

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO
PROGRAMA DE BIOLOGIA CELULAR E PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGIA MOLECULAR E ESTRUTURAL

IAMARA DA SILVA ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DO ENDOSSIMBIONTE DE *Crithidia deanei*
SEMELHANTE À PORINAS BACTERIANAS: A ORIGEM PROCARIOTA DA
MEMBRANA EXTERNA

RIO DE JANEIRO

Abril de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IAMARA DA SILVA ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DO ENDOSSIMBIONTE DE *Crithidia deanei*
SEMELHANTE À PORINAS BACTERIANAS: A ORIGEM PROCARIOTA DA
MEMBRANA EXTERNA

Dissertação de Mestrado apresentada aos Programas de Biologia Celular e Parasitologia e de Biologia Molecular e Estrutural da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadores: Prof. Dr^a Maria Cristina Machado Motta e Prof. Dr. Ronaldo da Silva Mohana Borges

RIO DE JANEIRO

Abril de 2009

IAMARA DA SILVA ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DO ENDOSSIMBIONTE DE *Crithidia deanei*
SEMELHANTE À PORINAS BACTERIANAS: A ORIGEM PROCARIOTA DA
MEMBRANA EXTERNA

Dissertação de Mestrado apresentada
aos Programas de Biologia Celular e
Parasitologia e de Biologia Molecular
e Estrutural da Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Biofísica),
Instituto de Biofísica Carlos Chagas
Filho, Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre Ciências
Biológicas (Biofísica).

Aprovada em _____ de _____ de _____.

PROF^a. DR^a. MARIA CRISTINA MACHADO MOTTA, IBCCF

PROF. DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES, IBCCF

PROF. DR. MARCELO EINICKER LAMAS, IBCCF

PROF. DR. JOSE ROBERTO MEYER FERNANDES, IBQM

PROF. DR. CLAUDIO AKIO MASUDA, IBQM

PROF^a. DR^a WANDA MARIA ALMEIDA VON KRÜGUER, IBCCF

PROF. DR. MARCELO ROSADO FANTTAPIE, IBQM

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, I. S.

Caracterização de uma proteína do endossimbionte de *Crithidia deanei* semelhante à porinas bacterianas: a origem procariota da membrana externa / Iamara da Silva Andrade – Rio de Janeiro – UFRJ / IBCCF, 2009.

xxi, 107 p.

Orientadores: Maria Cristina Machado Motta e Ronaldo da Silva Mohana Borges.

Dissertação (mestrado): UFRJ / IBCCF / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2009.

Referências Bibliográficas: p. 90-107.

1. *Crithidia deanei* 2. Endossimbionte 3. Membrana externa 4. Porina

I. Motta, Maria Cristina Machado e Mohana-Borges, Ronaldo da Silva. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Caracterização de uma proteína do endossimbionte de *Crithidia deanei* semelhante à porinas bacterianas: a origem procariota da membrana externa.

À minha família: meus pais, Jorge e Sandra e minha irmã Naiara por todo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Rafael, por
compartilhar meus momentos de
alegria e de estresse e por compreender
os momentos de distância.

A meus amigos que sempre me deram
força e alegria para continuar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pois tenho a certeza de que sem a força Dele, eu não teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus pais e a toda à minha família, pelo amor e pelo suporte financeiro para que eu fizesse minha graduação e mestrado. Obrigada por todo esforço que fizeram por mim, desde as horas incansáveis de trabalho até a superação da saudade por ficarmos tanto tempo distantes. Simplesmente sem palavras! AMO MUITO VOCÊS!

Ao meu namorado Rafael, por estar sempre me apoiando e por ter abdicado tantas vezes de nós para que esta dissertação ficasse pronta, sempre com a maior compreensão e paciência. Obrigada por ser um namorado maravilhoso e um grande amigo também. AMO MUITO VOCÊ!

Aos meus orientadores, Maria Cristina Motta e Ronaldo Mohana Borges. Cris, agradeço muito por todas as discussões científicas, por acreditar e confiar no meu trabalho, pelas conversas e pelos conselhos para a vida! Você é um exemplo de pensar científico para mim! E ao meu querido orientador, Ronaldo, não tenho palavras para agradecer por você ter aberto as portas do seu laboratório para mim (espero que não se fechem nunca!), por tudo o que você me ensinou na bancada, pelas sugestões experimentais...Devo muito a você pelo meu crescimento em assuntos bioquímicos e moleculares e por ter me atendido em muitos momentos de angústia. MUITO OBRIGADA, por tudo!!

Aos meus amigos Crithidios muitíssimo queridos, fundamentais nos momentos de trabalho, de desabafo, de distração, de brincadeiras, de risadas... Ao Paulo agradeço todo o companheirismo, por participar de experimentos de fracionamento, microscopia e por saber dizer palavras confortadoras e sábias nos momentos mais difíceis desde a graduação. Ao Allan, pelos momentos de motivação durante os experimentos com as piadinhas, às vezes sem graça, mas que sempre arrancavam uma risada nossa. Por falar em risada, à Aline, que me

fazia rir ainda mais por causa de suas risadas, o que justificaram “maizum” trocadilho, o francês Zuma Ri!! Ao Manchester, que me adotou como filha, inventando outro modo de falcatruar! Achei isso muito carinhoso da sua parte e agradeço por nossas conversas elucidativas. Aos alunos de IC (por pouco tempo) que colaboraram muito com este trabalho: Carol Catta Preta, minha companheira de géis, cujo assunto foi alvo de muitas trocas de figurinhas e Felipe, que foi companheiro de intermináveis horas de fluorescência. À Dani Cavalcanti, que se tornou minha consultora de assuntos moleculares dentro do Hertha Meyer, que me deu excelentes conselhos e apoio nessa aventura de purificar uma proteína e produzir antisoro. E às novas integrantes do grupo dos Crithídios, Désirée e Marina, que acompanharam na torcida positiva os últimos experimentos.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Genética Estrutural, que foram simplesmente maravilhosos comigo. À Marcela agradeço por ter me ajudado em muitos ensaios bioquímicos desde a iniciação científica, por torcer pelos meus experimentos e pelas conversas amigas. Ao Diego por ter me ajudado várias vezes com os ensaios Western blotting, por compartilhar sua bancada comigo e pela qualidade dos churrascos. Ao Chico, que me deu várias dicas e sugestões durante as purificações de proteína, que me salvou e me ajudou muitas vezes, em especial na prevenção da temida agregação. Ao Emmerson pelas dicas para o preparo das imunizações e explicações moleculares. À Emiliana, pelas caronas e conversas agradáveis. E aos demais integrantes, pela companhia, conversas, risadas e pelos momentos de tapioca: Renata, Estefani, Eduardo, Gustavo, Fabrício, Ana Carolina.

