

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
CURSO DE CIÊNCIAS MOLECULARES

**RELATÓRIO PARCIAL DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA (Interno)
Bolsa PIBIC_2009_2010**

Período parcial: Fevereiro 2010 a Abril 2010

ALUNO: Rafael Lemes Beirigo
Nº USP: 6481760
E-MAIL DO ALUNO: rafaelbeirigo@usp.br

TÍTULO DO PROJETO: Identificação e clonagem dos genes que codificam proteínas de membrana translocadoras de fosfatidilserina em *Leishmania*

PROF. ORIENTADOR : Prof^ª Dr^a Lucile Maria Floeter-Winter
E-MAIL DO ORIENTADOR: lucile@ib.usp.br
UNIDADE: IB
DEPTO: Fisiologia
FONE: 3091-7503

Resumo

A fosfatidilserina (PS), ao ser exposta na face externa da membrana plasmática, tem um papel funcional importante na remoção de células em apoptose pelo macrófago sem a instalação do processo inflamatório. Neste projeto pretende-se determinar o papel funcional da PS na invasão e inativação dos macrófagos por *Leishmania*. Esforços iniciais de se obter um organismo nocaute para a síntese de fosfatidilserina não resultaram no mutante esperado, demonstrando ser a via essencial para o parasita. Para atingir o objetivo do projeto, serão identificadas as enzimas envolvidas no transporte de PS através da membrana do parasita. Os genes serão então caracterizados quanto à sua expressão, nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita, buscando-se responder a questão: há expressão diferencial dos genes durante a metaciclogênese, explicando um aumento de translocação da fosfatidilserina? Essa identificação permitirá a clonagem dos fragmentos gênicos que codificam as enzimas translocadoras de fosfatidilserina numa estratégia que torna possível a realização de testes que permitirão verificar se o gene clonado é responsável pela atividade de flogose de leishmânia.

Introdução

Os organismos do gênero *Leishmania*, identificados inicialmente por Ross (Ross, 1903 apud (Rey 2001)), pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. São parasitas que apresentam dois hospedeiros obrigatórios, sendo o ciclo de vida desenvolvido em um inseto (flebotomíneo) e um mamífero. No hospedeiro mamífero, é parasita obrigatório de macrófagos. Nessa célula, encontra-se a forma amastigota, células redondas e sem flagelo aparente, contidas em vacúolos digestivos, ou fagossomos. O ciclo natural do parasito não inclui o homem, esse aparece como um hospedeiro acidental após ser picado pelo inseto vetor, e pode desenvolver diferentes patologias, genericamente denominadas leishmanioses.

No inseto, encontram-se as formas promastigotas, alongadas, de aspecto fusiforme e flageladas que quando em grande número se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas e invadem porções anteriores do esôfago e proventrículo do mosquito. No repasto sanguíneo desse mosquito, são inoculadas no novo hospedeiro mamífero, sendo fagocitadas por macrófagos residentes e diferenciam-se em formas amastigota (Rey 2001)

Os macrófagos são células de defesa dos mamíferos que se originam a partir de monócitos que migram da corrente sanguínea para diferentes tecidos e em conjunto com os monócitos constituem o sistema de fagócitos profissionais do corpo. Essas células contêm lisossomos especializados que se fundem às vesículas fagocíticas recém formadas, expondo o microorganismo fagocitado a um complexo de hidrolases e a um conjunto de moléculas altamente reativas que são produzidas enzimaticamente, como peróxido de hidrogênio, hipoclorito e óxido nítrico. Organismos do gênero *Leishmania* são capazes de evitar a atividade microbicida dos macrófagos e se estabelecerem como parasitas intracelulares dessas células. Além do papel no combate a microorganismos invasores, os macrófagos também atuam na remoção de células que entraram em processo de morte celular, seja por necrose ou apoptose. No caso de células em apoptose, o fagócito é capaz de reconhecer sinais apresentados na superfície de suas membranas plasmáticas, distinguindo-as das células ainda viáveis, e removendo-as sem serem ativados e sem o recrutamento de novos fagócitos (Fadok *et al.* 2001).

