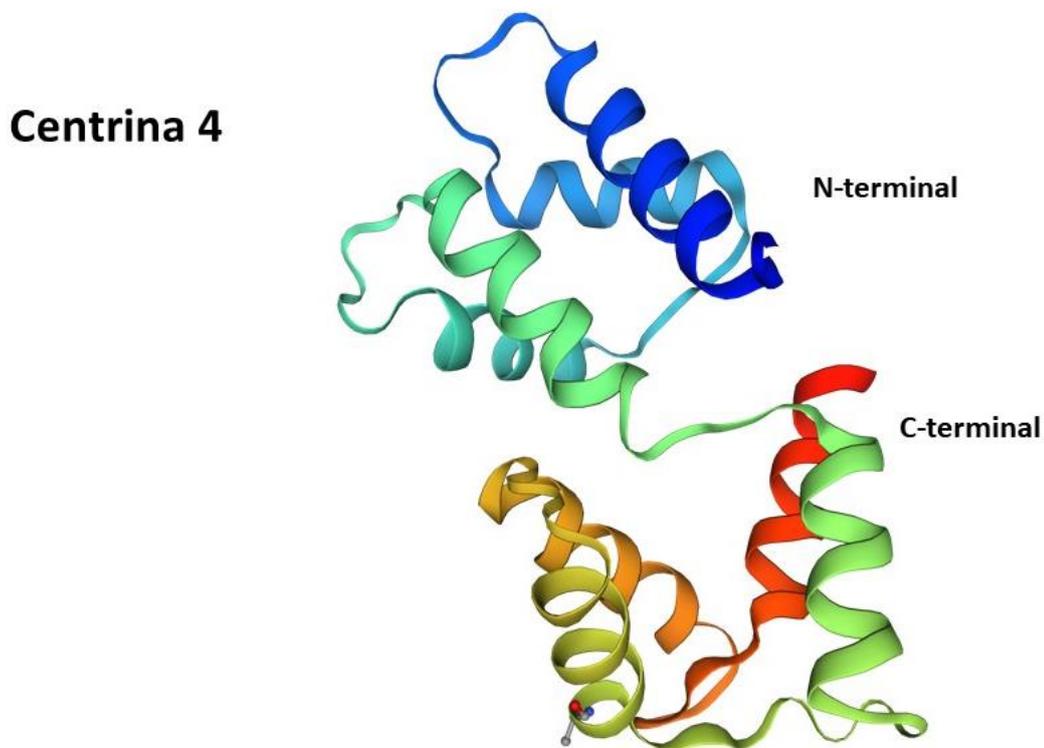


Figura 21- Modelo tridimensional da centrina 4.

O modelo predito da centrina 4 apresentou estrutura diferente das outras centrinas preditas, com um total de oito de  $\alpha$ -hélices e nenhum domínio de ligação ao cálcio (**Fig. 21**). A análise estereoquímica do modelo apresentou 96,2% de resíduos nas posições favoráveis (região vermelha) e 3,8% dos resíduos em regiões adicionalmente permitidas (**Fig. 22**).

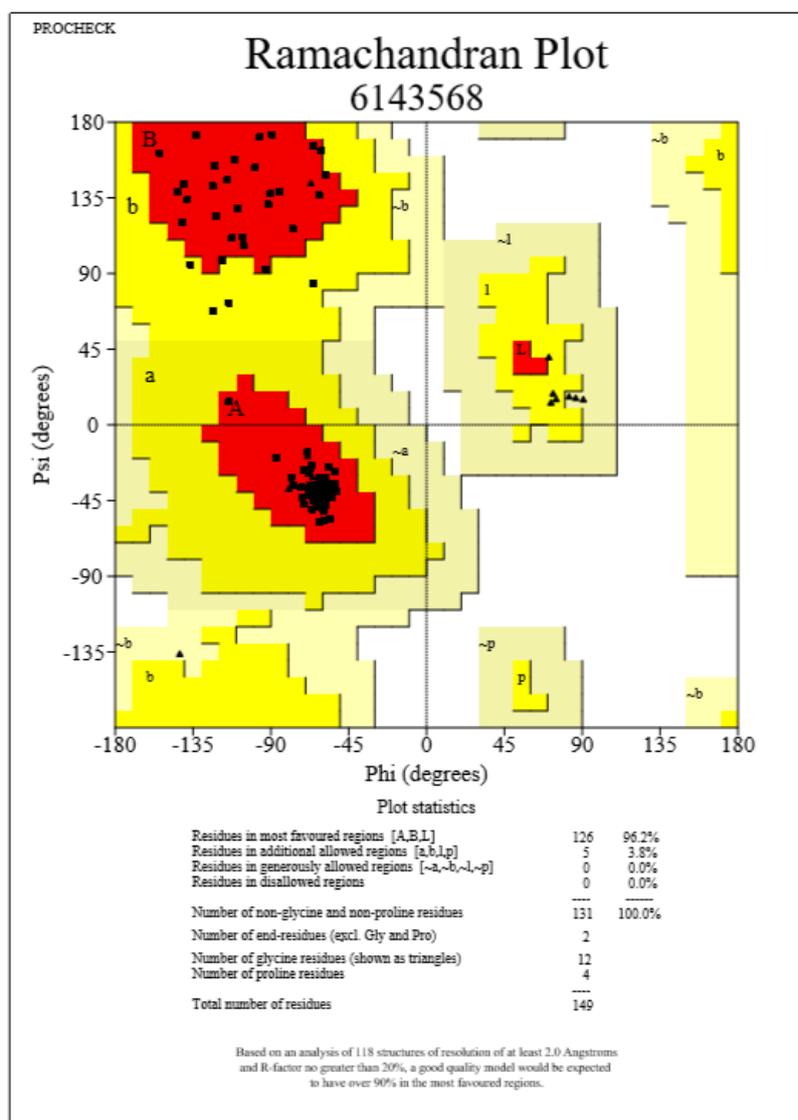


Figura 22 - Mapa de Ramachandran centrina 4.

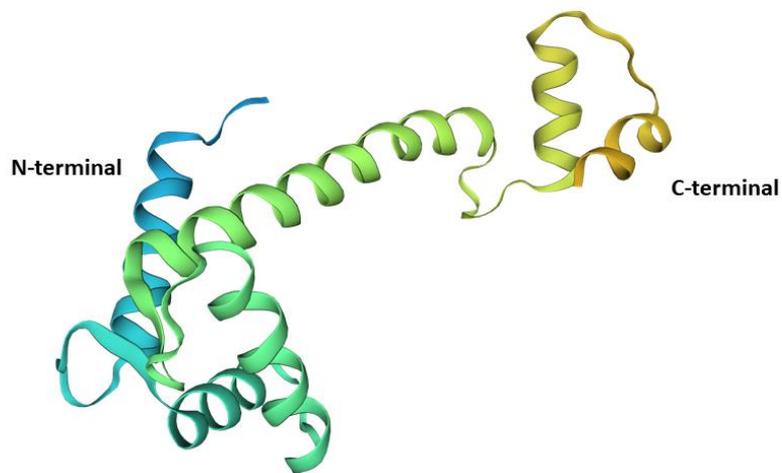


Figura 23 - Modelo tridimensional da centrina 5 de *Phytomonas serpens* 9T.

O modelo estrutural da centrina 5 exibiu seis  $\alpha$ -hélices, com três  $\alpha$ -hélices na região N-terminal e duas  $\alpha$ -hélices na região C-terminal, com nenhum domínio de ligação ao cálcio (**Fig. 23**). As análises no mapa de Ramachandran mostraram que 94,9% de resíduos em regiões favoráveis (região vermelha) e 5,1% de resíduos em regiões adicionalmente permitidas (**Fig. 24**).