A todos os colaboradores do trabalho: as pessoas do IBMP, em especial o Christian, pela parte de bioinformática, ao João, do Laboratório de Física Biológica, pela contribuição na modelagem molecular e ao Eduardo Camacho, da Unidade Genômica, pela imunização dos camundongos. Ao pessoal do laboratório da Elvira, em especial à Michele, que quebraram muitos galhos pra mim.

Aos técnicos do laboratório: Nete, Cazuza, Noêmia e ao saudoso e querido Bosco, que auxiliaram muito no preparo dos meios e do material para que os experimentos fossem bem sucedidos. E ainda, à Ana Cristina que sempre me atendeu nos momentos de ansiedade para compra de materiais.

Ao professor Wanderley de Souza, por me permitir utilizar o laboratório e pelos questionamentos durante as reuniões, que me fizeram valorizar ainda mais este trabalho. Aos professores do Hertha Meyer: Narcisa, Márcia, Rossiane, Tecia e Kildare por disponibilizarem seus conhecimentos e sanarem dúvidas.

A todos os alunos do Hertha Meyer, de iniciação, mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos, que sintam minha gratidão, mesmo não tendo sido citados nominalmente, pois são muitos.

Aos meus demais amigos de faculdade Ana Carolina, Pedro, Ana Júlia, e Maiza. Tenho muito a agradecer a vocês pelos momentos inesquecíveis pelos quais passamos juntos.

Aos meus amigos friburguenses de longa data Alberto, Bruna, Sileana e Carol, pela amizade que mantemos desde a época de escola.

Aos meus companheiros de pós-graduação: Cynthia, Bete, Viviane, Paula e Marco, pelo incentivo e apoio.

E a todas às outras pessoas que contribuíram de alguma maneira para esta dissertação, o meu carinho e sinceros agradecimentos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES e FAPERJ.

TOCANDO EM FRENTE

Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Eu só levo a certeza de que muito pouco sei
Ou nada sei

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso chuva pra florir

Penso que cumprir a vida seja simplesmente
Compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu sou
Estrada eu vou

Todo mundo ama
Um dia todo mundo chora
Um dia a gente chega e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
E cada ser em si carrega o dom
De ser capaz
E ser feliz

(Almir Sater/ Renato Teixeira)

RESUMO:

Alguns protozoários da família Trypanosomatidae, como *Crithidia deanei*, apresentam uma bactéria simbiótica que mantém uma relação mutualística com o hospedeiro. Esta associação constitui um modelo excelente para estudar a origem das organelas e a evolução celular. O endossimbionte é envolto por duas unidades de membrana, mas carece de uma parede celular típica de bactérias Gram-negativas. A respeito da origem da membrana externa, alguns autores sugerem que esta é derivada do protozoário hospedeiro, porém outros dados indicam que possui uma natureza procariótica. A presença de porinas, que são proteínas típicas de membrana externa, no envoltório do endossimbionte pode confirmar sua ancestralidade Gram-negativa, já que análises moleculares classificam esta bactéria na subdivisão β das Proteobactérias, próximo ao gênero *Bordetella*. Neste estudo, usamos métodos bioquímicos, moleculares e ultraestruturais para identificar porinas no envelope do endossimbionte de *C. deanei*. Pesquisas na base de dados do genoma do simbiote identificaram uma sequência que apresenta identidade positiva (64 – 67%) com porinas do gênero *Bordetella*. A predição da estrutura secundária da porina do endossimbionte mostrou que esta proteína tem características semelhantes à proteína de membrana externa de Gram-negativos, na forma de barril- β , com 18 passagens pela membrana. O gene da porina foi amplificado e clonado em vetor para superexpressar da proteína recombinante, que foi purificada por afinidade. Antisoro contra esta proteína recombinante foi produzido em camundongo, purificado em membrana de nitrocelulose e utilizados em ensaios de *Western blotting*, que mostraram que a porina do endossimbionte possui ~ 45 kDa. Os anticorpos purificados foram empregados em técnicas de imunolocalização por microscopia ótica de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que esta proteína está localizada principalmente no envoltório da bactéria endossimbiótica. Juntos, os dados obtidos

neste trabalho indicam que a membrana externa do endossimbionte de *C. deanei* apresenta origem procariótica.

ABSTRACT:

Some protozoa of the Trypanosomatidae family, such as *Crithidia deanei*, present an simbiotic bacterium that maintains a mutualistic relationship with the host. This association constitutes an excellent model to study the origin of organelles and cellular evolution. The endosymbiont is surrounded by two unit membranes but lacks a typical cell wall of Gram-negative bacteria. Regarding the origin of the outer membrane, some authors suggest that it is derived from the host protozoan, but other data indicate its prokaryotic nature. The presence of porins, which are typical outer membrane proteins, in the endosymbiont envelope would confirm its Gram-negative ancestral, since molecular analysis classified this bacterium in β subdivision of Proteobacteria close to *Bordetella* genus. In this study, we used biochemical, molecular and ultrastructural methods to identify porins in the *C. deanei* endosymbiont envelope. Search on the endosymbiont genome annotation database identified a sequence that presents identity (64-67%) with porins of *Bordetella* genus. The secondary structure prediction revealed that the endosymbiont porin presents similar characteristics when compared to the Gram-negative outer membrane protein, as a β -barrel, with 18 passages by the membrane. The gene for porin was aplified and cloned into vector to overexpress the recombinant protein, which was purified by affinity. Antiserum raised against the recombinant porin was produced in mouse, purified on nitrocellulose membrane and used in Western Blotting assays, showing that the symbiont porin has ~ 45 KDa. The purified antibodies were employed in immunocytochemical approaches, such as fluorescence optical microscopy and transmission electron microscopy, revealing that this protein is mainly located in the symbiotic bacterium envelope. Taken together, the data obtained in this work indicate that the outer membrane of the *C. deanei* endosymbiont presents a prokaryotic origin.