Um dos sinais reconhecido pelos fagócitos em células em apoptose é a passagem da fosfatidilserina (PS), normalmente encontrada exclusivamente na face interna da membrana plasmática, para a face externa (Wu *et al.* 2006), sendo esse um dos primeiros eventos da morte celular programada (Fadok *et al.* 2001). O reconhecimento de moléculas de PS na superfície de células em apoptose leva a uma desativação do fagócito, caracterizado pela expressão das citocinas antiinflamatórias como TGF- β e IL-10, e inibição da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α (Fadok *et al.* 2001).

Foi mostrado que amastigotas de *L.(Leishmania) amazonensis* expõem fosfatidilserina assim como as células em apoptose (de Freitas Balanco *et al.* 2001). Foi mostrado também que quando as células eram previamente tratadas com anexina-V, que se liga especificamente a fosfatidilserina, a virulência das leishmânias era reduzida em mais de 50% e não era observada a produção de TGF- β 1 e IL-10 pelos macrófagos. Os autores propuseram que esse seria um mecanismo de mimetismo de células em apoptose que as leishmânias utilizariam para poder invadir os macrófagos sem ativá-los (de Freitas Balanco *et al.* 2001).

A movimentação de fosfolipídios entre as faces da membrana plasmática está relacionada a três atividades enzimáticas descritas: flipases, flopases e escramblases. A atividade de flipases é responsável pela passagem de fosfolipídios da face externa para a interna da membrana plasmática. As translocases descritas em mamíferos com essa

atividade possuem uma alta especificidade para fosfatidilserina ou um grupo restrito de fosfolipídios (Daleke & Lyles 2000). A atividade de flopases é responsável pelo deslocamento de fosfolipídios da face interna para a externa da membrana plasmática. Essas translocases normalmente possuem uma especificidade menor do que as flipases, com proteínas individuais translocando uma variedade maior de fosfolipídeos. Em leishmânia, existe um membro dessa família que foi apontado como envolvido no tráfego de fosfolipídios (Araujo-Santos *et al.* 2005).

Tendo em vista as informações acima, o presente projeto tem por objetivo identificar e clonar os genes que codificam as principais proteínas translocadoras de fosfolipídeos, utilizadas pelos parasitas para a exposição de fosfatidilserina na face externa de sua membrana plasmática.

Materiais e Métodos

Organismos

Leishmania (Leishmania) amazonensis MHOM/BR/1973/M2269

Promastigotas foram cultivadas a 25 °C em 10 ml de meio 199 (Sigma) e a cultura foi repicada a cada 4/5 dias, conforme descrito por Kapler *et al.*, 1990 (Kapler *et al.* 1990).

Escherichia coli DH5 α : *supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*

A bactéria foi cultivada em meio LB (solução aquosa de: triptona - 10 g/L, extrato de levedura – 5 g/L - e cloreto de sódio - 10 g/L) a 37 °C em constante agitação ou mantida a 4 °C em placas de LB/ágar (1,8%).

Extração de DNA de culturas bacterianas em pequena escala (“mini prep”)

Uma colônia bacteriana transformada foi inoculada em 3 ml de meio LB com ampicilina (solução aquosa com: triptona a 10 g/l, extrato de levedura a 5 g/l, NaCl a 10 g/l e ampicilina a 100mg/l), por 18 horas. As células foram colhidas por centrifugação (20 segundos a 14800 x g) em tubo para microcentrífuga de 1,5ml e ressuspensas no

vórtice em 300 µl de solução 1 (100µg/ml RNase, 50 mM tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Adicionou-se então 300 µl de solução 2 (0,2 M de hidróxido de Sódio e 1% de dodecil sulfato de sódio) e misturou-se através de cinco inversões do tubo. Incubou-se 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente adicionou-se mais 300 µl de solução 3 (Acetato de potássio 3M) e misturou-se através de cinco inversões do tubo.