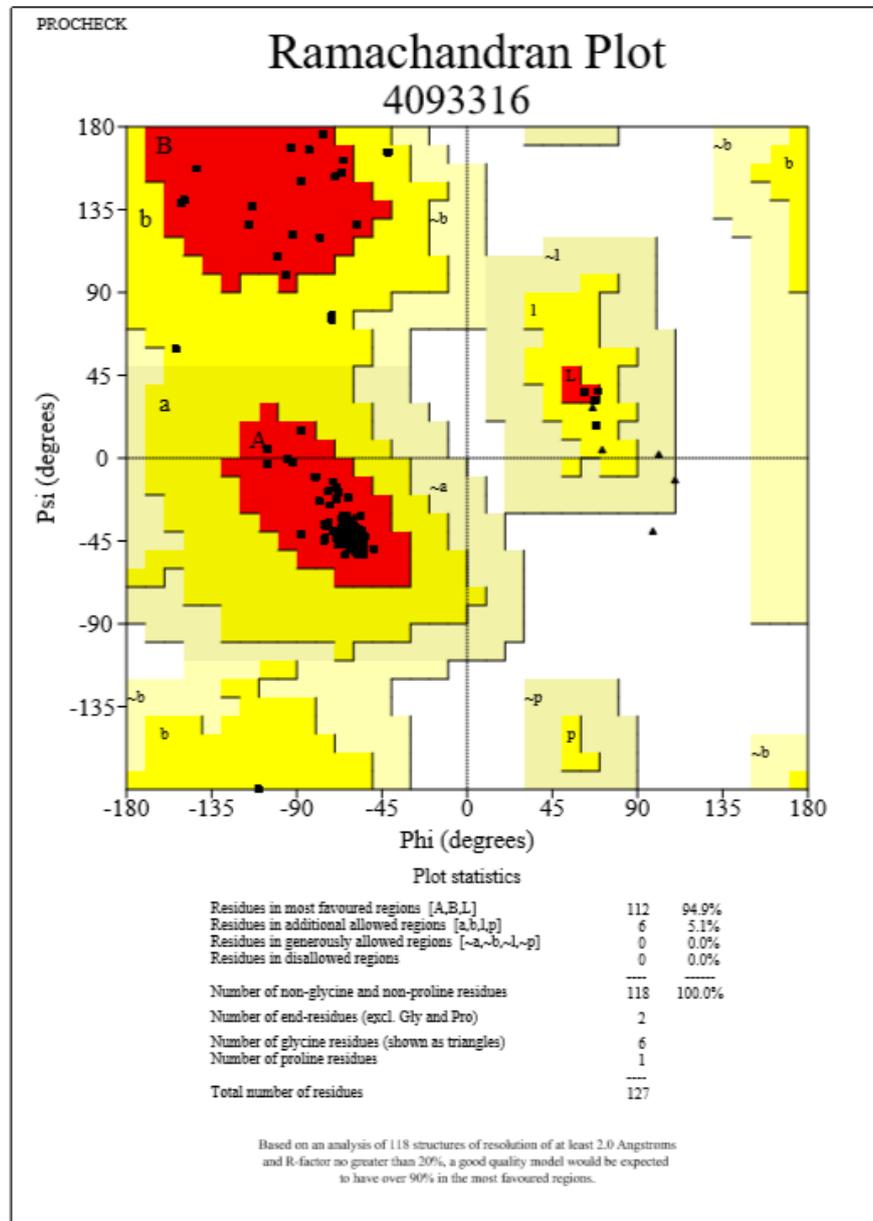


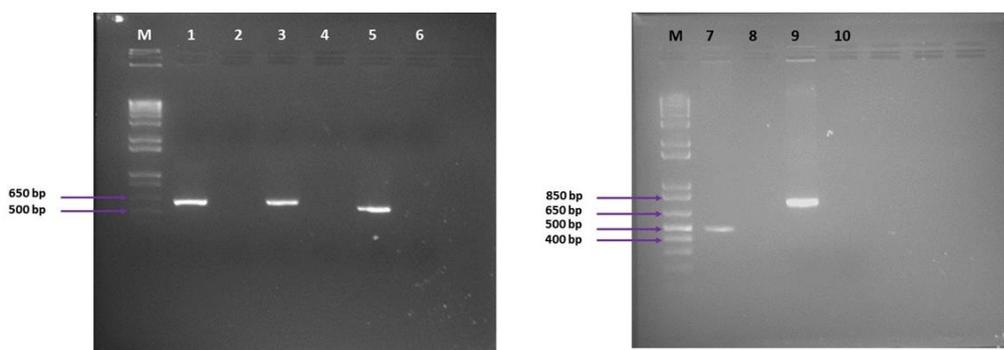
Figura 24 - Mapa de Ramachandran da proteína centrina 5.

#### 4. Amplificação e clonagem dos genes *PsCEN1*, *PsCEN2*, *PsCEN3*, *PsCEN4* e *PsCEN5* por PCR

Os genes correspondentes às centrinas 1 a 5 de *P. serpens* foram amplificados por PCR a partir do DNA cromossomal através da utilização dos iniciadores específicos. Os produtos resultantes foram separados em gel de agarose mostrado na **Fig. 25**. Os poços 1, 3, 5, 7 e 9 correspondem aos genes *PsCEN1*, *PsCEN2*, *PsCEN3*, *PsCEN4* e *PsCEN5*, respectivamente. Os tamanhos obtidos pela amplificação apresentam tamanhos compatíveis aos correspondentes a cada gene (**Tabela 12**).

**Tabela 12 - Tamanhos dos genes correspondentes às centrinas de 1 a 5 de *P. serpens* 9T.**

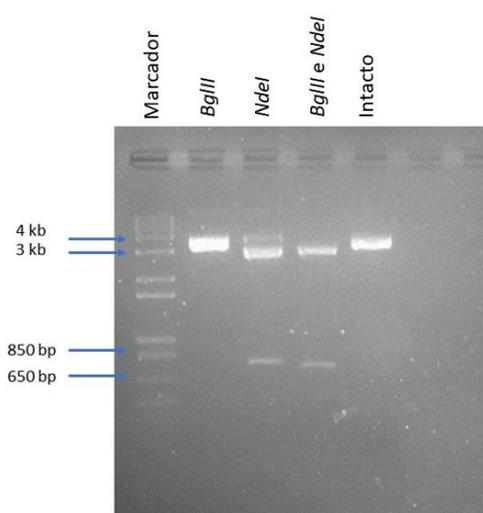
Genes	Tamanho (bp)
<i>PsCEN1</i>	579
<i>PsCEN2</i>	569
<i>PsCEN3</i>	507
<i>PsCEN4</i>	456
<i>PsCEN5</i>	687



**Figura 25- Amplificação dos genes *PsCEN1*, *PsCEN2*, *PsCEN3*, *PsCEN4* e *PsCEN5* por PCR.** Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio.. M. Marcador 1 kb plus ladder; 1. *PsCEN1*; 2. *PsCEN1* - Controle negativo (PCR sem DNA cromossomal). 3. *PsCEN2*; 4. *PsCEN2* – Controle Negativo (PCR sem DNA cromossomal); 5. *PsCEN3*; 6. *PsCEN3* – Controle Negativo (PCR sem DNA cromossomal); 7. *PsCEN4*; 8. *PsCEN4* – Controle negativo (PCR sem DNA cromossomal); 9. *PsCEN5*; 10. *PsCEN5* – Controle Negativo (PCR sem DNA cromossomal).

Os genes correspondentes às centrinas 1 a 5 de foram ligados no vetor pGEM<sup>®</sup>-T Easy. Após a ligação e transformação do DNA recombinante, a construção pGEM-TPsCEN5 foi selecionada e digerida com as enzimas de restrição *NdeI* e

*BglIII* com o objetivo de conferir se os sítios para estas enzimas foram inseridos corretamente na construção gênica (sítio para *NdeI* na região 5' e sítio para *BglIII* na região 3' do gene). Na **Fig. 26** encontram-se as análises eletroforéticas das digestões simples e duplas da construção pGEM-TPsCEN5. Nos poços *NdeI* e *BglIII* são observados fragmentos de tamanhos próximos a 687 bp, tamanho correspondente ao gene *PsCEN5*. No poço *NdeI*, o fragmento liberado possui tamanho maior que o gene *PsCEN5*, e isto é devido ao fato de que o vetor pGEM®-T Easy apresenta na região de sítios múltiplos de clonagem um sítio para a enzima *NdeI*. A construção digerida com as duas enzimas possui tamanho próximo ao tamanho do gene (687 bp) (**Fig. 25**).



**Figura 26 – Análise da inserção dos sítios para as enzimas *NdeI* e *BglIII*.** Gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio. Marcador. Marcador 1 kb plus. *BglIII*. pGEM-TPsCEN5 digerido com a enzima *BglIII*. *NdeI*. pGEM-TPsCEN5 digerido com a enzima *NdeI*. *BglIII* e *NdeI*. pGEM-TPsCEN5 digerido com as enzimas *BglIII* e *NdeI*. Intacto. pGEM-TPsCEN5 intacto.

A ligação do gene *PsCEN5* ao vetor pGEM®-T Easy foi confirmada através de PCR, com a utilização de iniciadores específicos e por sequenciamento. A sequência obtida através do sequenciamento foi alinhada com a sequência obtida no banco de dados no programa BLAST (**Fig. 27 e 28**).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1256 bits(680)	0.0	685/687(99%)	1/687(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGTCAGCTCGCATTCCCAGGCCATCTTCTAGAAGGAGTGGGTATGCACCCAACCTAAGC	60		
Sbjct 1	ATGTCAGCTCGCATTCCCAGGCCATCTTCTAGAAGGAGTGGGTATGCACCCAACCTAAGC	60		
Query 61	GGTCGGGCTCCATCTAGAAAAGCCTGCTCTGTTGTTTCATCAATGAATGTACATACCGCC	120		
Sbjct 61	GGTCGGGCTCCATCTAGAAAAGCCTGCTCTGTTGTTTCATCAATGAATGTACATACCGCC	120		
Query 121	GCTCCAGTGAATGATAGAAAAGCCTCTTTAGTATATCGGAAGAACATAAGCTCGAGCTG	180		
Sbjct 121	GCTCCAGTGAATGATAGAAAAGCCTCTTTAGTATATCGGAAGAACATAAGCTCGAGCTG	180		
Query 181	AGGAAAGCTTTCGACATGTTTGATACACAAGGGATAGGCCGAATTCAGGCACGCGAAGTC	240		
Sbjct 181	AGGAAAGCTTTCGACATGTTTGATACACAAGGGATAGGCCGAATTCAGGCACGCGAAGTC	240		
Query 241	AAAGTCGCCTTTTATGCCCTCGGCTATGATGTTACAGATGGGAGTTGCGGCAACTTTTG	300		
Sbjct 241	AAAGTCGCCTTTTATGCCCTCGGCTATGATGTTACAGATGGGAGTTGCGGCAACTTTTG	300		
Query 301	CAGGACGTTTCATGCAAAATCTCTCAGAGGGTGACGACATGGCGGACTTCAATGAATCTTT	360		
Sbjct 301	CAGGACGTTTCATGCAAAATCTCTCAGAGGGTGACGACATGGCGGACTTCAATGAATCTTT	360		
Query 361	AGCGTCCTGACTCGAAAAATGACTTCACGAGAATCGAGGATTGAACCTCTGCGTGCAATT	420		
Sbjct 361	AGCGTCCTGACTCGAAAAATGACTTCACGAGAATCGAGGATTGAACCTCTGCGTGCAATT	420		
Query 421	AAGCAAATCGATGAGGATGACAAGGGGTATATTTCTGTTGGAGGACTTGCGAAAAATCGCA	480		
Sbjct 421	AAGCAAATCGATGAGGATGACAAGGGGTATATTTCTGTTGGAGGACTTGCGAAAAATCGCA	480		
Query 481	CAATCACAGCATCTAGACCTCACGGACGATGAGCTCATGGAATGATCTTTTTGCACAT	540		
Sbjct 481	CAATCACAGCATCTAGACCTCACGGACGATGAGCTCATGGAATGATCTTTTTGCACAT	540		
Query 541	GCTATGCCTTCTGGGTTGCAGCAATCCGTAGCCATCGGTGGTAGCAGTCGCACGAGCTCC	600		
Sbjct 541	GCTATGCCTTCTGGGTTGCAGCAATCCGTAGCCATCGGTGGTAGCAGTCGCACGAGCTCC	600		
Query 601	GCTGGGGTTTGATACAAGAGAGATGACTGTTGTACAGAAGAGGAGTTCTTAAAGTTGAT	660		
Sbjct 601	GCTGGGGTTTGATACAAGAGAGATGACTGTTGTACAGAAGAGGAGTTCTTAAAGTTGAT	659		
Query 661	GCAGCAAGCCGAGTCTTATTATTCTA	687		
Sbjct 660	GCAGCAAGCCGAGTCTTATTATTCTA	686		

