

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

**RELATÓRIO PARCIAL DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA
Bolsa PIBIC_2009_2010**

Período parcial: Março 2010 a Julho 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 da enzima fosfatidilserina sintase, não foram bem sucedidos, sugerindo 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 metaciclo-gênese, explicando um aumento de translocação da fosfatidilserina? Essa identificação permitirá a clonagem dos fragmentos gênicos que codificam enzimas translocadoras de fosfatidilserina numa estratégia que torna possível a realização de testes para verificar se o gene clonado é responsável pela atividade de floparse 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 arredondadas e com flagelo reduzido ou não 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, diferenciando-se, então 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 ser ativado e sem que haja 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 majoritariamente 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 à não ativação do fagócito, mantendo a 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 da mesma maneira que 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 especialmente à 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 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.

No relatório anterior, foram apresentados experimentos relacionados à obtenção de cosmídeos potenciais possuidores de genes codificadores de proteínas translocadoras de PS em leishmânia, purificados a partir de um “pool” de cosmídeos representando uma biblioteca genômica de *L.(L.) amazonensis*.

Neste relatório, são apresentados os resultados de experimentos que visaram a um conhecimento mais aprofundado dos genes presentes nesses cosmídeos.

Materiais e Métodos

Foram utilizados os materiais e métodos listados no relatório anterior a este.

Resultados

Objetivando isolar o gene responsável pela atividade de floparse de fosfatidilserina, utilizou-se uma biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis* (Uliana *et al.* 1999), gentilmente cedida pela Profa. Silvia Uliana (ICB-USP) para a realização de transfecções de leishmânia. 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 floparse de fosfatidilserina, fazendo com que elas tivessem esse gene superexpresso, deslocando o equilíbrio entre as atividades de flipase e floparse 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 do clone selecionado. Esse material genético foi, então, utilizado para transformar bactérias. Como cosmídeos são veículos “shuttle”, ou seja são capazes de se replicar tanto em leishmânias, como em bactérias, o cultivo em meio contendo antibiótico ampicilina, seleciona as bactérias contendo cosmídeos. A extração dos cosmídeos dessas bactérias, que serão referenciados neste relatório pela nomenclatura *BibGenHygAmp* seguido de um sufixo que os discrimina, permitirá a caracterização dos genes que ele carrega, e assim possivelmente implicar um deles como sendo o codificador da translocase.

A análise desses cosmídeos selecionados por restrição com a enzima *Bam*HI apresentou dois padrões distintos, como mostrado na figura 1, 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 semi-sólido.

Como controle foram utilizadas *L. (L.) amazonensis* transfectadas com o plasmídeo pXHYG, possuidor de marca de seleção para higromicina, porém sem o trecho da biblioteca genômica (nomeado *Hyg*).