Após este tratamento os tubos foram centrifugados a 14800xg por 10 minutos a 4°C (Sorvall RMC 14 – DuPont). O sobrenadante foi recuperado, sem o precipitado. Este procedimento foi então repetido.

Acrescentou-se 400µl de isopropanol e em seguida centrifugou-se os tubos a 14800xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, e no tubo colocado 600µl de etanol 70%, sem ressuspender o precipitado. Os tubos foram centrifugados a 14800xg por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco a temperatura ambiente. Depois de seco, o precipitado foi ressuspensão em 50µl de água.

Extração de DNA de culturas bacterianas em grande quantidade

A extração de DNA de bactéria em grande quantidade foi feita seguindo o protocolo descrito anteriormente (Sambrook 1989).

Preparação de bactérias competentes

Células DH5-α foram preparadas com cloreto de cálcio, conforme descrito por Sambrook *et al*, 1989.

Transformação de células bacterianas com DNA

Células DH5-α competentes foram transformadas por choque térmico a 42 °C, conforme descrito por Sambrook *et al*, 1989.

Digestão de DNA com enzimas de restrição

Amostras de DNA foram digeridas utilizando-se de enzimas de restrição em tampão de reação fornecido pelo fabricante (Fermentas) para volumes finais de 10 µl a 100 µl de reação. A digestão foi feita por 1 a 16 horas a temperatura de 37 °C

Eletroforese de DNA

Em cada aplicação de DNA em gel de agarose foi adicionado 1/10 do volume de tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol FF; 15% Ficoll – tipo 400, Pharmacia). O DNA digerido era aplicado em gel 1% (1% de agarose em relação de massa, 1X TAE – 40mM Tris-acetato e 1mM EDTA - e 2,5µg/l de brometo de etídio) para fragmentos fracionados entre 400 pb e 20000 pb. A eletroforese ocorreu em TAE 1X, onde aplicou-se uma diferença de potencial de 7,7 Volts/cm por tempo suficiente para que o corante bromofenol migrasse 2/3 do comprimento do gel. A visualização era então feita através da incidência de luz ultra-violeta no gel, posto que moléculas de DNA dupla fita intercaladas por brometo de etídio alteram o comprimento de onda incidido, e registradas utilizando máquina fotográfica digital (Kodak, EasyShare C743).

Purificação de fragmento de DNA de gel de agarose.

Fragmentos de DNA eram purificados utilizando kit específico para essa finalidade (Qiagen, QIAquick Gel Extraction Kit).

Transfecção de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio M199 sem adição de phenol red e bicarbonato de cálcio (Invitrogen) no mesmo volume e contadas.

Para a contagem das células, 50µl da suspensão foi diluída com 950µl de PBS com 1% formaldeído, e colocada em uma câmara de Neubauer e contadas em microscópio.

Após a contagem e estimativa da quantidade de células, estas foram novamente colhidas por centrifugação. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em um volume de M199 para concentração final de 2×10^8 células/ml. As células (500µl da suspensão) foram colocadas na cubeta de eletroporação de 0,4 mm juntamente com o volume de DNA necessário para 10µg de DNA e a cubeta foi mantida no gelo por 10 minutos. Aplicou-se dois choques com intervalo de 10 s de 25µF e de 2500V. As células foram, então, colocadas em 10ml de meio de cultura M199 sem

antibiótico. Higromicina foi adicionada após 24 horas a uma concentração final de 20µg/ml ou selecionadas em meio semi-sólido com a mesma concentração de droga.