**Figura 27 – Alinhamento da sequência senso obtida com o sequenciamento do gene *PsCEN5* clonado no vetor pGEM-T Easy (subject) com a sequência do gene *PsCEN5* obtido nos bancos de dados.**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1264 bits(684)	0.0	686/687(99%)	0/687(0%)	Plus/Minus
Query 8	ATGTCAGCTCGCATTCCCAGGCCATCTTCTAGAAGGAGTGGGTATGCACCCAACCTAAGC	67		
Sbjct 687	ATGTCAGCTCGCATTCCCAGGCCATCTTCTAGAAGGAGTGGGTATGCACCCAACCTAAGC	628		
Query 68	GGTCGGGCTCCATCTAGAAAAGCCTGCTCTGTTGTTTCATCAATGAATGTACATACCGCC	127		
Sbjct 627	GGTCGGGCTCCATCTAGAAAAGCCTGCTCTGTTGTTTCATCAATGAATGTACATACCGCC	568		
Query 128	GCTCCAGTGAATGATAGAAAAGCCACTCTTTAGTATATCGGAAGAACATAAGCTCGAGCTG	187		
Sbjct 567	GCTCCAGTGAATGATAGAAAAGCCACTCTTTAGTATATCGGAAGAACATAAGCTCGAGCTG	508		
Query 188	AGGAAAGCTTTTCGACATGTTTGATACACAAGGGATAGGCCGAATTCAGGCACGCGAAGTC	247		
Sbjct 507	AGGAAAGCTTTTCGACATGTTTGATACACAAGGGATAGGCCGAATTCAGGCACGCGAAGTC	448		
Query 248	AAAGTCGCCCTTTTATGCCCTCGGCTATGATGTTACAGATGGGGAGTTGCGGCAACTTTTG	307		
Sbjct 447	AAAGTCGCCCTTTTATGCCCTCGGCTATGATGTTACAGATGGGGAGTTGCGGCAACTTTTG	388		
Query 308	CAGGACGTTTCATGCAAACTCTCTCAGAGGGTGACGACATGGCGGACTTCAATGAATCTTT	367		
Sbjct 387	CAGGACGTTTCATGCAAACTCTCTCAGAGGGTGACGACATGGCGGACTTCAATGAATCTTT	328		
Query 368	AGCGTCCCTGACTCGAAAAATGACTTCACGAGAATCGAGGATTGAACTCTGCGTGCAATTT	427		
Sbjct 327	AGCGTCCCTGACTCGAAAAATGACTTCACGAGAATCGAGGATTGAACTCTGCGTGCAATTT	268		
Query 428	AAGCAAATCGATGAGGATGACAAGGGGTATATTTTCGTTGGAGGACTTGCGAAAAATCGCA	487		
Sbjct 267	AAGCAAATCGATGAGGATGACAAGGGGTATATTTTCGTTGGAGGACTTGCGAAAAATCGCA	208		
Query 488	CAATCACAGCATCTAGACCTCACGGACGATGAGCTCATGGAATGATTCTTTTTCACAT	547		
Sbjct 207	CAATCACAGCATCTAGACCTCACGGACGATGAGCTCATGGAATGATTCTTTTTCACAT	148		
Query 548	GCTATGCCCTTCTGGGTTGCAGCAATCCGTAGCCATCGGTGGTAGCAGTCGCACGAGCTCC	607		
Sbjct 147	GCTATGCCCTTCTGGGTTGCAGCAATCCGTAGCCATCGGTGGTAGCAGTCGCACGAGCTCC	88		
Query 608	GCTGGGTTTGATACAAGAGAGATGACTGTTGTACAGAAGAGGAGTTCTTAAAGTTGATG	667		
Sbjct 87	GCTGGGTTTGATACAAGAGAGATGACTGTTGTACAGAAGAGGAGTTCTTAAAGTTGATG	28		
Query 668	CAGCAAGCCGAGTCTTATTTATTCTAG 694			
Sbjct 27	CAGCAAGCCGAGTCTTATTTATTCTAG 1			

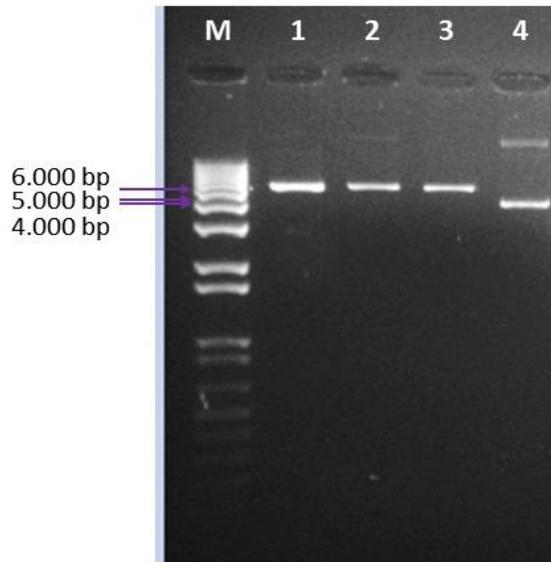
**Figura 28-** Alinhamento da sequência antisense obtida com o sequenciamento do gene *PsCEN5* clonado no vetor pGEM-T Easy (query) com a sequência do gene *PsCEN5* obtido nos bancos de dados (subject).

#### 4. Expressão heteróloga da proteína centrina 5 de *P. serpens*

Para a expressão da proteína heteróloga em *E. coli* linhagem BL21(DE3) foi utilizado o vetor pET28a(+). O pET28a(+) é um vetor de expressão em *E. coli*, que possui um tamanho de 5.369 pb e apresenta em sua estrutura o promotor para a T7 RNA polimerase, que é reconhecido somente pela enzima T7 RNA polimerase. O gene que codifica esta enzima está presente no genoma da bactéria *E. coli* linhagem BL21(DE3).

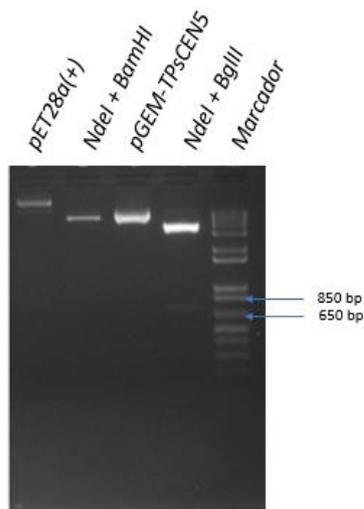
Para análise da digestão do vetor com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, foi feita uma reação de digestão com estas enzimas. Os fragmentos resultantes foram separados em gel de agarose 1% por eletroforese. Na **Figura 28** é possível observar os fragmentos 1, 2 e 3 provenientes das digestões simples (fragmentos 1

e 2) e da digestão dupla (fragmento 3). A partir dos fragmentos resultantes é possível observar que houve a linearização do vetor pET28a(+) com as enzimas de restrição.



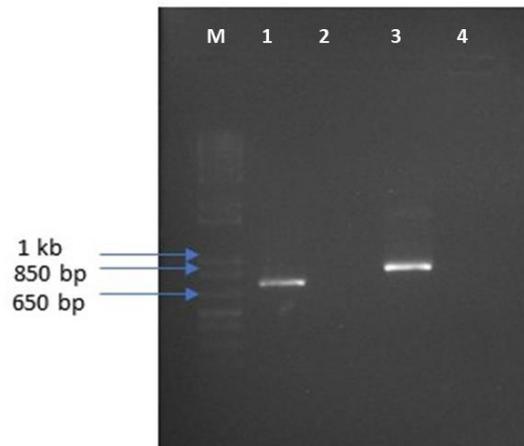
**Figura 29 - Digestão do vetor pET28a(+) com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. M. Marcador 1 kb plus ladder; 1. Digestão do vetor pET28a(+) com a enzima de restrição *NdeI*; 2. Digestão do vetor pET28a(+) com a enzima *BamHI*; 3. Digestão do vetor pET28a(+) com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. 4. Vetor pET28a(+) intacto.

Com os resultados obtidos da digestão analítica do vetor pET28a(+), foi realizada digestão do vetor pET28a(+) com uma quantidade maior de DNA plasmidial e o mesmo foi realizado com a construção pGEMPsCEN5, para posterior separação dos fragmentos em gel de agarose e purificação dos fragmentos. O produto resultante da digestão foi analisado em gel de agarose na concentração de 1,2%, que pode ser visualizado na **Figura 30**. A digestão do pET28a(+) com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* possibilitou a linearização do vetor, já a construção pGEMTPsCEN5 digerida com as enzimas *NdeI* e *BglII* apresentou um fragmento com tamanho próximo a 687 bp (fragmento 4) , demonstrando que houve a digestão do fragmento (**Fig. 30**).



**Figura 30 - Digestão do vetor pET28a(+)** e da construção pGEM-TPsCEN5 com as enzimas de restrição **NdeI** e **BglIII**. Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. **pET28a(+)**. Vetor pET28a(+) intacto; **NdeI + BamHI**. Vetor pET28a(+) digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*; **pGEM-TPsCEN5**. Construção pGEM-TPsCEN5 intacta; **NdeI + BglIII**. Construção pGEM-TPsCEN5 digerida com as enzimas *NdeI* e *BglIII*. **Marcador**. Marcador 1 kb plus ladder

O vetor pET28a(+) linearizado com as enzimas de restrição e o gene *PsCEN5* foram ligados para a subclonagem desta sequência nesse plasmídeo. A confirmação da ligação foi feita através de PCR com os iniciadores específicos e os produtos resultantes foram separados em gel de agarose (**Fig. 31**). O gene *PsCEN5* foi amplificado através do uso dos iniciadores PR610 e PR692 (poço 3) e o fragmento resultante possui tamanho igual 687 bp, conforme o observado no gel (poço 1) e também foi feita a amplificação com o T7 primer (específico para o vetor pET28a(+)) e PR692. O produto resultante apresenta tamanho próximo a 835 bp, conforme o observado no poço 5.