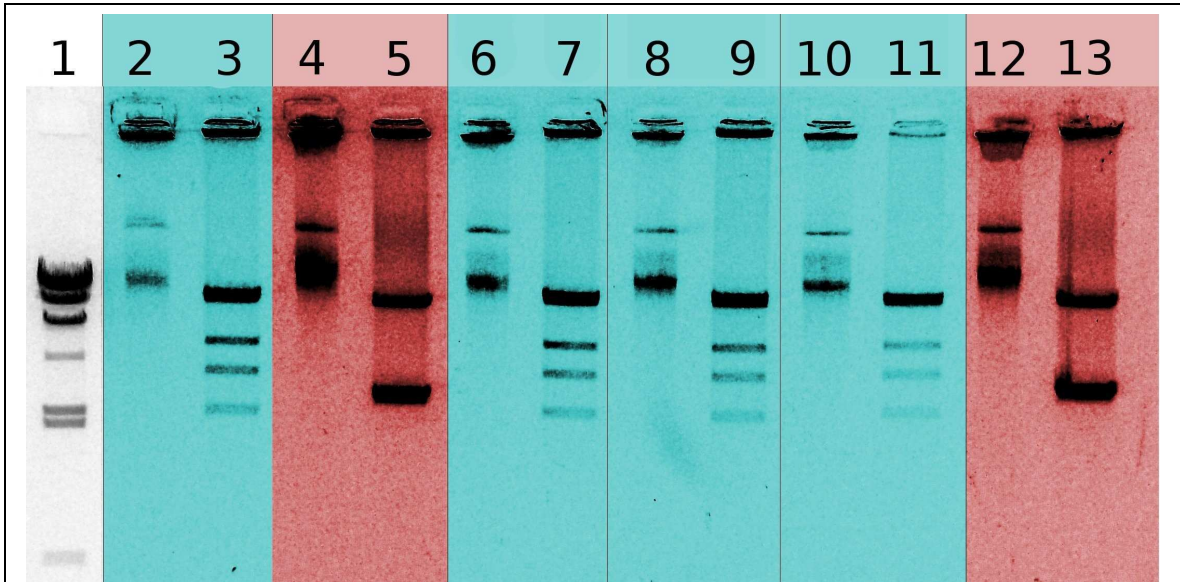


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1%. Na canaleta 1 está o padrão de tamanho molecular, DNA de fago lambda digerido com *HindIII*. Nas canaletas 2 a 13, estão os cosmídeos *BibGenHygAmp* não digerido e digerido com *BamHI*.

