

Verificação da presença e da expressão de genes codificadores de proteínas ligantes de cálcio em tripanossomatídeos

Vitor Eiji Justus Sakaguti

Nº USP: 5127779

Curso de Ciências Moleculares, Universidade de São Paulo

Laboratório de Biologia Molecular

vitor@cecm.usp.br

Prof. Lucile Maria Floeter-Winter

20 de setembro de 2005

Resumo

Algumas espécies de tripanossomatídeos possuem proteínas flagelares ligantes de cálcio altamente conservadas, chamadas calflaginas. Tais proteínas são encontradas somente em organismos patogênicos, o que indica uma possível relação entre sua presença e a patogenicidade das espécies. Na mesma família há um gênero sabidamente não patogênico - a saber, Crithidia. O trabalho doravante descrito objetivava verificar a presença e expressão de genes codificadores de calflaginas semelhantes em Crithidia e também em Leishmania (Viannia) braziliensis, espécie patogênica.

1 Introdução

As zonas tropicais e intertropicais são assombradas por doenças tais como o mal de Chagas, a doença do sono e leishmanioses. Essas doenças são causadas por protozoários parasitas da família *Trypanosomatidae*, cujos organismos têm a peculiar característica de possuir apenas uma mitocôndria, com DNA abundante e chamada de cinetoplasto. Essa família parasita inúmeras espécies de mamíferos, inclusive o homem, assim causando as doenças citadas e outras.

Uma vez que essas doenças frequentemente se tornam crônicas quando adquiridas, um método de diagnóstico pré-sintomático se faz mais desejável. O método ELISA pode ser usado para diagnosticar infecções desse tipo a partir de soro dos pacientes, mas para haver especificidade, e portanto credibilidade do resultado, é preciso identificar uma proteína expressa exclusivamente por patógenos.

Uma família de proteínas ligantes de cálcio, as calflaginas, oferece candidatas a proteínas acusadoras de infecção. Genes homólogos ao que codifica calflagina em *Trypanosoma cruzi* foram encontrados em *Leishmania (Leishmania) major*, *Trypanosoma freitasi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma conorhini*. Tomando essas espécies como referência, esse gene se mostra deveras conservado na família, levando a crer que o produto de sua expressão exerce uma função fundamental e comum a todos os membros da família. No entanto, todos esses organismos são patogênicos, o que sugere uma possível relação entre sua patogenicidade e a presença da proteína.

Tensionando desvendar o real papel das calflaginas nas células, confirmar as suspeitas apresentadas a seu respeito e produzir avanços em novas técnicas de diagnóstico, investigamos a presença e expressão de genes que codificam calflaginas simi-

lares em *Crithidia fasciculata*, *Crithidia deanei* e *Leishmania (Leishmania) braziliensis*.

2 Descrição Experimental

Os protocolos de todos os procedimentos experimentais aqui mencionados são encontrados na apostila do curso[1].

As amostras que utilizamos foram culturas de *Crithidia fasciculata* e *Crithidia deanei*, das quais extraímos RNA e DNA totais. Posteriormente viemos a utilizar, para controle, RNA de *Trypanosoma cruzi* e DNA genômico de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) major* e, como amostra, *Leishmania (Viannia) braziliensis* - todos gentilmente preparados e cedidos pela equipe do laboratório.

Fizemos PCR dos DNA's de *Crithidia fasciculata*, *Crithidia deanei*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) major* a partir dos seguintes primers:

5' CATCGAGCTTTTCAAGAAGT^{3'}

5' CATCAGCCGAAACTCAAGA^{3'}

Desse PCR fizemos um *southern blot*. Insetamos os produtos de *Leishmania* em plasmídeos pGEM que seriam usados para transformar *Escherichia coli* DH5 α . Depois de selecionados os clones, extraímos os plasmídeos por miniprep e os mandamos para seqüenciamento.

Foi feito um *southern blot*, usando sondas produzidas pelo laboratório a partir de DNA de *Trypanosoma cruzi*, com DNA's genômicos digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SacI*. Efetuamos também um *northern blot* do RNA extraído.