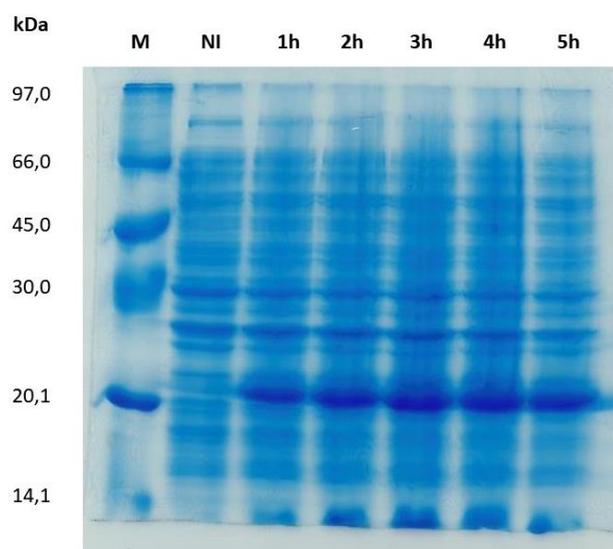
**Figura 31 – Análise da subclonagem do gene *PsCEN5* no vetor pET28a(+) com a amplificação do gene *PsCEN5* por PCR.** Gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. M. Marcador 1 kb plus ladder. 1. *PsCEN5* (amplificado com iniciadores PR610 e PR692); 2. Controle negativo (sem DNA cromossomal). PCR para a confirmação da ligação do vetor pET28a(+) com o gene *PsCEN5*; 3. *PsCEN5* (amplificado com os iniciadores T7 primer e PR692). 4. Controle negativo (PCR sem o DNA plasmidial).

A subclonagem do gene *PsCEN5* no vetor pET28a(+) também foi confirmada através da reação de sequenciamento. A sequência obtida foi alinhada com a sequência obtida no banco de dados no programa BLAST (**Fig. 32**)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1173 bits(635)	0.0	642/645(99%)	1/645(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTCCTCTTCTGTGA	-AACAGTCATCTCTCTTGTATCAAACCCAGCAGAGCTCGTGCGACT	59	
Sbjct 645	CTCCTCTTCTGTGACAACAGTCATCTCTCTTGTATCAAACCCAGCGGAGCTCGTGCGACT	586		
Query 60	GCTACCACCGATGGCTACGGATTGCTGCAACCCAGAAGGCATAGCATGTGCAAAAAGAAT	119		
Sbjct 585	GCTACCACCGATGGCTACGGATTGCTGCAACCCAGAAGGCATAGCATGTGCAAAAAGAAT	526		
Query 120	CATTTCCATGAGCTCATCGTCCGTGAGGTCTAGATGCTGTGATTGTGCGATTTTCGCAA	179		
Sbjct 525	CATTTCCATGAGCTCATCGTCCGTGAGGTCTAGATGCTGTGATTGTGCGATTTTCGCAA	466		
Query 180	GTCCTCCAACGAAATATACCCCTTGTGTCATCCTCATCGATTTGCTTAAATGCACGCAGAGG	239		
Sbjct 465	GTCCTCCAACGAAATATACCCCTTGTGTCATCCTCATCGATTTGCTTAAATGCACGCAGAGG	406		
Query 240	TTCAATCCTCGATTCTCGTGAAGTCATTTTCGAGTCAGGACGCTAAAGAATTCATTGAA	299		
Sbjct 405	TTCAATCCTCGATTCTCGTGAAGTCATTTTCGAGTCAGGACGCTAAAGAATTCATTGAA	346		
Query 300	GTCCACCATGTCGTCAACCTCTGAGAGATTTGCATGAACGTCCTGCAAAAGTTGCCGCAA	359		
Sbjct 345	GTCCACCATGTCGTCAACCTCTGAGAGATTTGCATGAACGTCCTGCAAAAGTTGCCGCAA	286		
Query 360	CTCCCCATCTGTAACATCATAGCCGAGGGCATAAAAGGCGACTTTGACTTCGCGTGCCTG	419		
Sbjct 285	CTCCCCATCTGTAACATCATAGCCGAGGGCATAAAAGGCGACTTTGACTTCGCGTGCCTG	226		
Query 420	AATTCGGCCTATCCCTTGTGTATCAAACATGTCGAAAGCTTTCTCAGCTCGAGCTTATG	479		
Sbjct 225	AATTCGGCCTATCCCTTGTGTATCAAACATGTCGAAAGCTTTCTCAGCTCGAGCTTATG	166		
Query 480	TTCTTCCGATATACTAAAGAGCGGCTTTCTATCATTCACTGGAGCGGCGGTATGTACATT	539		
Sbjct 165	TTCTTCCGATATACTAAAGAGCGGCTTTCTATCATTCACTGGAGCGGCGGTATGTACATT	106		
Query 540	CATTGATGAAACAACAGAGCAGGCTTTTCTAGATGGAGCCCGACCGCTTAGGTTGGGTGC	599		
Sbjct 105	CATTGATGAAACAACAGAGCAGGCTTTTCTAGATGGAGCCCGACCGCTTAGGTTGGGTGC	46		
Query 600	ATACCCACTCCTTCTAGAAGATGGCCTGGGAATGCGAGCTGACAT	644		
Sbjct 45	ATACCCACTCCTTCTAGAAGATGGCCTGGGAATGCGAGCTGACAT	1		

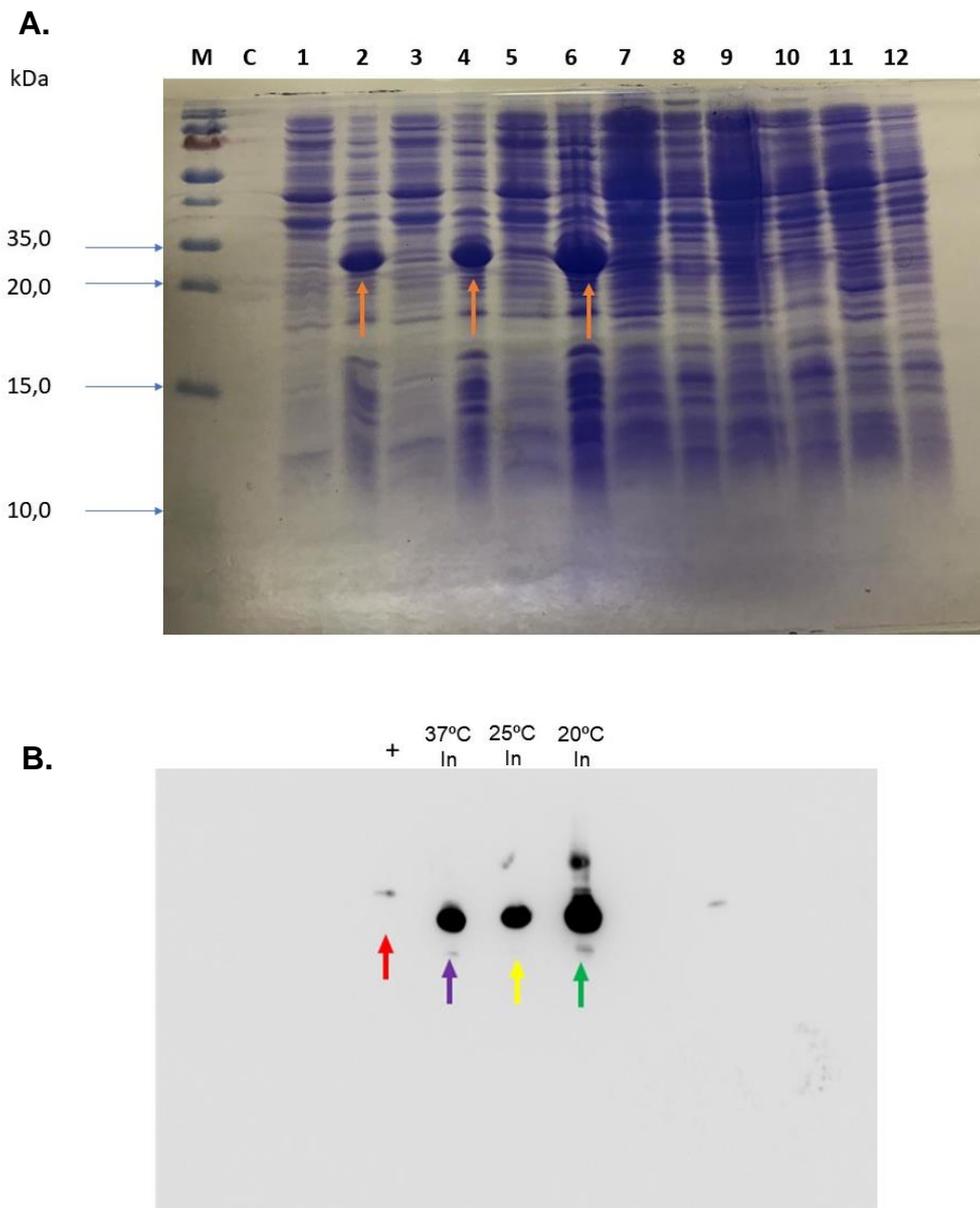
**Figura 32 - Alinhamento da sequência senso obtida com o sequenciamento do gene *PsCEN5* (subject) na construção pET28a(+)*PsCEN5* com a sequência do gene *PsCEN5* obtido nos bancos de dados.**

Para análise da expressão heteróloga da proteína recombinante, das células de *E. coli* foram retiradas alíquotas a cada 1 h após a indução com IPTG 1 mM a 37 °C. As células de *E. coli* foram lisadas e o extrato total obtido foi separado em gel SDS-PAGE 12%, onde foi possível observar a expressão da proteína recombinante a partir de 1 h após a indução (**Fig. 33**). A proteína centrina 5 apresenta uma massa molecular predita de 25,7 kDa e com adição da cauda de histidina 27,8 kDa.



**Figura 33 – Análise da expressão heteróloga da proteína PsCEN5 em gel de poliacrilamida SDS PAGE 12%.** M. Marcador; NI. Não induzido com IPTG. 1h. 1h após a indução com IPTG 1 mM. 2h. 2 h após a indução com IPTG 1 mM. 3h. 3 h após a indução com IPTG 1 mM. 4h. 4 h após a indução com IPTG 1 mM. 5h. 5 h após a indução com IPTG 1 mM.