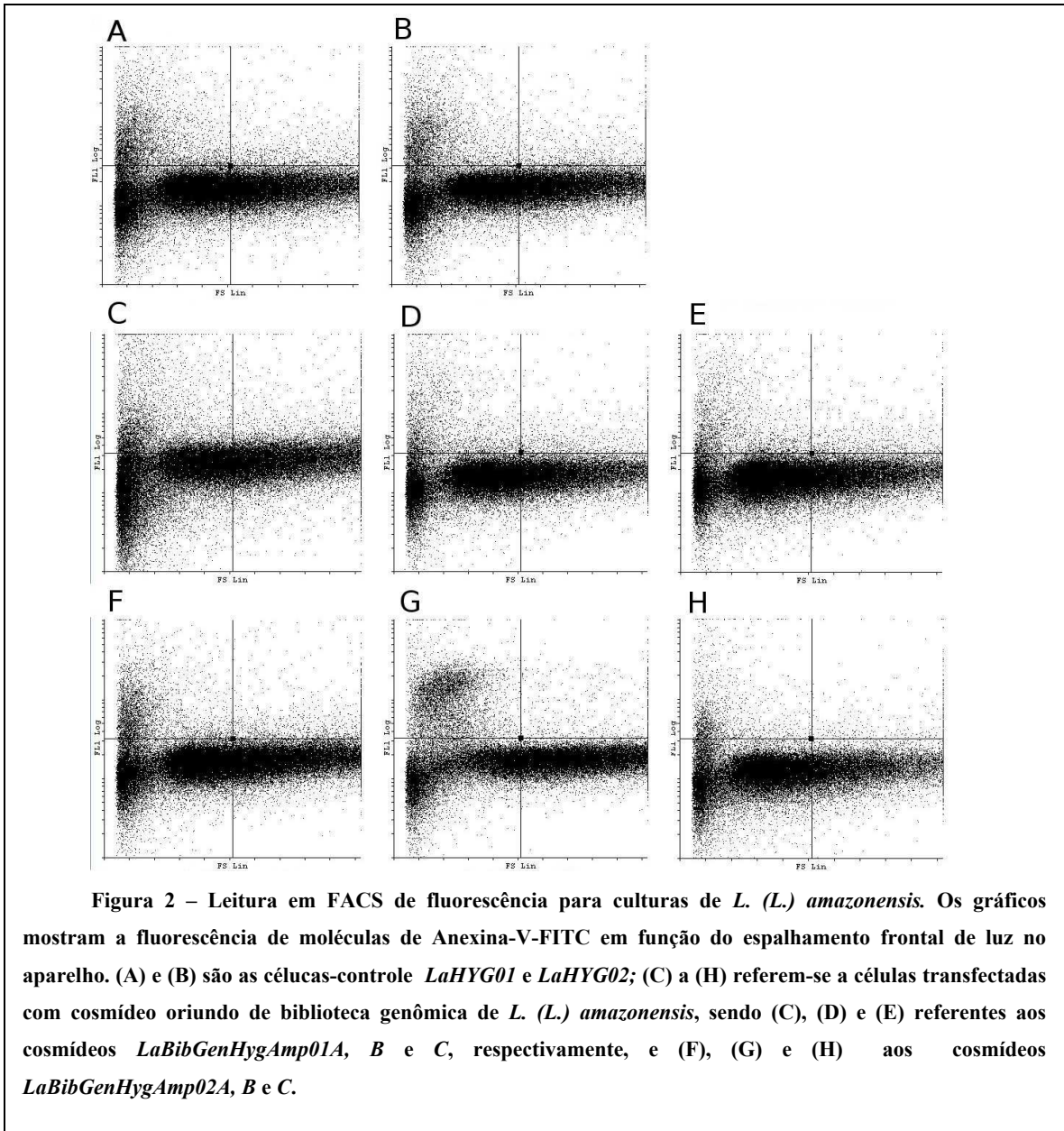


Figura 2 – Leitura em FACS de fluorescência para culturas de *L. (L.) amazonensis*. Os gráficos mostram a fluorescência de moléculas de Anexina-V-FITC em função do espalhamento frontal de luz no aparelho. (A) e (B) são as células-controle *LaHYG01* e *LaHYG02*; (C) a (H) referem-se a células transfectadas com cosmídeo oriundo de biblioteca genômica de *L. (L.) amazonensis*, sendo (C), (D) e (E) referentes aos cosmídeos *LaBibGenHygAmp01A*, *B* e *C*, respectivamente, e (F), (G) e (H) aos cosmídeos *LaBibGenHygAmp02A*, *B* e *C*.

Após crescerem por cinco dias em meio líquido, cada clone mutante e controle foi analisado para a exposição de fosfatidilserina através de tratamento com anexina-V conjugada 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 2. A partir da análise dessa figura, podemos observar uma fluorescência diferencial para a *LaBibGenHygAmp02B*, enquanto que as demais culturas apresentaram padrões de fluorescência compatíveis com os apresentados para as culturas do clone controle *LaHygAmp01*.

Procedeu-se ao seqüenciamento dos cosmídeos *BibGenHygAmp*, com a utilização de iniciadores com seqüências nos trechos que flanqueiam o sítio de clonagem, com base no conhecimento da seqüência de nucleotídeos dos cosmídeos.

Com o auxílio da ferramenta BLAST, foi realizada uma pesquisa da seqüência obtida no genoma de *L. (L.) major* que já se encontra seqüenciado. Foi utilizado o genoma dessa espécie de leishmânia por se esperar uma similaridade genética devida à proximidade filogenética, já que o genoma de *L. (L.) amazonensis* não foi seqüenciado até o momento. Os genes supostamente contidos nos cosmídeos *BibGenHygAmp01* e *BibGenHygAmp02* estão apresentados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Gene	D. T.*	Descrição
LmjF12.1100	-	Proteína hipotética, conservada
LmjF12.1110	-	Proteína hipotética, função desconhecida
LmjF12.1120	-	Proteína hipotética, conservada
LmjF12.1125	-	N-acil-L-aminoácido amidohidrolase
LmjF12.1130	-	NADH:flavina oxidoreductase/NADH oxidase, putativa
LmjF12.1140	-	Proteína do tipo n-etilmaleimida redutase
LmjF12.1150	-	Proteína hipotética, função desconhecida
LmjF12.1160	1	Proteína hipotética, conservada
LmjF12.1170	1	Proteína hipotética, conservada

*Quantidade de domínios transmembranares

Tabela 1 – Genes supostamente contidos no cosmídeo *BibGenHygAmp01*

Gene	D. T.*	Descrição
LmjF24.1830	-	Proteína hipotética, conservada
LmjF24.1840	-	Lisofosfolipase, putativa
LmjF24.1850	2	Proteína hipotética com predição de multipasso membranar
LmjF24.TRNAASP.01:tRNA	-	tRNA
LmjF24.1860	-	Proteína hipotética, conservada
LmjF24.1870	-	Proteína hipotética, conservada
LmjF24.1880	-	Ciclina 11, putativa
LmjF24.1890	-	Ciclina 10
LmjF24.1900	-	Proteína hipotética, conservada
LmjF24.19015	1	Proteína hipotética, conservada
LmjF24.1910	-	Proteína hipotética, conservada