3 Resultados e Discussão

3.1 PCR

No procedimento de PCR, *Leishmania major* foi usada como controle positivo, uma vez que esses organismos sabidamente têm o gene. Escolhemos primers com seqüências de bases assaz conservadas nos genes codificadores de calflaginas conhe-

cidos. Suas temperaturas ideais de associação¹ são iguais a 48°C, por isso fizemos PCR de cada preparação às temperaturas 45°C e 51°C nas etapas de associação dos 30 ciclos do PCR, conseguindo assim um bom controle da eficiência e especificidade das associações.

Ao fim do procedimento, no entanto, descobrimos que as reações não aconteceram em algumas amostras, o que nos impediria de tirar conclusões frente aos nossos objetivos. Essa é a razão pela qual repetimos o experimento, que infelizmente teve qualidade desanimadoramente próxima à do primeiro, de forma que alguns resultados ficaram prejudicados, como será comentado em observações vindouras. A causa da ineficiência das reações pode ser meramente operacional, mas é possível que houvesse DNA demais nas amostras, fazendo com que acontecesse competição das moléculas de DNA pelos primers.



Figura 1: Produtos de PCR em diferentes temperaturas marcados com brometo de etídio em gel de agarose. Canaletas 1 e 14 - padrão de peso molecular fago λ digerido com *HindIII*. 2 - 45°C *L. amazonensis*; 3 - 45°C *C. fasciculata*; 5 - 51°C *L. amazonensis*; 6 - 51°C *C. fasciculata*; 8 - 51°C *L. major*; 9 - 51°C *C. deanei*; 11 - 45°C *L. major*; 12 - 45°C *C. deanei*; 4, 7, 10 e 13 - controles negativos.

No primeiro PCR conseguimos tênues bandas nas canaletas 6 e 9, *Crithidia fasciculata* e *Crithidia deanei*, respectivamente, mas julgamos tal conquista insuficiente para a continuidade do trabalho. Após o fracasso da segunda tentativa, decidimos

¹segundo a fórmula $T_{emp} = 2(A + T) + 4(G + C)$

usar a amplificação de *Leishmania major* para produzir uma sonda pois, apesar de a amplificação do DNA de *Chritidia* não ter ocorrido, a amplificação de alguns controles positivos foi mais intensa no segundo PCR. A sonda assim feita foi usada para um *Southern blot* desse gel (o do PCR) e para dois *blots* posteriores. A canaleta 12, *Chritidia deanei*, mostra uma amplificação inespecífica, o que indica que houve competitividade das associações, como já comentado, e não nos permite concluir nada a respeito da presença do gene procurado. A canaleta 2, *Leishmania amazonensis* (controle), mostra uma banda de cerca de 23,1 kb, o que provavelmente é DNA genômico, e a canaleta 3, *Chritidia fasciculata*, não mostra nada, mas esse resultado também é inconclusivo, uma vez que o controle não foi amplificado. As canaletas 5 e 8, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major* (ambas controles positivos), apresentam amplificação razoável de um fragmento com o peso esperado e de outro fragmento, com peso de cerca de 2Kb, que reflete a alta frequência de repetição de genes na família em questão. A canaleta 11, *Leishmania major* (controle positivo), apresenta, além de bandas de DNA genômico, forte amplificação do fragmento de peso esperado, mas não apresenta a banda adicional encontrada na canaleta 8, o que é contraditório, e precisamos estudar melhor a espécie para elucidar o fato. As canaletas 4, 7, 10 e 13 (controles negativos usando água) não apresentaram amplificação alguma, como esperado.

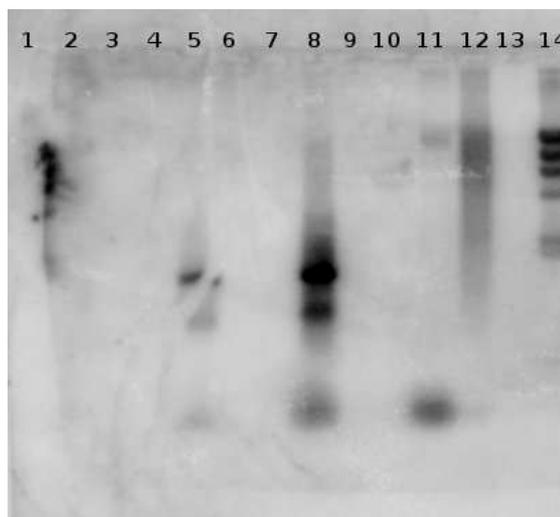


Figura 2: Membrana do southern blot do segundo PCR. 1 e 14 correspondem ao padrão de peso molecular (extrato de DNA total de fago λ digerido com Hind III). 2 - 45°C *L. amazonensis*; 3 - 45°C *C. fasciculata*; 5 - 51°C *L. amazonensis*; 6 - 51°C *C. fasciculata*; 8 - 51°C *L. major*; 9 - 51°C *C. deanei*; 11 - 45°C *L. major*; 12 - 45°C *C. deanei*; 4, 7, 10 e 13 - controles negativos.