Extração de DNA de promastigotas (protocolo adaptado de Uliana e col, 1991 (Uliana *et al.* 1991))

Promastigotas de fase estacionária foram coletados por centrifugação à 3000xg por 10 minutos a temperatura ambiente, lavados uma vez com PBS 1X (cloreto de sódio 150mM e mono-hidrogenofosfato dissódico 50mM, pH 7.4) e ressuspensos em cloreto de sódio (150 mM). As células foram então lisadas em TES (Tris-HCl 150 mM, pH 7.5, EDTA 50 mM e 1% dodecilsulfato de sódio - SDS) a 65°C com agitação gentil. O lisado foi tratado com pronase (200mg/mL) a 45°C por 2 horas. Seguiu-se, então, uma extração orgânica com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e uma com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos, foi precipitada com etanol, seco e ressuspensão em água. Realizou-se um tratamento com Rnase A e proteinase K e o DNA precipitado foi submetido a novas extrações orgânicas, precipitado e ressuspensão em água (como anteriormente). Por fim a concentração e a pureza era determinada em espectrofotômetro (medidas as absorvâncias em 260, 280 e 320 nm).

Análise da exposição de PS pelas células em estudo

A análise da exposição de PS pelas células em estudo foi feita em aparelho de FACS-SCAN após tratamento com anexina-V ligada a FITC e iodeto de propídio, determinando-se a porcentagem de células íntegras às quais a anexina-V foi capaz de se ligar, como descrito anteriormente (de Freitas Balanco *et al.* 2001; Tripathi & Gupta 2003). Aproximadamente 5×10^6 células eram resuspensas em 1000 µL de tampão de ligação de anexina, e a 100 µL dessa suspensão era adicionado 0,4 µL de anexina-V conjugada a FITC e incubada a 10 °C por 20 minutos. Em seguida era adicionado iodeto de propídeo para uma concentração final de 10 µg/ml e as células analisadas em aparelho de FACS-SCAN (modelo Beckman Coulter FC 500 MPL).

Composição do tampão de ligação de anexina: 10mM Hepes (pH 7,4), 150mM NaCl, 1mM MgCl₂ e 1,8mM CaCl₂, esterilizado somente por filtração e mantido a 4 °C.

Resultados

Para se isolar o gene responsável pela atividade de flopase de fosfatidilserina, foram feitas transfecções de leishmânia com uma biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis* (Uliana *et al.* 1999), gentilmente cedida pela professora Silvia Uliana (ICB-USP). Após a transfecção, as células foram selecionadas em meio de cultura contendo o antibiótico higromicina, de forma a selecionar positivamente somente as células contendo o cosmídeo. Dentre essas células selecionadas algumas delas receberiam o gene responsável pela atividade de flopase de fosfatidilserina, fazendo com que elas tivessem esse gene superexpresso, deslocando o equilíbrio entre as atividades de flipase e flopase e fazendo com que a célula passasse a expor fosfatidilserina continuamente. As células com essa característica foram então isoladas utilizando-se “kits” para purificação de células em apoptose, que permitem separar células que expõem PS do restante da população.

Após proceder-se à seleção, foi realizada a extração de DNA total da cultura clonada. Esse material genético foi, então, utilizado para transformar bactérias. Nesse processo pode ser que ocorra tanto a entrada dos cosmídeos quanto do DNA genômico extraído das leishmânias. Como as bactérias foram cultivadas em meio contendo antibiótico ampicilina, somente seriam selecionadas as células que recebessem os cosmídeos, pois o gene responsável pela resistência à ampicilina está localizado nesses. Em seguida, foi realizada a extração dos cosmídeos dessas bactérias, que serão referenciados neste relatório pela nomenclatura *BibGenHygAmp* seguido de um sufixo que os discrimina. Para as culturas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas com os esses cosmídeos, será utilizado o prefixo “La”, seguido do cosmídeo utilizado na transfecção nomeado de acordo com a regra acima.

A análise desses cosmídeos por restrição em *Bam*HI apresentou dois padrões distintos, sendo que utilizamos um exemplar de cada padrão para transfecção de *L. (L.) amazonensis*, gerando as culturas *LaBibGenHygAmp01* e *LaBibGenHygAmp02*, que foram então submetidas ao processo de seleção e clonagem em triplicata em meio líquido.