A expressão da proteína também foi testada sob diferentes condições, para analisar se a proteína se encontra na forma solúvel ou insolúvel. Em todas as amostras analisadas a proteína foi encontrada na forma insolúvel (**Fig. 34-A**), com a massa molecular próxima a 27,8 kDa. A expressão também foi analisada pela técnica de *Western Blotting* onde foi observada a hiperexpressão da proteína sob as diferentes condições com a fusão a seis histidinas (poli His tag) reconhecida pelo anticorpo específico a este tag (**Fig. 34-B**).



**Figura 34 –Análise da expressão da proteína centrina 5 sob diferentes condições de indução. A.** Gel Desnaturante SDS-PAGE 15%. M. Marcador; C. Controle positivo; 1. Expressão induzida a 1 mM a 37°C durante 3 h (porção solúvel); 2. Expressão induzida a 1 mM a 37°C durante 3 h (porção insolúvel); 3. Expressão induzida a 1 mM a 25°C durante 5 h (porção solúvel); 4. Expressão induzida a 1 mM a 25°C durante 5 h (porção insolúvel); 5. Expressão induzida a 0,1 mM a 20°C durante a noite (porção solúvel); 6. Expressão induzida a 0,1 mM a 20°C durante a noite (porção insolúvel); 7. Cultura não induzida (37°C durante 3 h) -porção solúvel; 8. Cultura não induzida (37°C durante 3 h) - porção insolúvel; 9. Cultura não induzida (25°C durante 5 h) - porção solúvel; 10. Cultura não induzida (25°C durante 5 h) - porção insolúvel; 11. Cultura não induzida (20°C durante a noite) -porção solúvel; 12. Cultura não induzida (20°C durante a noite) -porção insolúvel; **B. Western Blot do gel A utilizando anticorpo anti His tag.** +.controle positivo; 37° In - expressão da centrina 5 a 37°C durante 3 h induzidas com IPTG 1mM; 25°C In – expressão da centrina 5 durante 5 h a 25°C com IPTG 1 mM; 20°C In – expressão da centrina 5 a 20°C durante a noite induzida com 0,1 mM.

## DISCUSSÃO

As centrinas são encontradas em organismos eucariotos, com diversas funções associadas principalmente à divisão celular e à motilidade. Da mesma forma que o observado nos outros tripanossomatídeos das espécies *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, em *Phytomonas serpens* 9T também foram identificados cinco genes correspondentes às centrinas.

Dentre as sequências proteicas das centrinas de *P. serpens* 9T, o nível de similaridade entre elas variou em um intervalo de 35,40% a 61,39%, sendo que as menores taxas foram observadas quando as sequências das centrinas 1 a 4 foram comparadas com a centrina 5, o que sugere que esta proteína pode apresentar diferentes funções em relação às outras. A análise da similaridade pode fornecer informações sobre relações evolutivas, estruturas ou funções. De acordo com KINJO *et al.* (2004), as sequências que apresentam uma taxa de similaridade maior que 35-40% provavelmente são estruturalmente semelhantes. Sendo assim, dentre as sequências analisadas, todas apresentaram similaridade superior a 35%, o que pode indicar que elas apresentam estruturas parecidas.

Análises de identidade entre as isoformas de centrinas humanas apresentaram taxas iguais a 84% entre a HsCen1 e HsCen3 e, 52% entre as HsCen2 e HsCen3. A HsCen1 é encontrada no corpo basal de espermatozoides e a HsCen3, foi descrita como localizada no corpo basal de células e no lúmen distal, já a HsCen2 está associada a reparo de DNA e exportação de mRNA para o citoplasma (ZHAO *et al.*, 2017). Em *P. serpens* a taxa de identidade variou entre 16,81% a 40,59%, o que pode indicar que estas proteínas possuem funções diferentes, principalmente a centrina 5 que apresentou as menores taxas de identidade.

Ao contrário do observado nas centrinas dos organismos eucariotos, os motivos *EF-Hands* analisados no banco de dados PROSITE apresentaram apenas três motivos conservados em todas as centrinas, sendo que a centrina 4 foi a única que apresentou os quatro motivos conservados. Dentre as centrinas analisadas, a centrina 5 apresentou um padrão diferente do encontrado nas outras, com o motivo EF-Hand II com o comprimento menor em relação aos outros. A centrina 5

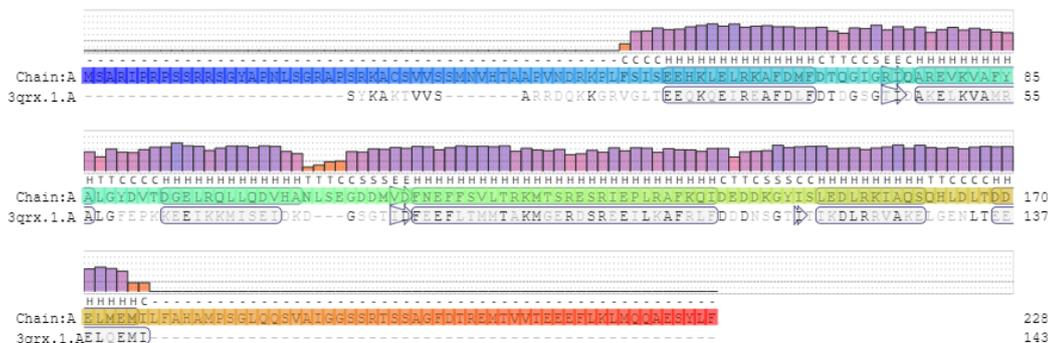
conforme dito anteriormente não foi descrita em outros organismos eucariotos, sendo encontrada até o momento somente nos tripanossomatídeos. No PROSITE estão armazenadas sequências de diferentes organismos e os domínios são preditos através do alinhamento como estas sequências (SIGRIST *et al.*, 2002). Portanto, a centrina 5 por estar restrita a este grupo pode apresentar estrutura diferente de outras proteínas *EF-Hands*, disponibilizadas no banco de dados.

Além disso, também foi observado nestas análises que a região N-terminal apresentou uma maior diversidade entre as centrinas em *P. serpens*, o que corrobora o encontrado em *Trypanosoma brucei* que apresenta a região N-terminal menos conservada e a região C-terminal mais conservada, onde geralmente apresenta maior afinidade aos íons de cálcio (SHAN *et al.*, 2018; SHAN *et al.*, 2019). As análises *in silico* também revelaram que assim como as centrinas dos outros organismos, as centrinas de *P. serpens* também apresentaram massa molecular em torno de 20 kDa.

As estruturas tridimensionais das centrinas preditas *in silico* através da homologia entre as sequências alvo e modelo. Elas apresentaram formas similares a halteres, característicos destas proteínas. Dentre os modelos obtidos, a centrina 4 foi a que apresentou a maior taxa de identidade entre a sequência modelo e alvo (89,26%) e com a maior porcentagem dos resíduos nas regiões favoráveis (96,2%), isto provavelmente ocorreu porque a proteína selecionada como modelo foi a centrina 4 de *T. brucei*, a qual tem a sua estrutura tridimensional resolvida experimentalmente por ressonância magnética nuclear. Estudos experimentais com a centrina 4 de *T. brucei* demonstraram existem dois sítios com afinidade a íons de cálcio (SHAN *et al.*, 2019). Já o modelo tridimensional de *P. serpens* não apresentou nenhum sítio de ligação ao cálcio, sendo então necessário estudos experimentais para a análise dos sítios de ligação ao cálcio.

A estrutura tridimensional da centrina 5 mostrou morfologia similar a um haltere com seis  $\alpha$ -hélices, com uma  $\alpha$ -hélice a menos na região C-terminal. A sequência que apresentou maior taxa de identidade com a centrina 5 de *P. serpens* foi a da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, a qual foi escolhida como modelo para a construção do modelo tridimensional, por apresentar a maior taxa de similaridade entre as sequências disponíveis no banco de dados do servidor. O alinhamento

entre as duas sequências demonstrou que havia aminoácidos não conservados nas regiões N-terminal e C-terminal (**Fig.35**) e este não alinhamento pode ocasionar erros na estrutura tridimensional (SCHWEDE, *et al.*, 2003).



**Figura 35 - Alinhamento obtido no servidor SWISS MODEL entre a sequência da centrina 5 de *P. serpens* 9T (Chain: A) e a sequência modelo (3qrx.1).** (<https://swissmodel.expasy.org/>)

As sequências das centrinas obtidas de *P. serpens* foram utilizadas para analisar as relações evolutivas entre os outros tripanossomatídeos, onde foi construído um cladograma. Neste, as centrinas foram distribuídas em cinco diferentes grupos. Assim como observado por SHAN *et al.* (2019), nós também identificamos um ancestral comum entre a centrina 3 e a centrina 5. Em células de *T. brucei*, as duas proteínas foram encontradas localizadas no flagelo, o que pode indicar que elas participam dos processos de locomoção celular (WEI *et al.*, 2014).

Além disso, as sequências gênicas correspondentes as centrinas de *P. serpens* também foram utilizadas para o desenho de iniciadores para amplificação. Os cinco genes foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores específicos e o gene da centrina 5 foi subclonado no vetor de expressão pET28a(+) e expresso em células de *E. coli*. Sob as diferentes condições de indução, a proteína foi hiperexpressa de forma insolúvel, ou seja, as proteínas encontravam-se em corpos de inclusão (WURM *et al.*, 2016). Os corpos de inclusão são agregados de proteínas na sua conformação não nativa encontrados no citoplasma (CARRIÓ *et al.* 2005; BANEYX *et al.* 2004). A expressão da proteína sob condições de altas temperaturas e altas concentrações do indutor normalmente estão associadas a uma alta expressão da proteína heteróloga. Porém, o aumento dessa expressão faz com que estas proteínas sejam agregadas nos corpos de inclusão (SINGH *et al.*, 2015). Portanto, ao longo deste trabalho nós variamos as temperaturas e as

concentrações do indutor (IPTG), a fim de obter a proteína na forma solúvel. A proteína heteróloga correspondente a centrina 5 de *T. brucei* foi expressa na mesma linhagem bacteriana utilizada neste trabalho, sendo que as condições de expressão foram diferentes: indução com 0,5 mM de IPTG, a 16°C durante 20h (SHAN *et al.*, 2019).

A massa correspondente à centrina 5 com a cauda de poli-histidina foi calculada através de ferramentas *in silico* e é igual a 27,8 kDa. A expressão da proteína recombinante foi realizada nas diferentes condições, com tamanho próximo ao calculado. A técnica de *Western Blot* também foi utilizada e a expressão foi confirmada através da utilização de anticorpos específicos para a cauda de poli-histidina, que permite a purificação da proteína em coluna de níquel.

## CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

As centrinas são encontradas nos organismos eucariotos, associadas a diferentes funções, relacionadas principalmente a divisão e motilidade celular. Neste trabalho nós estudamos estas proteínas em protozoários flagelados da espécie *Phytomonas serpens* linhagem 9T. Através das análises *in silico*, nós identificamos cinco genes correspondentes as centrinas 1 a 5 e a partir das sequências destes genes obtivemos as estruturas tridimensionais por meio da modelagem de proteínas por homologia, sendo que as estruturas tridimensionais apresentaram estrutura similar a halteres, conforme observado em outras centrinas e algumas delas com sítios de ligação ao cálcio.

Nas análises experimentais, nós amplificamos e clonamos os genes correspondentes a cada centrina e expressamos o gene correspondente a centrina 5 em células de *E. coli* e hiperexpressamos a proteína recombinante correspondente a centrina 5, presente nos tripanossomatídeos. A partir da proteína obtida, ensaios futuros podem ser realizados como a imunização de camundongos para a obtenção de anticorpos específicos anti-centrina 5, possibilitando a citolocalização daquelas em células de *P. serpens*. Além disso, a estrutura tridimensional da proteína também poderá ser analisada através de estudos estruturais.

Na literatura ainda não existem muitos dados sobre centrinas em *Phytomonas serpens*. Portanto, o estudo destas proteínas neste micro-organismo contribui para o entendimento de processos biológicos celulares como divisão celular e motilidade, alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas que controlem as patologias provocadas pelo grupo de parasitas da família Trypanosomatidae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAGÃO, H. de B. Pesquisas sobre *Phytomonas françai*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.4, p.299-302, 1931.

BAUM, P.; FURLONG, C.; BYERS, B. Yeast gene required for spindle pole body duplication: Homology of its product with Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 83, n.15, p. 5512-5516, 1986.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant Protein Folding and Misfolding in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, n.11, p. 1399-1408, 2004.

CAMARGO, E. P.; WALLACE, F.G.; Vectors of Plant Parasites of the Genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida). **Advances in Disease Vector Research**, v.10, p. 333-359, 1994.

CAMARGO, E. P.; *Phytomonas* and other trypanosomatid parasite of plants and fruits. **Adv. Parasitol.**, v. 42, p. 29-112, 1999.

CARNEIRO, G. F. R.; SANTOS JÚNIOR, A. C. M.; ARAÚJO, M. M. C; LIMA, B. D. Análise da expressão gênica das proteínas centrininas de *Phytomonas serpens*. In: Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília, 23., Brasília. Anais eletrônicos. Brasília, UnB, 2017. Disponível em: <  
<https://conferencias.unb.br/index.php/iniciacaocientifica/23cicunb14df/paper/view/6911>>.

CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, v. 56, p.250-276, 2016.

CARRIÓ, M. M.; VILLAVERDE, A. Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 10, p. 3599-3601, 2005.

DANTAS, T.; WANG, Y.; LALOR, P.; DOCKERY, P.; MORRISON, C. G. Defective nucleotide excision repair with normal centrosome structures and functions in the absence of all vertebrate centrins. **JBC**, v. 193, n. 2, p. 307-318, 2011.

DOLLET, M. Plant disease caused by flagellate Protozoa (*Phytomonas*). **Ann. Rev.**

**Phytopathol**, v. 22, p. 115-132, 1984.

DOLLET, M. Phloem-restricted trypanosomatids form a clearly characterised monophyletic group among trypanosomatids isolated from plants. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 459-467, 2001.

DONOVAN, C. KALA-AZAR IN MADRAS, ESPECIALLY WITH REGARD TO ITS CONNEXION WITH THE DOG AND THE BUG (CONORRHINUS). **The Lancet**, v.174, p.1495-1496, 1909.

FISCHER, T. *et al.* Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 9, p.840-848, 2004.

GAVET, O.; ALVAREZ, C.; GASPAR, P.; BORNENS, M. Centrin4p, a novel mammalian centrin specifically expressed in ciliated cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 1818-1834, 2003.

GIBBS, A. J. *Leptomonas serpens* n.sp., parasitic in the digestive tract and salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. **Parasitology**, 1957.

GOGENDEAU, D. *et al.* Functional diversification of centrins and cell morphological complexity. **Journal of Cell Science**, v. 121, p.65-74, 2008.

HU, K.; JOHNSON, J.; FLORENS, L.; FRAUNHOLZ, M.; SURAVAJJALA, S.; DILULLO, C.; YATES, J.; ROOS, D. S.; MURRAY, J. S. Cytoskeletal Components of an Invasion Machine - The Apical Complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog**, v. 2, n.2, p. 121-138, 2006.

KINJO, A. R.; NISHIKAWA, K. Eigenvalue analysis of amino acids substitution matrices reveals a sharp transition of the mode of the sequence conservation in proteins. **Bioinformatics**, v. 20, n. 16, 2004.

KRETSINGER, R. H.; NOCKOLDS, C. E.; Carp Muscle Calcium-binding protein. **The journal of Biological Chemistry**, v. 218, n. 9, p. 3313-3326, 1973.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D.S. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. App. Cryst**, v. 23, p.

283-291, 1993.

LEUNG, J. M.; LIU, J.; WETZEL, L. A.; HU, K. Centrin2 from the human parasite *Toxoplasma gondii* is required for its invasion and intracellular replication. **Journal of Cell Science**, v. 132, p. 1-17, 2019.

LOPES, A. H.; Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**, v.4, p.30-59, 2010.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98, 1999.

HARLOW, E. Antibodies, a laboratory manual. 2 ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

HE, C. Y.; PYPAERT, M.; WARREN, G. Cell biology: Golgi duplication in *Trypanosoma brucei* requires Centrin2. **Science**, v. 310, n. 5751, p.1196-1198, 2005.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. **Nature**, v.212, p.1385-1386, 1966.

HU, H.; SHEEHAN, J.; CHAZIN, J. The Mode of Action of Centrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 49, p. 50895-50903, 2004.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v.196, n.1, p.23-28, 1990.

JANKEVICIUS, J. V. *et al.* Life Cycle and Culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a Trypanosomatid Parasite of Tomatoes. **The Journal of Protozoology**, v. 36, n. 3, p.265-271, 1989.

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, v.10, p. 1-17, 2017.

KAWASAKI, H.; KRETSINGER, R. H.; Analysis of the movements of helices in EF-Hands. **Proteins**, v. 80, n.11, p. 2592-2600, 2012.

LEWIT-BENTLEY, A.; RÉTY, S. EF-Hand calcium-binding proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 6, p. 637-643, 2000.

MAHAJAN, B.; SELVAPANDIYAN, A.; GERALD, N. J.; MAJAM, V.; ZHENG, H.; WICKRAMARACHCHI, T.; TIWARI, J.; FUJIOKA, H.; MOCH, J. K.; KUMAR, N.; ARAVIND, L.; NAKHASI, H. L.; KUMAR, S. Centriins, Cell Cycle Regulation Proteins in Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 46 p. 31871-31883, 2008.

MEDINA, J. M. *et al.* Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 48-55, 2015.

MIRANDA, M. R. *et al.* *Phytomonas*: A non-pathogenic trypanosomatid model for functional expression of proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 114, p. 44-47, 2015.

NAKAYAMA, S.; KRETSINGER, R.H.; Evolution of the EF-Hand family proteins. **Annu. Rev. Biophys. Biomol.**, v. 23, p.423-507, 1994.

NOVAGEN. pET System Manual. Novagen, 2011, 11 ed., 63 p.

PASTRANA-RÍOS, B.; REYES, M.; De ORBERTA, J.; MEZA, V; NARVÁEZ, D.; GÓMEZ, A. M.; NASSIF, A. R.; ALMODOVAR, R.; CASAS, A. D.; ROBLES, J.; ORTIZ, A. M.; IRIZARRY, L.; CAMPBELL, M.; CÓLON, M. Relative Stability of Human Centriins and Its Relationship to Calcium Binding. **Biochemistry**, v. 52, p. 1236-1248, 2013.

PORCEL, B. M.; DENOEUDE, F.; OPPERDOES, F.; NOEL, B. MADOU, M.A.; HAMMARTON, T. C.; FIELD, M. C.; Da SILVA, C.; POULAIN, J.; KATINKA, M. JABBARI, K.; AURY, J. M.; CAMPBELL, D. A.; CINTRON, R.; DICKENS, N. J.; DOCAMPO, R.; STURM, N. R.; FABRE, S.; FLEGONTOV, P.; LUKES, J.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; SZOOR, B.; ZILBERSTEIN, D.; BRINGAUD, F.; WINCKER, P.; DOLLET, M. The Streamlined Genome of *Phytomonas* spp. Relative a Human Pathogenic Kinetoplastids Reveals a Parasite Tailored for Plants. **PLoS Genetic**, v. 10, n. 2, p.1-24, 2014.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SALISBURY, J. *et al.* Centrin-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells. **Curr. Biol.**, v. 12, n. 15, p.1287-1292, 2002.

SALISBURY, J. L. *et al.* Striated flagellar roots: Isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. **Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 1, p. 962-970, 1984.

SALISBURY, J. L. Centrioles, centrosomes, and mitotic spindle poles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 39-45, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - Sambrook & Russell - Vol. 1, 2, 3.** [s.l: s.n.].

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modelling. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381-3385, 2003.

SELVAPANDIYAN, A. *et al.* Role of Centrioles 2 and 3 in Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1-11, 2012.

SELVAPANDIYAN, A.; DEBRANT, A.; DUNCAN, R.; MULLER, J.; SALOTRA, P.; SREENIVAS, G.; SALISBURY, J. L.; NAKHASI, H. Centrin Gene Disruption Impairs Stage-specific Basal Body Duplication and Cell Cycle Progression in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 24, p. 25703-25710, 2004.

SERRANO, M. G. *et al.* Trypanosomatidae: Phytoomonas detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 3, p. 268-279, 1999.

SHAN, F.; YE, K.; ZHANG, J.; LIAO, S.; ZHANG, X.; XU, C.; TU, X. Solution structure of TbCentrin4 from *Trypanosoma brucei* and its interactions with Ca<sup>2+</sup> and other centrioles. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 23, p. 3763-3778, 2018.