Na expectativa de encontrar bandas não visíveis no gel de agarose, resolvemos executar um *Southern blot* do gel, uma vez que tal técnica é mais sensível. Os resultados desse procedimento, no entanto, vieram apenas ratificar os resultados anteriores.

3.2 Southern blot

Uma outra forma que usamos para detectar o gene foi o *Southern blot* dos DNA's genômicos, que foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoR1* e *Sac1*, com o intuito de montar um mapa de restrição, caso o gene fosse encontrado.

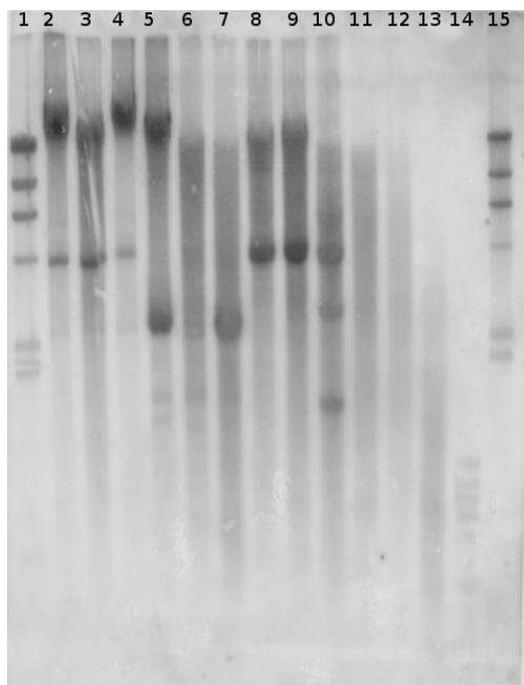


Figura 3: Membrana do southern blot de DNA genômico. p1 corresponde ao padrão de peso molecular (extrato de DNA total de fago *lambda* digerido com Hind III), as bandas correspondem a (de cima para baixo): 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 e 125bp. 1 corresponde às amostras digeridas com EcoRI. 2 corresponde às amostras digeridas com SacI. 3 corresponde às amostras digeridas com EcoRI e SacI. p2 corresponde a um padrão de no máximo 100bp. C.f. corresponde a *Crithidia fasciculata*. C.d. corresponde a *Crithidia deanei*. L.b. corresponde a *Leishmania braziliensis*. L.a. corresponde a *Leishmania amazonensis*.

Ambas as canaletas de *Crithidia fasciculata* apresentam bandas de aproximadamente 22Kb e 5,8Kb, o que indica que o tamanho dos fragmentos detectados é muito próximo, ou seja, a distância entre os sítios de uma enzima é parecida com a distância entre os sítios da outra, e que provavelmente os sítios de restrição das duas enzimas pouco distam, fazendo com que os fragmentos de digestão dupla não sejam visualizados.

Na canaleta de *Leishmania amazonensis* digerida com *SacI* observamos apenas um arraste, que também está presente na canaleta da digestão dupla, fazendo com que ambos os resultados sejam inconclusivos, apesar de a última apresentar uma banda de mesmo peso que uma das bandas encontradas na canaleta da digestão com *EcoRI* - 3,5Kb. Além dessa banda, a digestão com *EcoRI* apresenta outra com cerca de 21Kb. Podemos afirmar, pois, que *Leishmania amazonensis* muito provavelmente possui o gene, uma vez que houve hibridação.

dação.

As digestões de *Crithidia deanei* com cada uma das enzimas separadas deram resultados muito parecidos com os de *Crithidia fasciculata*, mas a digestão dupla apresenta uma banda de 3,5Kb, uma de 5,8Kb e outra de 0,5Kb a 2Kb, o que nos leva a crer que possa haver repetição do gene, característica comum na família, como já citado, e que os sítios de restrição sejam próximos.