Paralelamente, foi realizado o cultivo em duplicata de *L. (L.) amazonensis* contendo cosmídeo *shuttle* com marca de seleção para ampicilina e hygromicina, porém sem o trecho da biblioteca genômica (nomeado *HygAmp01*). Isso foi feito para que

podéssemos realizar a comparação entre a fluorescência de leishmânias transfectadas com os cosmídeos *BibGenHygAmp* e a fluorescência de leishmânias que haviam passado pelo processo de transfecção, mas em que o cosmídeo transfectado não possuiria o trecho originário do genoma de leishmânia.

Após crescerem por cinco dias em meio líquido, os mutantes foram analisados para a exposição de fosfatidilserina através de tratamento com anexina-V ligada a FITC, seguida de leitura em aparelho de FACS, na qual é esperada uma fluorescência proporcional à quantidade de fosfatidilserina presente na face externa da membrana, cujos resultados são apresentados na figura 1. A partir da análise dessa figura, podemos observar uma fluorescência diferencial para a *LaBibGenHygAmp01A*, como mostrado em (a), enquanto que as demais culturas apresentaram padrões de fluorescência compatíveis com os apresentados para as culturas *LaHygAmp01*.

Havíamos realizado, em experimento anterior a esse, a leitura em aparelho de FACS para as culturas *LaBibGenHygAmp01*, em que os resultados indicaram fluorescência diferencial para a *LaBibGenHygAmp01B*. Entretanto, esses resultados preliminares haviam sido obtidos sem o devido trabalho de filtragem de fluorescência devido a eventuais impurezas na amostra, que poderiam desencadear uma fluorescência diferencial mesmo na ausência de exposição diferencial de fosfatidilserina. Como esse trabalho de filtragem foi realizado para essa segunda leitura, esperamos dela uma maior acurácia. Entretanto, pretendemos realizar uma nova leitura em aparelho de FACS das amostras, para uma maior certeza.

Aliada a essa nova leitura, pretendemos realizar o ensaio de transporte de fosfatidilserina utilizando essas *L. (L.) amazonensis* transfectadas contra *L. (L.) amazonensis* selvagens, sendo esperada uma maior atividade da enzima nas transfectadas.

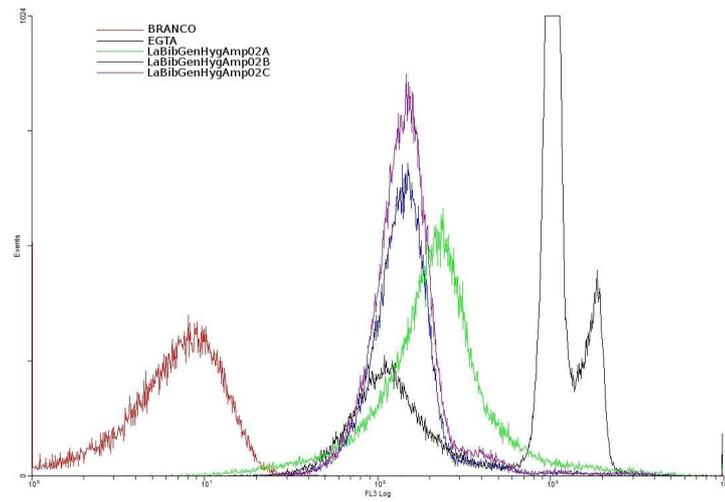
O DNA total de leishmânias obtido na purificação em coluna magnética foi utilizado para uma nova eletroporação de bactérias, que foram submetidas a seleção em meio sólido contendo ampicilina. Esperávamos uma seleção positiva somente para as bactérias que tivessem recebido o cosmídeo relativo à biblioteca genômica, dado que esse possui a fase aberta de leitura relativa ao gene de resistência a esse antibiótico.