*Quantidade de domínios transmembranares

Tabela 2 – Genes supostamente contidos no cosmídeo *BibGenHygAmp02*

A análise desse resultado para o cosmídeo *BibGenHygAmp02* acusa a presença de segmentos gênicos que codificam proteínas cuja superexpressão poderia desencadear um desequilíbrio na exposição de fosfatidilserina: uma lisofosfolipase ([LmjF24.1840](#)) e duas ciclinas ([LmjF24.1880](#) e [LmjF24.1890](#)).

A lisofosfolipase é uma enzima envolvida no metabolismo de lipídeos, cuja superexpressão poderia provocar um desequilíbrio no conteúdo de lipídeos nas células, o que, por sua vez, poderia desencadear uma alteração da composição lipídica membranar e conseqüente exposição de PS.

As ciclinas compreendem uma família de proteínas responsáveis pelo controle da progressão das células no ciclo celular, através da ativação de quinases dependentes de ciclina. A superexpressão dos genes responsáveis pelas ciclinas poderia implicar em um deslocamento da fase do ciclo celular no qual se encontrariam as leishmânias e, como a exposição de PS é dependente de fase, poderia haver uma relação entre a superexpressão do gene responsável pelas ciclinas e a exposição diferencial de PS nas leishmânias transfectadas com esse cosmídeo.

Perspectivas

Para testar a influência de cada um dos genes nos resultados obtidos na exposição de PS detectada pela leitura em FACS, como apresentada neste relatório, pode-se desenhar iniciadores para a amplificação dos genes da lisofosfolipase e das ciclinas, clonando-os e, em seguida, transfectando leishmânias com construções contendo cada gene individualmente. Esses mutantes, analisados por ligação com Anexina-V-FITC, como descrito acima podem elucidar o papel fisiológico da proteína.

Referências

- Araujo-Santos, J. M., A. Parodi-Talice, S. Castanys & F. Gamarro (2005). "The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in Leishmania." *Biochem Biophys Res Commun* **330**(1): 349-55.
- Daleke, D. L. & J. V. Lyles (2000). "Identification and purification of aminophospholipid flippases." *Biochim Biophys Acta* **1486**(1): 108-27.

- de Freitas Balanco, J. M., M. E. Moreira, A. Bonomo, et al. (2001). "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity." Curr Biol **11**(23): 1870-3.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, L. Guthrie & P. M. Henson (2001). "Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases." J Immunol **166**(11): 6847-54.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, D. L. Daleke, P. M. Henson & D. L. Bratton (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." J Biol Chem **276**(2): 1071-7.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn & S. M. Beverley (1990). "Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression." Mol Cell Biol **10**(3): 1084-94.
- Rey, L. (2001). Parasitologia. Rio de Janeiro-RJ, Editora Guanabara Koogan S.A.
- Rochette, A., F. Raymond, J. M. Ubeda, et al. (2008). "Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species." BMC Genomics **9**: 255.
- Sambrook, J. F., E. F.;Maniatis, T (1989). Molecularcloning, a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Smith, J. D., C. Waelde, A. Horwitz & P. Zheng (2002). "Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux." J Biol Chem **277**(20): 17797-803.
- Tripathi, A. & C. M. Gupta (2003). "Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania promastigotes*." Mol Biochem Parasitol **128**(1): 1-9.
- Uliana, S. R., M. H. Affonso, E. P. Camargo & L. M. Floeter-Winter (1991). "Leishmania: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence." Exp Parasitol **72**(2): 157-63.
- Uliana, S. R., N. Goyal, E. Freymuller & D. F. Smith (1999). "Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene." Exp Parasitol **92**(3): 183-91.
- Woehlecke, H., A. Pohl, N. Alder-Baerens, H. Lage & A. Herrmann (2003). "Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2)." Biochem J **376**(Pt 2): 489-95.
- Wu, Y., N. Tibrewal & R. B. Birge (2006). "Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill." Trends Cell Biol **16**(4): 189-97.