As canaletas de *Leishmania braziliensis* não apresentam bandas, ou seja, não houve hibridação, o que sugere que essa espécie não possua o gene procurado.

3.3 Northern blot

Visando verificar a expressão do gene, caso sua presença fosse confirmada, executamos o delicado procedimento de *northern blot* do RNA total extraído. Uma vez que essa molécula é altamente instável, antes da transferência coramos o gel com azul de metileno para, nesse ponto, verificar a eficácia do procedimento.

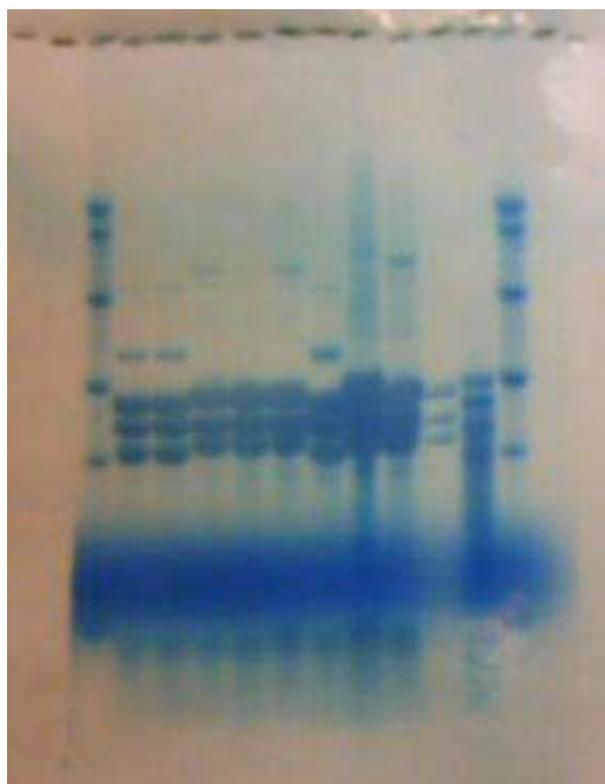


Figura 4: Gel de northern blot corado com azul de metileno. P corresponde ao padrão de peso molecular (Invitrogen), as bandas correspondem a (de baixo para cima): 0.24, 1.35, 2.37, 4.40, 7.46 e 9.4 Kb. 1 e 2 correspondem às amostras de RNA total de *Crithidia fasciculata*. 3 e 4 correspondem às amostras de RNA total de *Crithidia deanei*. C.f. corresponde a *Crithidia fasciculata*. C.d. corresponde a *Crithidia deanei*. L.b. corresponde a *Leishmania brasiliensis*. L.a. corresponde a *Leishmania amazonensis*. T.c. a *Trypanosoma cruzi*, controle positivo do experimento. Na canaleta sem identificação não foi aplicada nenhuma amostra e o observado deve-se a transferências na etapa de pipetagem das amostras nos poços do gel.

O gel corado mostra resultados animadores, apesar de algum arraste indicando degradação nas canaletas de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*, uma vez que todas as canaletas apresentaram bandas características de RNA ribossômico de tripanossomatídeos, com três pesos moleculares diferentes. As canaletas de *Crithidia deanei* apresentam bandas adicionais, com pesos moleculares de RNA's ribossômicos mais comuns, que correspondem ao RNA ribossômico de uma bactéria simbiote dessa espécie.



Figura 5: Membrana de northern blot corado com azul de metileno. P corresponde ao padrão de peso molecular (Invitrogen), as bandas correspondem a (de baixo para cima): 0.24, 1.35, 2.37, 4.40, 7.46 e 9.4 Kb. 1 e 2 correspondem às amostras de RNA total de *Crithidia fasciculata*. 3 e 4 correspondem às amostras de RNA total de *Crithidia deanei*. C.f. corresponde a *Crithidia fasciculata*. C.d. corresponde a *Crithidia deanei*. L.b. corresponde a *Leishmania brasiliensis*. L.a. corresponde a *Leishmania amazonensis*. T.c. a *Trypanosoma cruzi*, controle positivo do experimento. Na canaleta sem identificação não foi aplicada nenhuma amostra e o observado deve-se a transferências na etapa de pipetagem das amostras nos poços do gel.