Foi realizada a extração dos cosmídeos dessas bactérias, e esses foram submetidos a digestão pela enzima *Bam*HI, seguida de eletroforese em gel de agarose, que se encontra retratado na figura 2.

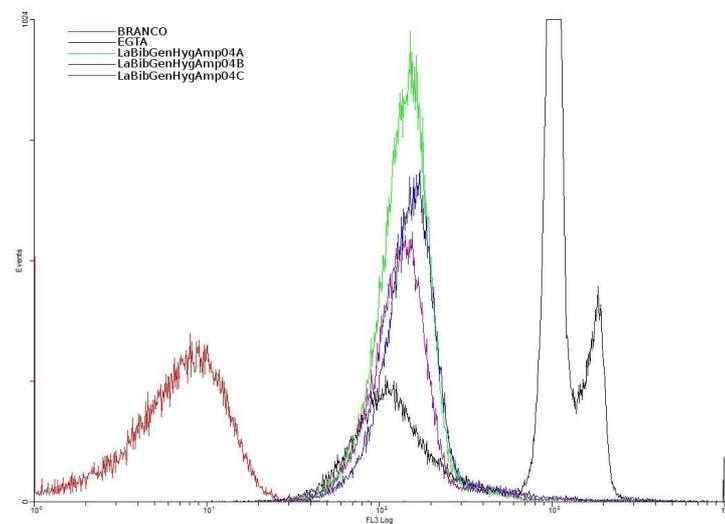
Podemos perceber uma presença relativamente significativa (9 das 24 digestões) do padrão de restrição em *Bam*HI que apresenta duas bandas, obtido para o cosmídeo *BibGenHygAmp01*, que apresentou fluorescência diferencial no experimento de leitura em aparelho de FACS (os cosmídeos com esse padrão de restrição em *Bam*HI serão agrupados na categoria *Fluorecs01*, e marcados em azul na figura). Esse resultado sugere uma seleção positiva na purificação por coluna magnética sobre os cosmídeos *Fluorecs01*. Isso poderia ser explicado pela presença do gene relativo à flofase nesse cosmídeo, que poderia desencadear uma superexpressão da flofase nas leishmânias transfectadas com ele, que teria uma exposição acentuada de fosfatidilserina, aumentando sua retenção no processo de purificação em coluna magnética.

Entretanto, a digestão em *Bam*HI não possui um potencial discriminatório eficiente para os demais cosmídeos (15 das 24 digestões), e, dessa forma, a seleção positiva mencionada acima poderia estar ocorrendo sobre esses 15 cosmídeos, ao invés dos 9 *Fluorecs01*. Para testar essa hipótese, realizaremos um mapa de restrição com enzimas diferentes para esses cosmídeos, no qual esperamos uma discriminação mais eficiente. A partir da análise dos padrões de restrição obtidos, pretendemos verificar quão significativa é a presença relativa dos cosmídeos da categoria *Fluorecs01* versus a presença relativa dos demais padrões de restrição, no qual esperamos a preponderância da categoria *Fluorecs01*, por causa do resultado da leitura em FACS apresentada pela *LaBibGenHygAmp01*, transfectada com um cosmídeo *Fluorecs01*.

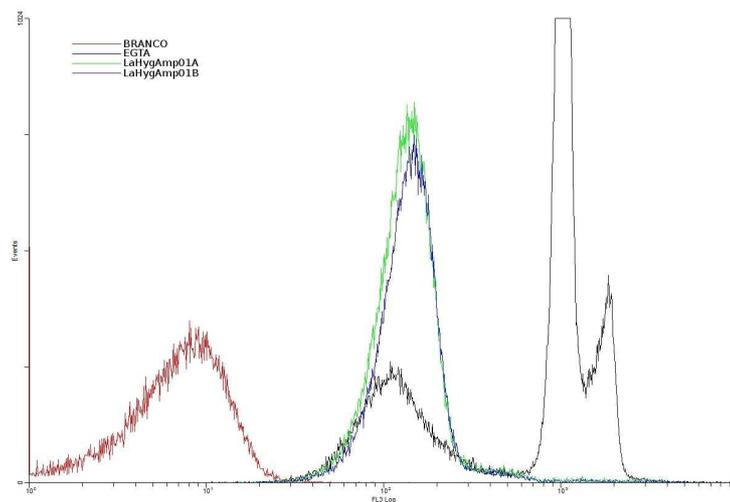
Caso haja uma presença relativa significativa de um outro padrão de restrição, realizaremos a análise para exposição de fosfatidilserina para o cosmídeo com esse padrão.