SHAN, F.; YANG, X.; DIWU, Y.; MA, H.; TU, X. *Trypanosoma brucei* centrin5 is enriched in the flagellum and interacts with other centriole calcium-dependent manner. **FEBS open bio**, v. 9, p. 1421-1431, 2019.

SHI, J. *et al.* Centrin4 coordinates cell and nuclear division in *T. brucei*. **Journal of**

**Cell Science**, v.121, p. 3062-3070, 2008.

SINGH, A.; U

SOUZA, A. R. *Divisão celular do Trypanosoma cruzi: o papel da subunidade TcSCC1 do complexo coesina e das proteínas centrininas*, 2016. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília.

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

SIGRIST, C. J. A.; CERUTTI, L.; HULO, N.; GATTIKER, A.; FALQUET, L.; PAGNI, M.; BAIROCH, A.; BUCHER, P. PROSITE: A documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 3, n. 3, p. 265-274, 2002.

VEERAGHARAN, S.; FAGAN, P. A.; HU, H.; LEE, V.; HARPER, J.F.; HUANG, B.; CHAZIN, W.J. Structural Independence of the Two EF-Hands Domains of Caltractin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 32, p. 28564-28671, 2002.

VERMEULEN, H. A Wilt of *Coffea liberica* in Surinam and its Association with a Flagellate, *Phytomonas leptovasorum* Stahel. **The Journal of Protozoology**, v.10, n.2, p. 216-222,1963.

WATERHOUSE, A.; BERTONI, M.; BIENERT, S.; STUDER, G.; TAURIELLO, G.; GUMUIENNY, R.; HEER, F. T.; de BEER, T. A. P.; REMPFER, C.; BORDOLI, L.; LEPORE, R.; SCHWEDE, T. **Nucleid Acid Research**, v. 46, p. 296-302, 2018.

WEI, Y. *et al.* Centrin3 in trypanosomes maintains the stability of a flagellar inner-arm dynein for cell motility. **Nature Communications**, v. 3, n. 5, p.1-24 2014.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p.1-18, 2013.

WURM, D. J.; VEITER, L.; ULONSKA, S.; EGGENREICH, B.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. The *E. coli* pET expression system revisited - mechanistic correlation between glucose and lactose uptake. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.100, n.20, p. 8721-8729, 2017.

## ANEXO I

<b>Identificação</b>	<b>Número de Acesso</b>	<b>Banco de dados</b>	<b>Espécie</b>
<b>LbCEN1</b> <b>(centrina 1)</b>	XP_001564470.1	NCBI	<i>Leishmania braziliensis</i>
<b>LbCEN2</b> <b>(centrina 2)</b>	XP_001562574.1	NCBI	<i>Leishmania braziliensis</i>
<b>LbCEN3</b> <b>(centrina 3)</b>	XP_0011569255.1	NCBI	<i>Leishmania braziliensis</i>
<b>LbCEN4</b> <b>(centrina 4)</b>	XP_001565047.1	NCBI	<i>Leishmania braziliensis</i>
<b>LbCEN5</b> <b>(centrina 5)</b>	XP_001567431.1	NCBI	<i>Leishmania braziliensis</i>
<b>LmCEN2</b> <b>(centrina 2)</b>	XP_001680978.1	NCBI	<i>Leishmania major</i>
<b>LmCEN4</b> <b>(centrina 4)</b>	XP_001683292.1	NCBI	<i>Leishmania major</i>
<b>SpCentrin</b>	NP_587797.1	NCBI	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<b>TbCEN1</b> <b>(centrina 1)</b>	XP_844376.1	NCBI	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TbCEN2</b> <b>(centrina 2)</b>	XP_846945.1	NCBI	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TbCEN3</b> <b>(centrina 3)</b>	XP_823096	NCBI	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TbCEN4</b> <b>(centrina 4)</b>	XP_845964.1	NCBI	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TbCEN5</b> <b>(centrina 5)</b>	XP_829446.1	NCBI	<i>Trypanosoma brucei</i>
<b>TcCEN1</b> <b>(centrina 1)</b>	XP_821799.1	NCBI	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TcCEN2</b> <b>(centrina 2)</b>	XP_821263.1	NCBI	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TcCEN3</b> <b>(centrina 3)</b>	XP_83096.1	NCBI	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TcCEN4</b> <b>(centrina 4)</b>	XP_813165.1	NCBI	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TcCEN5</b> <b>(centrina 5)</b>	XP_81662.1	NCBI	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TgaCEN1</b> <b>(centrina 1)</b>	XP_009309420.1	NCBI	<i>Trypanosoma grayi</i>
<b>TgaCEN2</b> <b>(centrina 2)</b>	XP_009309580.1	NCBI	<i>Trypanosoma grayi</i>
<b>TgaCEN3</b> <b>(centrina 3)</b>	XP_009307106.1	NCBI	<i>Trypanosoma grayi</i>
<b>TgaCEN4</b> <b>(centrina 4)</b>	XP_009310513.1	NCBI	<i>Trypanosoma grayi</i>
<b>TgaCEN5</b> <b>(centrina 5)</b>	XP_009307021.1	NCBI	<i>Trypanosoma grayi</i>

## ANEXO II

### Centrina 1 – *Phytomonas* sp. HART 1

>CCW66545.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate Hart1]  
MQAWTRSATGASTGHPSGVVRTTAPINSIAPPLPAARRRFQLTEEQRRREINEVFELFDYDKNGLIDAREM  
KVSMRALGFVVKRDEVIQLMQDSAARDQHNQPLMDLEGFTDIMTEKFSQRDPKEEIIKAFQLFDEKKTGK  
ISLRSLLRRVARELGENMSDDELQAMIDEFDKQDGEINLEEFMTIMLEEDDC

### Centrina 1 – *Phytomonas* sp. EM1

>CCW60638.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate EM1]  
MQGWTRSTTGSGTGHGTAGMVRTTAPTNSVAPPPAARRRFQLTEEQRQEIREAFELFDSKNGLIDAHM  
KVSMRALGFVVKRDEVTRLMQDCAARDQNGQPLMDLAGFTDIMTEKFSQRDPQEMIKAFQLFDENNTGK  
ISLRSLLRRVARELGENMSDDELQAMIDEFDTDQDGEINLEEFMAIMLEEDDY

### Centrina 2 – *Phytomonas* sp. HART1

>CCW71655.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate Hart1]  
MQPGSASVGGNAAGTGATSAPLDSTEIVLTEDQQEEIRETFELFDTDGSGTIDSKEKLVMTMRALGFEPN  
EELLELLSDFNLQKQPSSASSGRPLDEEKEFNLDVITYPQFLHIMSKMMKRDPREEMIMAFRMFDDDET  
GKITFKNLKRVAMELGENMTDELQEMIDEADRNGDGEIDEDEFRLRLMKKTALY

### Centrina 2 – *Phytomonas* sp. EM1

>CCW65498.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate EM1]  
MQSGSISAGSNVAAAPTESPPAEIVLTADQQDEIKDAFDLFDTDGSGTIDAKELKVAMRALGFEPKKEEL  
QQLLSDFIPHKKTASGRHDDDDLNLDVITYPQFVHIMSKMTERDPREEMIKAFRMFDDDETGKITFKNL  
KRVAMELGENMTDAELQEMIDEADRNGDGEVDEDEFRLRLMKKTSLY

### Centrina 3 – *Phytomonas* sp. HART1

>CCW66328.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate Hart1]  
MAALTDVQIREAFNLFNIDGSGAIDAEEMALAMKSLGFGDLSSNEVELIIGSMKTNASGFIEYEEFEKMI  
KSRMAQKDSPEEIFMAFKLFDLDRGKISLSNLKEVAKMLGESPGDDVLQEMIAEADEDGDGEVSFEFEK  
NVMIQMKGK

### Centrina 3 – *Phytomonas* sp. EM1

>CCW61984.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate EM1]  
MAALTDVQIREAFNLFNIDGSGAIDAEEMALAMKSLGFGDLPRDEVERIVRSKMTNANGLVEYSEFEKMI  
KSRMAPKDSPEEIFKAFQLFDLDRGKISLANLKEVAKMLGESPGDDVLQEMIAEADEDGDGEVSFEFEK  
NVMTQMKGK

### Centrina 4 – *Phytomonas* sp. HART1

>CCW66328.1 unnamed protein product [Phytomonas sp. isolate Hart1]  
MAALTDVQIREAFNLFNIDGSGAIDAEEMALAMKSLGFGDLSSNEVELIIGSMKTNASGFIEYEEFEKMI  
KSRMAQKDSPEEIFMAFKLFDLDRGKISLSNLKEVAKMLGESPGDDVLQEMIAEADEDGDGEVSFEFEK

NVMIQMKGK

#### **Centrina 4 – *Phytomonas* sp. EM1**

>CCW61984.1 unnamed protein product [*Phytomonas* sp. isolate EM1]  
MAALTDEQIREAFNLFDTDGSGAIDAEEMALAMKGLGFGDLPRDEVERIVRSMKTNANGLVEYSEFEKMI  
KSRMAPKDSPEEIFKAFQLFDLDRGKISLANLKEVAKMLGESPGDDVLQEMIAEADEDGDGEVSEFEFK  
NVMTQMKGK

#### **Centrina 5 – *Phytomonas* sp. HART1**

>CCW70565.1 unnamed protein product [*Phytomonas* sp. isolate Hart1]  
MSARVPKPSSKSSRFMPNSSGRTASKKPGSILPSRNAHTTAQGNDRKPLFSISEEHKLELRKAFDMFDTQ  
GIGRIQAREVKVAFYALGYDVTDGELRQLLQDVHANLSDGDMVDFNEFFSVLTRKMTSRESRIEPLRAF  
KQIDEDDKGYISLDDLKIAQSQHLDLTDDELMEMILFASHTVPSGMQHSATMGGSSRTSSAGFDMREMSV  
VTEDEFIKLMQQAESYLS