A frustrante revelação da membrana do *northern blot* não apresentou resultado algum, nem mesmo do controle positivo (*Trypanosoma cruzi*), indicando que houve falha grave no procedimento, muito provavelmente na hibridação, uma vez que o gel mostrou resultados positivos.

3.4 Transformação bacteriana e seqüenciamento

Usamos os produtos dos controles do já descrito PCR para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5 α , uma vez que foram os únicos fragmentos

com amplificação satisfatória. Nesse ponto, nossos objetivos já haviam sido mudados, devido aos inesperados contratemplos encontrados ao longo do trabalho, e tensionávamos então, devido ao resultado obtido no *southern blot* do DNA genômico, confirmar a presença do gene de calflagina em *Leishmania amazonensis*, sendo esta então promovida de controle a amostra.

Com o intuito de verificar a viabilidade das bactérias, fizemos uma cultura controle sem pressão de seleção, ou seja, anitibiótico ampicilina. O crescimento dessas culturas indicou que não havia problemas quanto a essa parte do experimento.

Para verificar a competência das bactérias, transformamos colônias com o vetor pUC, que contém o gene codificador de β -Galactosidase, assim como pGEM. Essas colônias tiveram o crescimento esperado, com coloração azul, mostrando que também nesse ponto o experimento estava livre de falhas.

É possível que alguns vetores estejam fechados e não recebam o fragmento, para verificar a significância desses vetores em relação aos outros, cultivamos também colônias sem inserir os fragmentos e com pressão de seleção, impedindo que crescessem colônias com plasmídeos abertos. Nessa cultura cresceu apenas uma colônia, um resultado que pode ser considerado muito bom, no sentido de que são poucos os plasmídeos fechados antes das ligações.

Outra falha possível aconteceria se as bactérias tivessem resistência natural ao antibiótico, independente do vetor, o que nos faria perder a certeza de cultivar apenas colônias que contivessem os vetores. Para nos assegurar de que isso não aconteceria, cultivamos bactérias não transformadas com plasmídeo algum e sob pressão de seleção. As colônias não cresceram, sendo esse um resultado positivo, no sentido de que as bactérias só formarão colônias se contiverem os vetores.

Mais um ponto passível de erro é a reação de ligação dos fragmentos aos plasmídeos, e outra falha grave aconteceria se nossos fragmentos prejudicassem a reprodução das bactérias. Para nos garantir que a reação realmente aconteceu e que os fragmentos não impedem a reprodução, cultivamos bactérias com fragmentos aleatórios nas mes-

mas condições que as bactérias que carregavam nossas amostras. Essa cultura produziu apenas três colônias, resultado que indica que as ligações não ocorreram em grande escala, possivelmente porque a enzima ligase não estava adequada.

Finalmente, o último controle que fizemos foi uma cultura sem ligase, com o intuito de verificar se os plasmídeos não se fechavam sem a presença dessa, o que seria equivalente ao caso de os plasmídeos nunca terem sido abertos. Não houve crescimento de colônias, como esperávamos, portanto os plasmídeos não se fechavam.

Ao extraírmos os plasmídeos, fizemos digestões com a enzima de restrição *EcoRI* e eletroforese das amostras assim obtidas para novamente verificar se os fragmentos foram de fato inseridos.

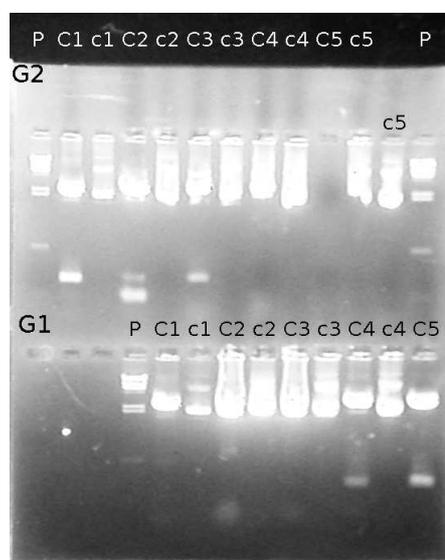


Figura 6: Fracionamento em gel de agarose do plasmídeo purificado digerido (ou não) com *EcoRI* λ digerido com *Hind III*. G2 corresponde a plasmídeos que supostamente contém insertos correspondentes a *L. amazonensis* e G1 a plasmídeos que supostamente contém insertos correspondentes a *L. major*. A letra "c" maiúscula indica que o plasmídeo foi digerido com *EcoRI* e minúscula indica que o plasmídeo não foi digerido. O índice c5 localizado na parte superior da figura indica uma amostra de *L. major* transferida devido a falta de espaço na parte inferior do gel.