a)



b)



c)

Figura 1 - Espectro de leitura, em aparelho de FACS, de fluorescência para culturas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com Anexina-V associada a fluorófilo a) *LaBibGenHygAmp01*, b) *LaBibGenHygAmp02* e c). O controle “BRANCO” mostra a fluorescência das células não tratadas com Anexina-V associada a fluorófilo. O controle com EGTA se refere à especificidade da ligação da Anexina-V à molécula de fosfatidilserina.

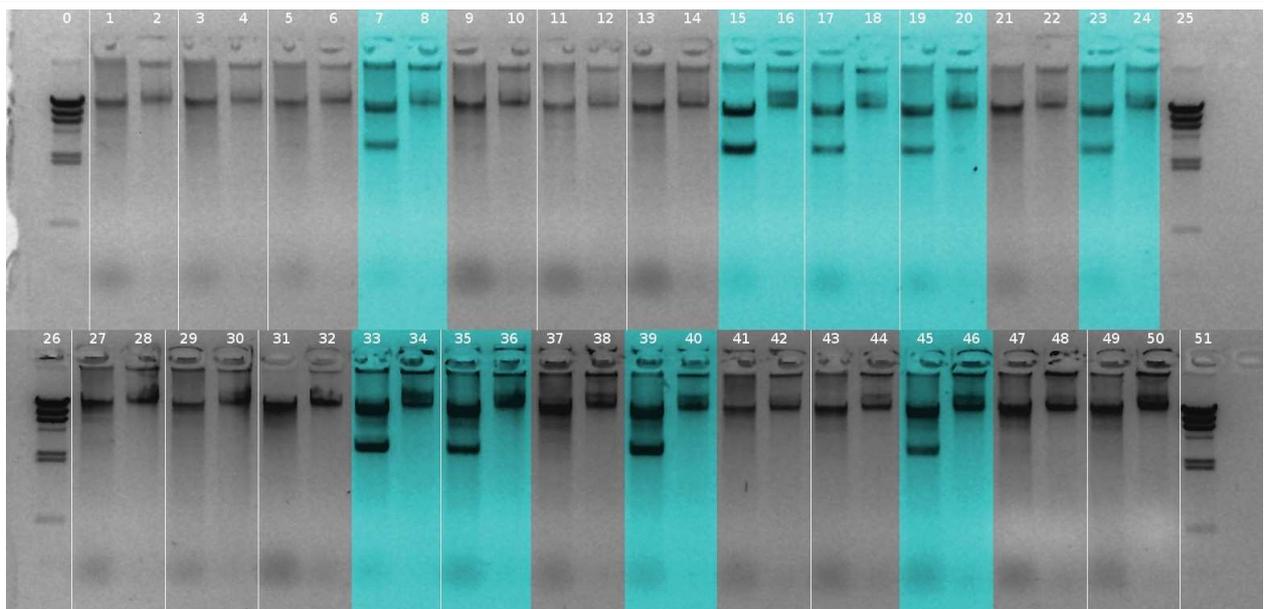


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Nas canaletas 0, 25, 26 e 51 foi aplicado o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *HindIII*. As demais canaletas correspondem aos cosmídeos *BibGenHygAmp*, aplicados aos pares, na ordem digerido seguido de não digerido. Os cosmídeos *Fluorecs01* foram marcados em azul.