#### **Centrina 5 – *Phytomonas* sp. EM1**

>CCW62733.1 unnamed protein product [*Phytomonas* sp. isolate EM1]  
MSARVPRPSSRRSVFAPNLSGQAPSRKTCSVSSMNVHTAAPASDRKPLFSISEEHKLELRKAFDMFDTQ  
GIGRIQAREVKVAFYALGYDVTDGELRQLLQDVHAKLSGGDDMDFNEFFSVLTRKMTSRESRIEPLRAF  
KQIDEDDKGYISLEDLRKAQSQHLDLTDDELMEMILFAHTMPSGMQSVAFSGSNRTSSAGFDTREMAV  
VTEEEFLKLMQQAESYLS

## ANEXO III

### Centrina 1 – *Phytomonas serpens* 9T

>gb|AIHY01000797.1|:2787-3365 *Phytomonas serpens* 9T phyto\_c798, whole genome shotgun sequence  
ATGCAGGCTTGGACTCGCGGTACCGCCAGTGGTTCCACCGGACATACCGCAGGGATGGTTTTCGAACGACAGCCC  
CGACGAATTCGGTAGCACCACCACCAGCCGCCCGCGCCGCGGATTTCAACTCACGGAAGAGCAGCGACAGGA  
GATCCGTGAAGCCTTTGATCTTTTTGATTCTGACAAAAACGGCCTGATTGATGCTCACGAGATGAAAGTCAGC  
ATGCGTGCCCTAGGGTTCGACGTGAAACGCGATGAGGTTACGCGTCTGATGCAGGATTGTGCCGCGCGAGATC  
AGAACGGTCAGCCCTTAATGGATTTGGCAGGGTTCACGGATATCATGACTGAAAAATTTCCCAACGGGACCC  
AAGGCAAGAAATGATCAAAGCCTTTCAGTTATTTGATGAAAATAACACCGGTAAGATTTTCATTGCGCTCGCTA  
CGCCGTGTGGCGCGGGAGCTTGGTGAGAACATGAGCGATGATGAGTTGCAGGCTATGATCGACGAGTTTCGACA  
CAGATCAAGACGGGGAGATAAATCTGGAGGAATTTATGGCAATCATGTTGGAAGAGGATGACTACTAA

Tamanho: 579 bp

#### Sequência de aminoácidos

MQAWTRGTASGSTGHTAGMVRTTAPTNSVAPPPAAPRRRFQLTEEQRQEIREFDLFDSKNGLI DAHEMKVS  
MRALGFVVKRDEVTRLMQDCAARDQNGQPLMDLAGFTDIMTEKFSQRDPRQEMIKAFQLFDENNTGKISLRSL  
RRVARELGENMSDDELQAMIDEFDTDQDGEINLEEFMAIMLEEDDY

192 aa

### Centrina 2 – *Phytomonas serpens* 9T

>gb|AIHY01001398.1|:571-1128 *Phytomonas serpens* 9T phyto\_c1399, whole genome shotgun sequence  
ATGCAGTCTGGAAGCTTTTCTGGCGGTAGTAATGCGGGCGGGCCCCCTACTCAGTCCCCCGCCGCGAGATCG  
TCCTGACCGCCGATCAGCAGGATGAGATCAAGGAGGCTTTCGACCTCTTTGACACCGACGGCAGCGGGACGAT  
CGACGCGAAGGAGCTCAAGGTGGCGATGCGCGCGCTCGGGTTCGAACCGGGAAGGAGGAGCTCCAGAAGCTT  
CTTTCGGATTTCATCCCGCACAAAAAGCCGTCGTCGACGCGGCATGAGGAGGACGACCTCAACCTCGACGTGA  
TCACCTACCCGACGTTTGTGCATATCATGTGGAAGAAGATGACGGAGCGGGATCCCCGGGAGGAGATGATCAA  
GGCGTTTCGCATGTTTGTGACGACGACGAGACGGGGAAGATCACGTTTAAGAACCCTCAAGCGTGTGGCGATGGAG  
CTTGGGGAGAACATGACGGATGCGGAGCTGCAGGAGATGATCGACGAGGCAGACCAGCAACGGCGACGGCGAGG  
TCGACGAGGACGAGTTCTGCGGCTCATGAAAAAGACCTCCCTGTAC

Tamanho: 558 bp

#### Sequência de aminoácidos

MQSGSFSGSNAAAAPTQSPAEEIVLTADQQDEIKEAFDLFDTDGSGTIDAKELKQVAMRALGFEPKKEELQKLLSDFIPHK  
KPSSTRHEEDDLNLDVITYPQFVHIMSKKMTERRDPREEMIKAFRMFDDDETGKITFKNLKRVAMELGENMTDABLQEMIDE  
ADRNGDGEVDEDEFLRLMKKTSLY

186 aa

### Centrina 3 – *Phytomonas serpens* 9T

>gb|AIHY01000563.1|:30511-31011 *Phytomonas serpens* 9T phyto\_c564, whole genome shotgun sequence

TTAATTCTTCTCAGATGACAACATTTTCATAAAATCTTGTGCGAGATATGCGATGATCGTGATCCAGTACA  
TCAGATTTCTCTATGATTTCCATGAGCGTCTCCTCCGGCATGTTTTACCTACTTCAGCTGCAACACGCT  
TCAGGTCATCTAATGTGATAAACTCGGATTTTCCCTGGGTAAAGAGTGGAAACGCCAGTTCCAACCTCCTC  
GTCGTTATCCTCTAGGAAAAAGGCTTGACGCATGATTTCCCTCAAATTCAGCCAAAACAATGCTGTTTCGAA  
ACACCACTGCGGTCCATTTTGGCAATCAAGTTGCGAACCACATCCCTCTTTGGCTCATAACCTAGCGCCC  
GTAGTGCAACCTTGAGATCGTTCGGCGTCATGGCTTTAGTGCCGTTTCATGTCAAGCATACAAAACGCCTC  
TGCAATATCTTCCCTTTGCTTTGCTGTCAGGTCCGGTTTCAGGTGATGCCCTTTTTGTGTAGAGAAGCTT  
CTCTGGCTCAT

Tamanho: 501 bp

Sequência de aminoácidos

MSQRSFSTQKGHHLKPDLTAKQKEDIAEAFCLMDMNGTKAMTPNDLKVALRALGYEPKRDVVRNLIKMDRSGVSNISIVLA  
EFEEIMRQAFPLEDNDEELELAFPLFTQKSEFITLDDLKRVAEEVGENMPEETLMEIIEKSDVLDHHRISRQEFMKMLS  
SEKN

166 aa

#### Centrina 4 – *Phytomonas serpens* 9T

>gb|AIHY01002976.1|:1007-1456 *Phytomonas serpens* 9T phyto\_c2985, whole genome shotgun sequence

TTATTTTCCCTTCATTTGAATCATGACATTTCTTAAACTCCTCAAATGAGACTTCGCCATCGCCATCTTCA  
TCCGCCTCGGCGATCATCTCTTGCAAAACGTCATCTCCAGGGTTCTCACCCAGCATTTTCGCCACCTCCT  
TGAGATTTGCAAGTGATATCTTTCTCTCTTGTCTAAATCAAAGAGTTGAAATGCTTTGAAGATTTCTTC  
TGGAGAGTCTTTCGGTGCCATGCGGGATTTGATCATCTTTTCAAATTCATTATACTCAACGAGACCGTTG  
GCGTTTCGTTTTTCATGGAGCGAACAATACGCTCGACCTCGTCGCGTGGAAGATCACCGAAGCCCAGCCCTT  
TCATGGCTAATGCCATCTCTCCGCATCAATCGCCCCGGATCCATCCGTATCGAAGAGGTTGAAAGCTTC  
CGAATCTGTTTCATCAGTAAGCGCAGCCAT

Tamanho: 450 bp

Sequência de aminoácidos

MAALTDEQIREAFNLFDTDGSGAIDAEEMALAMKGLGFGDLPRDEVERIVRSMKTNANGLVEYNEFEKMIKSR  
MAPKDSPEEIEFKAFQLFDLDRGKISLANLKEVAKMLGENPGDDVLQEMIAEADEDGDGEVSEFEFKNVMIQM  
KGKX

150 aa

#### Centrina 5 – *Phytomonas serpens* 9T

>gb|AIHY01001484.1|:9410-10096 *Phytomonas serpens* 9T phyto\_c1485, whole genome shotgun sequence

CTAGAATAAAATAAGACTCGGCTTGCTGCATCAACTTTAAGAACTCCTCTTCTGTGACAACAGTCATCTCT  
CTTGTATCAAACCCAGCGGAGCTCGTGCGACTGCTACCACCGATGGCTACGGATTGCTGCAACCCAGAAG  
GCATAGCATGTGCAAAAAGAATCATTTCCATGAGCTCATCGTCCGTGAGGTCTAGATGCTGTGATTGTGC  
GATTTTTCGCAAGTCTTCCAACGAAATATACCCCTTGTATCCTCATCGATTTGCTTAAATGCACGCAGA  
GGTTC AATCCTCGATTCTCGTGAAGTCATTTTTTCGAGTCAGGACGCTAAAGAATTCATTGAAGTCCACCA

TGTCGTCACCCTCTGAGAGATTTGCATGAACGTCCTGCAAAAAGTTGCCGCAACTCCCCATCTGTAACATC  
ATAGCCGAGGGCATAAAAAGGCGACTTTGACTTCGCGTGCCTGAATTCGGCCTATCCCTTGTGTATCAAAC  
ATGTCGAAAAGCTTTCCTCAGCTCGAGCTTATGTTCTTCCGATATACTAAAGAGTGGCTTTCATCATTCA  
CTGGAGCGGCGGTATGTACATTCATTGATGAAACAACAGAGCAGGCTTTTCTAGATGGAGCCCCGACCGCT  
TAGGTTGGGTGCATACCCACTCCTTCTAGAAGATGGCCTGGGAATGCGAGCTGACAT

Tamanho: 687 bp

*Sequência de aminoácidos*

MSARI PRPSSRRSGYAPNLSGRAPSRKACSVVSSMNVHTAAPVNDKPLFSISEEHKLELRKAFDMFDTQIGIG  
RIQAREVKVAFYALGYDVTGELRQLLQDVHANLSEGDDMVDNFNEFFSVLTRKMTSRESRIEPLRAFKQIDED  
DKGYISLEDLRKIAQSQHLDLTDDELMEMILFAHAMPSGLQQSVAIGSSRTSSAGFDTREMTVVTEEEFLKL  
MQQAESYLE

228 aa