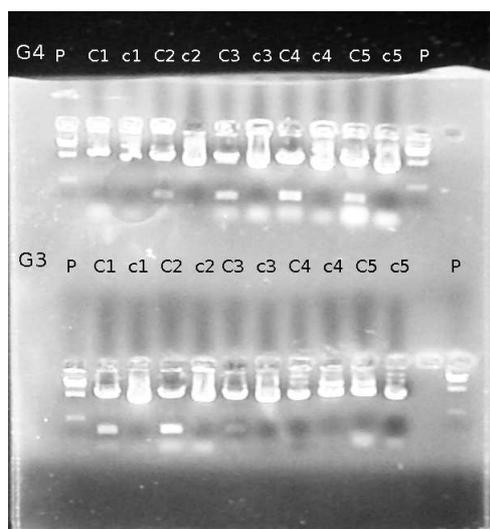


Figura 7: Fracionamento em gel de agarose do plasmídeo purificado digerido (ou não) com EcoRI λ digerido com Hind III. G3 - 1, 2 e 3: inserto correspondente a *L. amazonensis*. G3 - 4 e 5: inserto correspondente a *L. major*. G4 - 1: inserto correspondente a *L. major*. G4 - 2, 3, 4, e 5: inserto correspondente a *L. amazonensis*. A letra "c" maiúscula indica que o plasmídeo foi digerido com EcoRI e minúscula indica que o plasmídeo não foi digerido.

Selecionamos algumas bandas do gel onde julgávamos que deveria haver fragmentos para fazer o sequenciamento, mas este infelizmente funcionou apenas para duas amostras: uma de colônia azul, que deveria conter fragmento de *Leishmania major*, mas o vetor nela inserido provavelmente viera fechado já antes da ligação com os fragmentos, de forma que aquela colônia não os continha; o outro sequenciamento bem sucedido continha fragmento de *Leishmania amazonensis*, que no sequenciamento mostrou ser o homólogo ao gene codificador de calflagina.

4 Conclusões

Do trabalho até aqui descrito podemos concluir que há uma alta probabilidade de a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* não possui um gene homólogo aos genes codificantes de calflagina conhecidos. Concluimos também que *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pode possuir tal gene.

Não obstante, para resultados mais críveis, é imprescindível a repetição dos experimentos.

Referências

- [1] Lucile Maria Floeter-Winter. Apostila do Curso de Biologia Molecular - CCM0115. 2005
- [2] Rosa A. Maldonado, Jutta Linss, Neide Thomaz, Cheryl L. Olson, David M. Engman and Samuel Goldenberg. Homologues of the 24-kDa Flagellar Ca²⁺-Binding Protein Gene of *Trypanosoma cruzi* Are Present in Other Members of the Trypanosomatidae Family, *Experimental Parasitology*. 1997;86:200-205
- [3] Lisa M. Godsel and David M. Engman. Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism, *The EMBO Journal* 1999;18:2057-2065
- [4] Betina M. Porcel, Esteban J. Bontempi, Jan Henriksson, Maria Rydaker, Lena Aslund, Elsa L. Segura, Ulf Petersson and Andrés M. Ruiz. *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*: Molecular Characterization of Genes Encoding Putative Calcium-Binding Proteins, Highly Conserved in Trypanosomatids, *Experimental Parasitology*, 1996;84:387-399
- [5] Marcipar IS, Roodveldt C, Corradi G, Cabeza ML, Brito MEF, Floeter-Winter LM, Marcipar AJ, and Silber AM, Improvement of *Trypanosoma cruzi* diagnosis routine for Chaga's disease by using the full-length recombinant calflagin and its C-fragment
- [6] Pinto APA, Campana PT, Beltramini LM, Silber AM, Araújo APU. Structural characterization of a recombinant flagellar calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi*