



## Estudo da proteína EB1 de *Schistosoma mansoni* como potencial regulador do canal de cálcio CRAC

Thais Rangel Figueiredo, Ana Eliza Zeraik

Os parasitas helmintos são responsáveis por doenças que afetam um bilhão de pessoas no mundo, como o schistosoma que é o causador da esquistossomose. Os seres humanos atuam como hospedeiros de seis espécies de schistosoma, que se diferenciam principalmente por seus hospedeiros intermediários e sua localização geográfica. Dentre os três principais estão: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e o *Schistosoma mansoni*. No continente americano o principal causador da esquistossomose é a espécie *Schistosoma mansoni*. A esquistossomose conta apenas com um medicamento comercializado, o praziquantel, que atua desestabilizando a homeostase de cálcio em vermes adultos, destacando assim o potencial das proteínas dos canais de cálcio como alvos para futuras intervenções. O canal CRAC (Calcium release-activated channels) de *S. mansoni* foi previamente caracterizado e foi observada a entrada constitutiva de cálcio quando este canal era expresso em células de mamíferos. O objetivo do presente trabalho é estudar a proteína EB1 de *S. mansoni* (SmEB1), pois a proteína ortóloga humana já foi descrita como reguladora do canal CRAC humano e visamos, portanto, avaliar se SmEB1 é um fator determinante na entrada constitutiva de  $Ca^{2+}$  observada. O projeto visa a clonagem de SmEB1 em vetor de expressão pTagBFP-C. Para isso, a sequência correspondente à proteína SmEB1 será amplificada por PCR (reação em cadeia de polimerase) utilizando-se primers específicos para esta sequência e cDNA de vermes adultos como template. O inserto resultante será inserido no vetor utilizando enzimas de restrição. O clone será utilizado para transfecção de células HEK293. Após a transfecção será avaliada a localização subcelular de SmEB1 através de microscópio confocal. As células transfectadas irão conter, além de SmEB1 fusionada a uma proteína fluorescente azul (BFP), duas proteínas que constituem o canal CRAC: SmORAI (fusionada à mCherry) e SmSTIM (fusionada à GFP). As três proteínas coexpressas com proteínas de fusão fluorescentes em diferentes regiões do espectro visível serão avaliadas quanto à colocalização. Também será medido o fluxo de cálcio nas células transfectadas, para avaliação do papel de SmEB1 na entrada constitutiva de  $Ca^{2+}$  com o uso de indicador Fluo-4. Ao final do trabalho visamos avaliar se SmEB1 é um fator importante na regulação do canal de cálcio CRAC de *S. mansoni* e assim obter uma melhor compreensão das diferenças no mecanismo de funcionamento entre os canais de cálcio humanos e do schistosoma, além de identificar novas potenciais proteínas que regulem a sua atividade.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Fomento da bolsa (quando aplicável): CNPq



## Study of *Schistosoma mansoni* EB1 protein as a potential regulator for the calcium channel CRAC

Thais Rangel Figueiredo, Ana Eliza Zeraik

Helminth parasites are responsible for diseases that affect one billion people in the world, such as schistosoma that is the causative agent of schistosomiasis. Humans are definitive hosts of six species of schistosoma, which are mainly differentiated by their intermediate hosts and their geographical location. Among these the three main ones are: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. In the American continent the main cause of schistosomiasis is the species *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis has only one commercialized drug, praziquantel, which acts to destabilize calcium homeostasis in adult worms, thus highlighting the potential of calcium channel proteins as targets for future interventions. The CRAC (Calcium release-activated channels) channel of *S. mansoni* was previously characterized and constitutive calcium entry was observed when this channel was expressed in mammalian cells. The goal of the present project is to study the EB1 protein of *S. mansoni* (SmEB1), since the human orthologous protein has already been described as a regulator of the human CRAC channel and we aim, therefore, to evaluate whether SmEB1 is a determining factor for the constitutive  $\text{Ca}^{2+}$  entry observed. The project aims to clone SmEB1 into the pTagBFP-C expression vector. For this, the sequence corresponding to the SmEB1 protein will be amplified by PCR (polymerase chain reaction) using primers specific to this sequence and adult worms cDNA as template. The resulting insert will be inserted into the vector using restriction enzymes. The clone will be used for transfection of HEK293 cells. After transfection, the subcellular location of SmEB1 will be evaluated through confocal microscopy. The cells will contain, in addition to SmEB1 fused to a blue fluorescent protein (BFP), two proteins that constitute the CRAC channel: SmORAI (fused to mCherry) and SmSTIM (fused to GFP). The three proteins coexpressed with fluorescent fusion proteins in different regions of the visible spectrum will be evaluated for colocalization. The calcium influx in the transfected cells will also be measured to assess the role of SmEB1 in the constitutive intake of  $\text{Ca}^{2+}$  using the Fluo-4 indicator. At the end of the work, we aim to assess whether SmEB1 is an important factor in the regulation of the CRAC calcium channel of *S. mansoni* and thus obtain a better understanding of the differences in the functioning mechanism between human and schistosoma calcium channels and to identify new potential proteins that regulate their activity.

Instituição do Programa de IC, IT ou PG: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Fomento da bolsa (quando aplicável): CNPq