Lista de Abreviaturas e siglas

ATP	<i>adenosine-5'-triphosphate</i>
ASB-14	amidosulfobetaina-14
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-r	DNA ribossômico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	ácido etilenoglicoldiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent</i>
EtBr	brometo de etídio
Kbp	<i>kilo-base pair</i>
k- DNA	DNA do cinetoplasto
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
ME	membrana externa
MI	membrana interna
ODC	ornitina descarboxilase
ORF	<i>open reading frame</i>
OMPs	proteínas integrais de membrana externa
PBS	solução salina tamponada com fosfato de sódio
PC	fosfatidilcolina
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PNPP	p-nitrofenil-fosfato
PE	fosfatidiletanolamina

PG	fosfatidilglicerol
PMSF	fluoreto de fenil-metil-sulfonila
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
WHO	<i>World Health Organization</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Os tripanossomatídeos.....	1
1.2	Características ultraestruturais dos tripanossomatídeos	2
1.3	Características ultraestruturais dos tripanossomatídeos com endossimbionte.....	5
1.4	A relação metabólica do endossimbionte com o protozoário hospedeiro	8
1.5	Bactérias parasitas e simbióticas: estratégias para sobrevivência no hospedeiro.....	10
1.6	Constituição do envoltório e manutenção da forma nas bactérias.....	11
1.7	Composição das membranas bacterianas	15
1.8	Composição proteica da membrana externa.....	15
1.9	As porinas	17
1.10	O envoltório do endossimbionte de tripanossomatídeos	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo geral	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Cepas e condições de cultivo.....	27
4.2	Obtenção das frações de endossimbionte e mitocôndria	27
4.3	Extração do DNA do endossimbionte	29
4.4	Purificação do DNA do endossimbionte em gradiente de cloreto de cézio.....	29
4.5	Busca de sequências de proteínas homólogas à de porinas de bactérias Gram-negativas no banco de dados de referências genômicas do endossimbionte de <i>C. deanei</i> ...	30
4.6	Predição estrutural	31
4.7	Modelagem molecular comparativa	31
4.8	Clonagem do gene da proteína semelhante à porina do endossimbionte	32
4.8.1	Desenho dos iniciadores para amplificação por PCR.....	32
4.8.2	Condições de reação de PCR , purificação do produto amplificado, digestão com enzimas de restrição e ligação do inserto com o vetor	32
4.9	Bactérias utilizadas nos procedimentos de clonagem e expressão	35
4.10	Transformação por eletroporação de bactérias DH5α.....	36
4.11	Expressão da proteína recombinante em cepas de <i>E. coli</i>	38

4.11.1	Transformação por choque térmico	38
4.11.2	Teste de expressão da proteína recombinante	38
4.12	Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e coloração das proteínas	39
4.13	Crescimento de bactérias BL21(DE3)/pET21d-His-Tev-porina para purificação da porina putativa recombinante	40
4.14	Abertura de corpo de inclusão, lise celular solubilização da proteína recombinante... ..	40
4.15	Purificação em coluna com resina de níquel	41
4.16	Reconstituição do enovelamento da proteína recombinante	41
4.17	Análise da proteína por espectrometria de massas	42
4.18	Obtenção do antissoro anti-proteína recombinante do endossimbionte expressa em <i>E. coli</i>	44
4.19	Ensaio de ELISA	44
4.20	Purificação de anticorpo por afinidade	45
4.21	Preparo de proteínas totais da cepa normal e curada de <i>C. deanei</i> e da fração de mitocôndria	46
4.22	Preparo de proteínas solúveis e de membrana das frações de endossimbionte	46
4.23	<i>Western Blotting</i>	47
4.24	Microscopia eletrônica de transmissão	48
4.24.1	Preparação de rotina	48
4.24.2	Preparação de amostras para imunocitoquímica	48
4.25	Ensaio de imunolocalização	49
4.25.1	Por microscopia ótica	49
4.25.2	Por microscopia eletrônica	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Análise ultraestrutural de <i>C. deanei</i> e das frações de endossimbionte	51
5.2	Identificação de referências codificadoras de porinas putativas no genoma do endossimbionte de <i>C. deanei</i>	54
5.3	Predição da topologia da porina putativa utilizando o programa PRED-TMBB	58
5.4	Modelagem molecular comparativa	60
5.5	Análise da preparação do DNA cromossomal do endossimbionte de <i>C. deanei</i>	64
5.6	Amplificação do gene da porina putativa do endossimbionte	64
5.7	Análise da expressão da proteína recombinante em cepas de <i>E. coli</i>	65
5.8	Solubilização da proteína recombinante	67

5.9	Análise do enovelamento da porina putativa recombinante	69
5.10	Identificação da proteína recombinante por espectrometria de massas.....	72
5.11	Análise do antissoro produzido contra a proteína recombinante.....	72
5.12	Ensaio de <i>Western Blotting</i>	75
5.13	Ensaio de imunolocalização	77
5.14.1	Por microscopia ótica	77
5.14.2	Por microscopia eletrônica de transmissão.....	80
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÕES	89
8	Referências bibliográficas	90

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Representação esquemática da ultraestrutura de <i>C. deanei</i>	4
Tabela 1: Tripanosomatídeos com endossimbionte isolados de insetos.....	5
Figura 2: Ultraestrutura de <i>Crithidia desouzai</i> , um tripanosomatídeo monoxênico portador de endossimbionte	7
Figura 3: Reconstrução tridimensional de <i>C. deanei</i>	8
Figura 4: Esquema do envoltório de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	12
Figura 5: Esquema da biogênese da ME	17
Figura 6: Esquema da estrutura de barril β da OmpF de <i>E. coli</i>	18
Tabela 2: Cepas de <i>E. coli</i> com seus respectivos genótipos.....	36
Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão de <i>C. deanei</i>	52
Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão de <i>C. deanei</i> mostrando em maior aumento o endossimbionte	53
Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de <i>C. deanei</i> de fração de endossimbionte .	53
Figura 10: Sequência de nucleotídeos do Contíguo 987 do genoma do de <i>C. deanei</i>	55
Figura 11: Sequência de aminoácidos correspondente ao gene da possível porina encontrada no genoma do endossimbionte de <i>C. deanei</i>	55
Tabela 3: Similaridade da sequência do gene da porina putativa do endossimbionte de <i>C. deanei</i> com seqüências codificadoras de porinas do gênero <i>Bordetella</i>	56
Tabela 4: Similaridade da sequência do gene da porina do endossimbionte de <i>C. deanei</i> com porinas presentes em <i>Bordetella</i> baseados nos alinhamentos do ExPASy BLAST2 Interface.....	57
Figura 12: Predição da topologia da porina putativa do endossimbionte de <i>C. deanei</i> pelo programa PRED-TMBB	59
Figura 13: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos deduzidos da seqüência gênica sem o peptídeo sinal da porina putativa do endossimbionte de <i>C. deanei</i> e da Omp32 de <i>Comamonas acidovorans</i> utilizando-se o programa Promals	61
Figura 14: Modelo molecular 3D hipotético da porina do endossimbionte de <i>C. deanei</i>	62
Figura 15: Comparação do modelo proposto para a porina putativa do endossimbionte de <i>C. deanei</i> e da estrutura cristalina da Omp32 de <i>Comamonas acidovorans</i>	63
Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TAE do DNA purificado do endossimbionte de <i>C. deanei</i>	65

Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% em tampão TAE do fragmento contendo o gene da porina putativa do simbionte de <i>C. deanei</i> amplificado por PCR	65
Figura 18: Análise eletroforética por gel SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% da expressão da proteína recombinante.....	66
Figura 19: Análise por <i>Western blotting</i> revelou a expressão da porina recombinante pela cepa BL21(λDE3) transformada com BL21(λDE3)/pET21d-His-Tev-porina putativa.....	68
Figura 20: SDS PAGE 12% mostrando as etapas da solubilização da proteína recombinante....	68
Figura 21: SDS PAGE 12% mostrando a purificação da proteína recombinante em coluna com resina de níquel	69
Figura 22: Gráfico do espectro de fluorescência do enovelamento da porina recombinante do endossimbionte de <i>C. deanei</i>	70
Figura 23: Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12% da proteína recombinante após a segunda etapa de purificação em coluna com resina de níquel e eluição com gradiente de imidazol (0,01 M a 0,5 M).....	71
Figura 24: Análise eletroforética por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% da amostra de porina putativa purificada	71
Figura 25: Relação número de <i>hits</i> x probabilidade (<i>score</i>) obtido através de espectrometria de massas	72
Figura 26: Ensaios de ELISA usando o antissoro produzido em camundongo contra a porina recombinante	74
Figura 27: <i>Western blotting</i> da proteína recombinante contra o antissoro obtido de camundongo	74
Figura 28: <i>Western blotting</i> das frações de simbionte e mitocôndria de <i>C. deanei</i> contra o antissoro obtido de camundongo	75
Figura 29: Análise eletroforética por SDS-PAGE em poliacrilamida 12% de extratos de proteínas	76
Figura 30: <i>Western blotting</i> da proteína recombinante e das frações de simbionte e mitocôndria usando anticorpos purificados por afinidade.....	76
Figura 31: <i>Western blotting</i> das proteínas de <i>C. deanei</i> cepa normal, curada, proteínas solúveis e proteínas de membrana do endossimbionte usando anticorpos contra a proteína recombinante purificados por afinidade	77
Figura 32: Microscopia ótica de fluorescência de <i>C. deanei</i> usando anticorpos anti-porina recombinante purificado por afinidade.....	78

Figura 33: Microscopia ótica confocal de <i>C. deanei</i> mostrando marcação do endossimbionte pelo anticorpo anti-porina recombinante purificado	79
Figura 34: Imunocitoquímica ultraestrutural <i>C. deanei</i> usando anticorpo anti-porina purificado por afinidade como anticorpo primário	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Os tripanossomatídeos

A família Trypanosomatidae é conhecida por apresentar vários protozoários patogênicos de grande importância médica, já que infectam o homem e animais ao longo de seu ciclo de vida. Enquadram-se neste grupo parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, que são agentes etiológicos de graves doenças como a doença de Chagas, a doença do sono e a Leishmaniose, acometendo milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 1997). Tais protozoários apresentam hospedeiros invertebrados e vertebrados ao longo do seu ciclo de vida, sendo então referidos como heteroxênicos.

Na mesma família encontra-se um grupo de protozoários que são ditos monoxênicos, por infectar apenas um único hospedeiro invertebrado, normalmente um inseto, ao longo de seu ciclo de vida. Estes são agrupados em gêneros como *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Leptomonas*, além dos recentemente criados: *Angomonas*, *Strigomonas* e *Wallaceina* (WALLACE, 1966; SOUSA & CORTE-REAL, 1991; VICKERMAN, 1994; PODLIPAEV & ROKITSKAYA, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2000).

Um número pequeno de tripanossomatídeos monoxênicos apresenta em seu citoplasma uma bactéria simbiótica, que se relaciona com seu hospedeiro de forma mutualística: o endossimbionte não é capaz de dividir-se uma vez isolado e cepas aposimbióticas do tripanossomatídeo são incapazes de colonizar insetos (DE SOUZA & MOTTA, 1999; FAMPA *et al.*, 2003). Dentre tais protozoários podemos citar: *Crithidia oncopelti* (GILL & VOGEL, 1963), *Blastocrithidia culicis* (BRUESKE, 1967), *Herpetomonas roitmani* (FIORINI *et al.*, 1989; FARIA E SILVA *et al.* 1991), *Crithidia desouzai* (FIORINI *et al.*, 1989), e a espécie *Crithidia deanei*, isolada do hemíptero *Zelus leucogrammus*

(MUNDIM *et al.*, 1974). O grande interesse em se estudar estes tripanosomatídeos está relacionado ao fato da estreita simbiose entre o procarioto e a célula hospedeira fornecer importantes pistas sobre a origem simbiótica de organelas, como a da mitocôndria.

1.2 Características ultraestruturais dos tripanossomatídeos

Os tripanosomatídeos apresentam organelas que são comuns às células eucarióticas, como núcleo, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Porém, apresentam ainda algumas estruturas peculiares (Fig. 1) como o cinetoplasto, os microtúbulos subpeliculares, os glicossomos e o flagelo único que emerge da bolsa flagelar (revisto por DE SOUZA, 2002).

A membrana plasmática desses protozoários é composta por lipídios, carboidratos e proteínas, sendo o glicocálice formado pela associação de carboidratos a lipídios e proteínas e projetado para o meio extracelular. O citoesqueleto é composto por microtúbulos que se encontram logo abaixo da membrana plasmática e que se distribuem ao longo do corpo do protozoário, à exceção da região da bolsa flagelar. Essa disposição dos microtúbulos resulta numa trama semelhante a “gaiola” que confere estabilidade ao protozoário e resistência a rupturas por choques mecânicos (DE SOUZA, 2002).

Outra característica comum na família Trypanosomatidae é a presença de um flagelo único que emerge da região de bolsa flagelar. O flagelo possui um axonema formado por 9 pares de microtúbulos periféricos circundando um único par central. A estrutura paraflagelar, um complexo arranjo de filamentos proteicos, encontra-se associada ao flagelo destes protozoários (GULL, 1999). Porém, esta estrutura encontra-se bastante reduzida nos tripanosomatídeos que possuem endossimbionte (GADELHA *et al.*, 2005).

A mitocôndria é uma estrutura única e ramificada nestes protozoários, com seus ramos se estendendo através de todo o corpo celular, logo abaixo do citoesqueleto de microtúbulos.

Existe uma região alargada da mitocôndria, denominada cinetoplasto, onde se encontra armazenado o material genético dessa organela, o k-DNA. O k-DNA é constituído por moléculas circulares, os maxicírculos e minicírculos, que se encontram concatenadas umas às outras (SHLOMAI, 1994).

O glicosomo, um tipo especial de peroxissomo, também está presente nestes protozoários. Nesta organela são encontradas oxidases e enzimas que participam da β -oxidação de ácidos graxos, mas também enzimas da via glicolítica, tornando-a importante para o metabolismo energético dos tripanossomatídeos, juntamente com a mitocôndria (OPPERDOES & BORST, 1977; OPPERDOES, 1987). Já os acidocalcissomos são organelas que estão envolvidas em diferentes processos biológicos, como o armazenamento de cálcio, adaptação a condições de estresse ambiental, manutenção do pH intracelular e osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 2005).

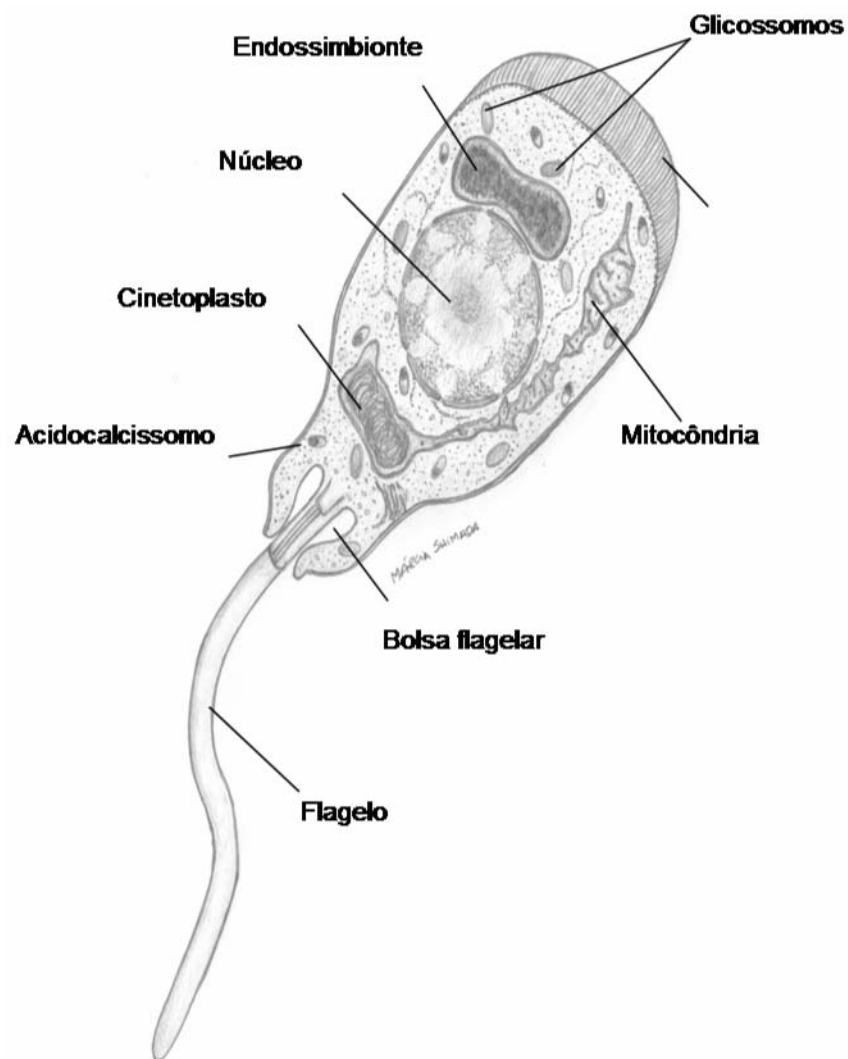


Figura 1: Representação esquemática da ultraestrutura de *C. deanei*. Desenho: Márcia Shimada.

1.3 Características ultraestruturais dos tripanosomatídeos com endossimbionte

O endossimbionte presente em alguns membros da família Trypanosomatidae foi primeiramente descrito na espécie *Blastocrithidia culicis* como diplossomos (NOVEY *et al.*, 1907). Posteriormente, uma estrutura similar foi descrita como corpos bipolares na espécie *Crithidia oncopelti* (NEWTON & HORNE, 1957), um tripanosomatídeo que foi isolado em 1926 por NOGUCHI E TILDEN, do trato digestivo do hemíptero *Oncopeltus fasciatus*. Em 1963, MARMUR e sua equipe mostraram que esses corpos bipolares continham DNA semelhante ao encontrado em bactérias. Mais tarde, o caráter bacteriano desta estrutura foi sustentado pelo tratamento de *Blastocrithidia culicis* com cloranfenicol, um antibiótico que inibe a síntese de proteínas em procariotos e que levou ao desaparecimento dos diplossomos das células hospedeiras (BRUESK, 1967). Em 1975, CHANG propôs que os corpos bipolares e os diplossomos correspondiam a uma mesma estrutura que passou assim, a ser denominada de endossimbionte. A Tab. 1 mostra as espécies de tripanosomatídeos que parasitam insetos e que possuem simbionte.

Tabela 1: Tripanosomatídeos com endossimbionte isolados de insetos.

Tripanosomatídeos	Insetos	Referências
<i>Blastocrithidia culicis</i>	<i>Triatoma infestans</i>	NOVEY <i>et al.</i> , 1907
<i>Crithidia deanei</i>	<i>Zelus leucogrammus</i>	MUNDIM <i>et al.</i> , 1974
<i>Crithidia desouzai</i>	<i>Ornidia obesa</i>	FIORINI <i>et al.</i> , 1989
<i>Crithidia oncopelti</i>	<i>Oncopeltus fasciatus</i>	NEWTON & HORNE, 1957
<i>Herpetomonas roitmani</i>	<i>Ornidia obesa</i>	FIORINI <i>et al.</i> , 1989
		FARIA E SILVA <i>et al.</i> , 1991

A bactéria endossimbiótica apresenta uma sincronia de divisão perfeita com outras estruturas do protozoário, de modo que cada célula hospedeira apresenta usualmente um único

endossimbionte (DE SOUZA & MOTTA, 1999). As espécies de tripanossomatídeos com endossimbionte possuem algumas peculiaridades ultraestruturais (Fig. 2), como o arranjo mais largo e frouxo do DNA mitocondrial (FREYMULLER & CAMARGO, 1981), o qual não é alterado com a perda do endossimbionte após tratamentos com antibióticos. Além disso, protozoários com bactéria endossimbiótica apresentam uma estrutura paraflagelar bastante reduzida (GADELHA *et al.*, 2005), o que sugere que a presença do endossimbionte pode inibir a expressão de genes que codificam proteínas formadoras desta estrutura. Nestes protozoários a mitocôndria apresenta o maior volume relativo do total celular, que corresponde a aproximadamente 11%, enquanto que o núcleo corresponde a 4,5% e a bactéria endossimbiótica a 2,5% (MOTTA *et al.*, 1997b) (Fig. 3). A presença do endossimbionte também interfere na distribuição espacial da mitocôndria e dos microtúbulos subpeliculares. Assim, nos pontos em que os ramos mitocondriais tocam a membrana plasmática do protozoário, os microtúbulos subpeliculares estão ausentes (FREYMULLER & CAMARGO, 1981).

No estudo da endossimbiose em tripanossomatídeos, é importante mencionar que é possível obter cepas curadas após tratamentos sucessivos do protozoário hospedeiro com antibiótico. Estas cepas são também referidas como aposimbióticas e fornecem importantes informações sobre o papel do endossimbionte, através de comparações ultraestruturais, bioquímicas e moleculares com a cepa normal ou selvagem (MUNDIM & ROITMAN, 1977).

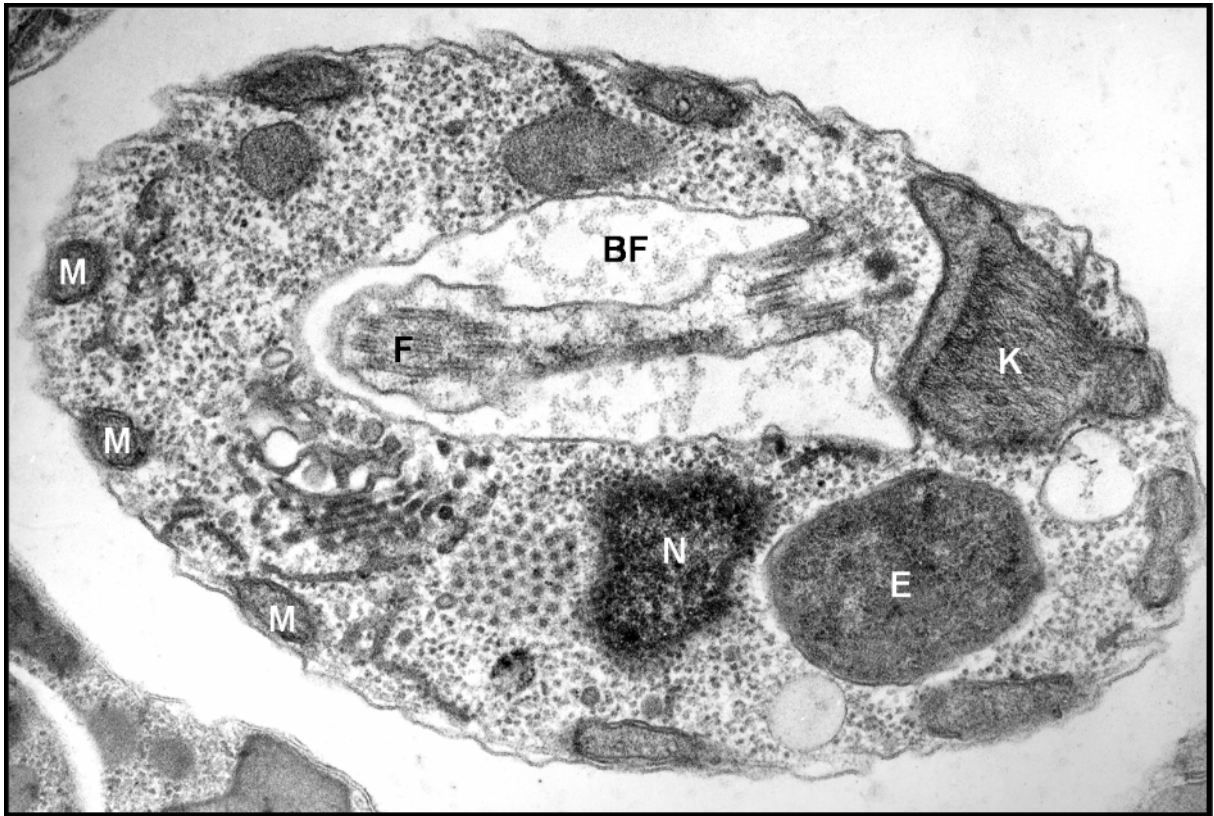


Figura 2: Ultraestrutura de *Crithidia desouzai*, um tripanosomatídeo monoxênico portador de endossimbionte. Observar características típicas destes protozoários como a mitocôndria (M) altamente ramificada e o arranjo do DNA do cinetoplasto (K) que é largo e frouxo. O endossimbionte (E) se encontra próximo ao núcleo (N). Apresenta um flagelo único (F) que emerge da bolsa flagelar (BF). Aumento: 30000 X. Fonte: SOARES *et al.*, 1989.

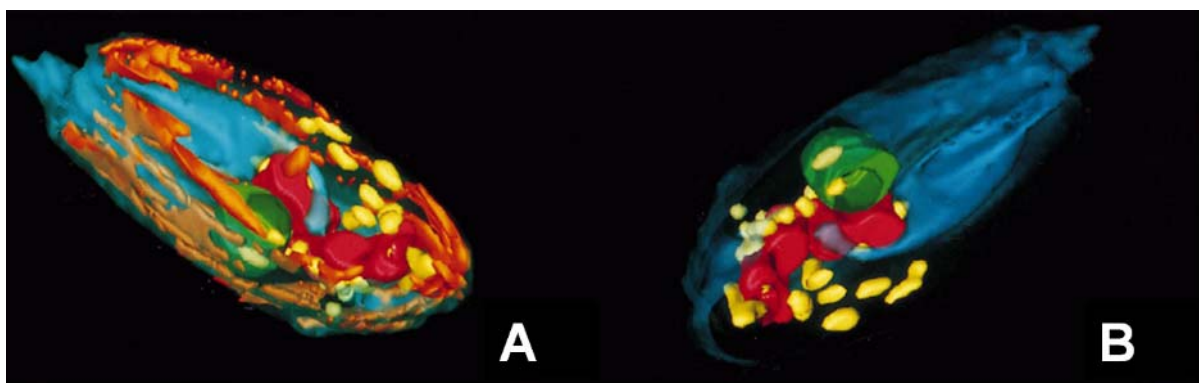


Figura 3: Reconstrução tridimensional de *C. deanei*. Em azul a membrana plasmática, em verde o núcleo, em amarelo os glicosomos, em laranja a mitocôndria, e em vermelho o endossimbionte. (A) Notar que a mitocôndria é única e ramificada e se encontra logo abaixo da membrana plasmática. (B) A omissão dos ramos mitocondriais revela a aproximação do endossimbionte em relação ao núcleo e aos glicosomos. Fonte: MOTTA *et al.*, 1997b.

1.4 A relação metabólica do endossimbionte com o protozoário hospedeiro

O endossimbionte interfere no metabolismo do seu tripanossomatídeo hospedeiro. Em geral, suplementos nutricionais, como hemina e vitaminas, são adicionados às culturas de tripanossomatídeos. Porém, espécies que possuem endossimbionte não apresentam tais exigências nutricionais. Após a obtenção de cepas curadas, tornou-se claro que apenas cepas que contêm endossimbionte podem ser cultivadas em meio sem hemina. No caso da espécie *C. deanei* cepa normal (que contém endossimbionte), observou-se crescimento do protozoário em meio quimicamente definido contendo apenas dois aminoácidos (metionina e tirosina), quatro vitaminas (ácido fólico, tiamina, biotina e nicotinamida) e nenhum suplemento de hemina ou purina (MUNDIM *et al.*, 1974). Sabe-se ainda que as enzimas e precursores, que participam da via metabólica de componentes com grupamento heme, estão presentes em maior quantidade nas cepas normais quando comparadas às cepas curadas (ou cepas apossimbióticas) (SALZMAN *et al.*, 1985). Normalmente, os tripanossomatídeos necessitam

de hemina, hematina ou hemoglobina no seu meio de cultura por não serem capazes de sintetizar grupamentos heme. Entretanto, em tripanossomatídeos portadores de endossimbionte, a enzima uroporfirinogênio sintase I, envolvida na biossíntese de heme, está presente na bactéria, o que pode explicar a autonomia destas espécies em relação a fontes de ferro (CHANG *et al.*, 1975).

Enzimas do endossimbionte também estão envolvidas na produção dos aminoácidos ornitina, arginina e citrulina. Isto porque a bactéria endossimbiótica possui as enzimas acetilornitinaase, que sintetiza ornitina a partir de acetilornitina (GALINARI & CAMARGO, 1978) e ornitina carbamoil transferase, que é capaz de converter ornitina em citrulina (CAMARGO & FREYMÜLLER, 1977). Deste modo, o ciclo da ureia é completo, o que torna o protozoário autossuficiente na obtenção destes aminoácidos. Um outro ponto chave no metabolismo dos tripanossomatídeos está associado à produção de poliaminas, polications que participam de funções celulares essenciais, como na síntese de ácidos nucleicos e proteínas e também nos processos de proliferação e diferenciação celular (COHEN, 1988). Estudos recentes comprovaram que o endossimbionte é capaz de produzir um fator proteico que promove o aumento da atividade da ornitina descarboxilase (ODC). Tal enzima participa da biossíntese de poliaminas ao converter o aminoácido ornitina em putrescina. A maior atividade da ODC na cepa normal *C. deanei* está relacionada com a maior proliferação estimulada pelas poliaminas destas células em relação à cepa curada e também a outros protozoários da família (FROSSARD *et al.*, 2006). Além disso, tripanossomatídeos que contêm endossimbionte também crescem em meio sem isoleucina, valina e leucina devido à presença da treonina desaminase, a primeira enzima na via biossintética de isoleucina a treonina (ALFIERI & CAMARGO, 1982).

A localização muito próxima entre os glicosomos e o endossimbionte, verificada por reconstrução tridimensional e microscopia eletrônica de transmissão, indica uma relação de

troca metabólica intensa entre a bactéria simbiótica e seu tripanosomatídeo hospedeiro (MOTTA *et al.*, 1997b). Dados sugerem que parte do ATP produzido pelos glicosossomos do protozoário seja utilizada pelo endossimbionte, que inclusive apresenta uma atividade ATPásica em sua superfície. Assim, a bactéria endossimbiótica parece obter parte da energia de que necessita para mecanismos de transporte ativo de componentes provenientes do hospedeiro. Esta hipótese é reforçada por indicações bioquímicas de que o endossimbionte apresenta baixa atividade da cadeia respiratória (MOTTA *et al.*, 1997b). Estes resultados corroboram outros obtidos para bactérias patogênicas e intracelulares obrigatórias, como as dos gêneros *Rickettsia* e *Chlamydia* (WEISS & WILSON, 1969; WEISS & FRASER, 1973; WINKLER, 1976; HATCH *et al.*, 1982;).

O endossimbionte também interfere nas propriedades de superfície do protozoário, tais como a exposição de resíduos de carboidratos (DWYER & CHANG, 1976; ESTEVES *et al.*, 1982; MCLAUGHLIN & CAIN, 1985) e a carga de superfície, observada pela redução da migração eletroforética de *C. deanei* (ODA *et al.*, 1984). Além disso, o simbiote influencia no processo de diferenciação celular de *Herpetomonas roitmani* da forma promastigota para opistomastigota (FARIA E SILVA *et al.*, 1994).

1.5 Bactérias parasitas e simbióticas: estratégias para sobrevivência no hospedeiro

Algumas bactérias são capazes de estabelecer relações parasíticas ou simbióticas com células eucarióticas. Para que esta relação ocorra com sucesso para ambos os seres associados, é necessária uma interação inicial entre as moléculas de superfície do procarioto e da célula hospedeira, tais como adesinas e receptores, os quais são essenciais para a internalização da bactéria (HALL & JOINER, 1991). Uma vez dentro da célula hospedeira, algumas bactérias, são capazes de escapar da lise e de sobreviver no interior do vacúolo. No caso desta

associação resultar em simbiose, o vacúolo pode ser denominado simbiossomo, sendo este um sítio preferencial para a manutenção de microrganismos intracelulares (CORSARO *et al.*, 1999). Associações tanto obrigatórias quanto facultativas podem ser observadas nas relações simbióticas. Diversas estratégias de sobrevivência são utilizadas por bactérias parasitas intracelulares: a lise da membrana do vacúolo, a permanência direta no citoplasma (*Listeria* spp e *Shigella* spp), o bloqueio da fusão de lisossomas com fagossoma (*Legionella* spp), o bloqueio ou atenuação da acidificação do fagossoma (*Mycobacterium tuberculosis*), ou a adaptação e resistência à atividade do fagolisossoma da célula hospedeira (*Yersinia* spp e *Salmonella* spp) (FINLAY & COSSART, 1997; FINLAY & FALKOW, 1997; ERNST *et al.*, 1999). Após escapar da degradação no interior da célula hospedeira, o microrganismo pode então utilizar este novo ambiente para se replicar (GOEBEL & GROSS, 2001). No caso das células de mamíferos, as bactérias intracelulares geralmente mantêm uma relação parasítica, que culmina com a morte da célula hospedeira ou até mesmo de ambos os seres associados (FINLAY, 1999).

Bactérias endossimbióticas podem estar localizadas no citoplasma, no núcleo ou na região perinuclear. Comumente, os endossimbiontes se beneficiam da maquinaria da célula hospedeira, cuja relação se torna tão estreita, a ponto de se tornar obrigatória para os seres associados. Estas bactérias se desenvolvem no ambiente intracelular e usualmente podem fornecer muitos benefícios à célula hospedeira, especialmente do ponto de vista nutricional (BAUMANN & MORAN, 1997; GÖRTZ & BRIGGE, 1998).

1.6 Constituição do envoltório e manutenção da forma nas bactérias

Segundo a coloração de Gram, existem duas categorias de bactérias, de acordo com as suas capacidades de retenção do corante cristal violeta pela diferença na espessura da parede

celular (GRAM, 1884). Ao término desta coloração as bactérias Gram-positivas tornam-se coradas em tom roxo, pois não ocorre a saída do complexo formado pelo cristal violeta e iodo após a desidratação com álcool, já que apresentam uma espessa camada de peptídeoglicano que se torna compactada neste processo. Em bactérias Gram-negativas, durante a sua desidratação, a fina camada de mureína permite a saída do complexo formado e, deste modo, a bactéria adquire uma coloração rosada quando observadas por microscopia ótica (GRAM, 1884). Bactérias Gram-positivas possuem uma densa camada de peptideoglicano ou mureína, que se encontra acima da membrana plasmática e na qual se encontram ácidos teicóicos. Existem, ainda, ácidos lipoteicóicos mergulhados simultaneamente na camada de mureína e na membrana citoplasmática (RUIZ & SILHAVY, 2006), Fig. 4a.

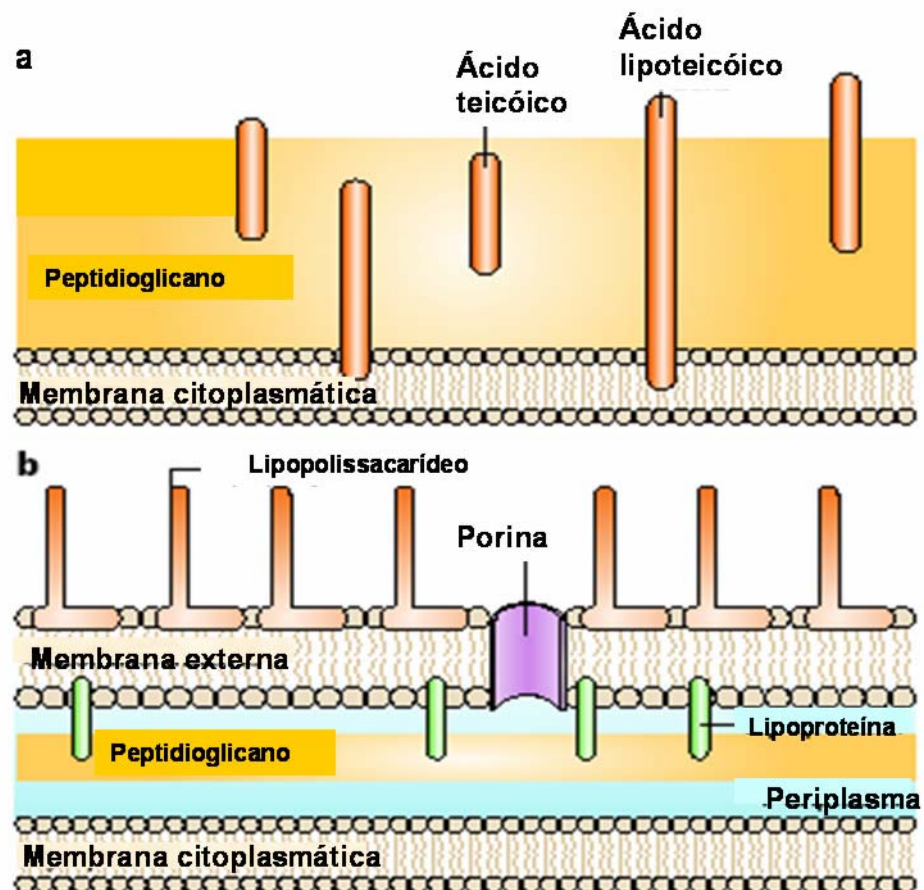


Figura 4: Esquema do envoltório de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b). Adaptado de: CABEEN & JACOBS-WAGNER, 2005.

Já o envoltório das bactérias Gram-negativas é composto por 2 membranas (uma interna e outra externa), separadas por um compartimento denominado espaço periplasmático que contém uma fina camada de peptideoglicano (Fig. 4b). Apesar das membranas interna e externa serem bicamadas lipídicas onde proteínas encontram-se inseridas, existem grandes diferenças na estrutura e composição destas membranas. A membrana interna (MI) está em contato direto com o citoplasma e com o periplasma e está envolvida em importantes funções como produção de ATP e síntese da parede de peptideoglicano entre outras. Já a membrana externa (ME) separa o periplasma do ambiente e possui propriedades físicas que funcionam como uma barreira seletiva que previne a entrada de algumas moléculas na célula (RUIZ & SILHAVY, 2006).

A ME apresenta assimetria lipídica na sua composição, já que o folheto interno é composto por fosfolípeos, enquanto o externo é composto quase exclusivamente por lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula de caráter hidrofílico, o que explica a baixa permeabilidade desta membrana a solutos lipofílicos. O LPS é um componente bastante antigênico do envoltório de bactérias Gram-negativas, sendo composto por lipídio A, por um núcleo oligossacarídico e por um polissacarídeo denominado antígeno O, que apresenta variado comprimento. O LPS é essencial para a função de barreira seletiva da ME, já que a forte interação lateral entre essas moléculas promove uma grande compactação desta membrana. Essas interações incluem a estabilização de cargas negativas por cátions divalentes, bem como interações entre cadeias de ácido graxo e entre componentes polissacarídicos (NIKAIDO, 2003).

Na MI estão presentes as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) que participam do processo de formação da parede celular, o que consequentemente contribuiu para a forma bacteriana. As PBPs possuem um papel fundamental na síntese e remodelamento de peptideoglicano e são alvos de alguns antibióticos, como os β -lactâmicos, já que estes se

ligam ao sítio ativo destas proteínas, bloqueando sua atividade (MACHEBOEUF *et al.*, 2006). As PBPs formam um complexo com hidrolases de peptideoglicano para inserir e modificar o novo peptideoglicano formado (VOLLMER *et al.*, 1999). No processo de remodelamento, degradação e reciclagem da camada de peptideoglicano ainda estão envolvidas glicosilases, endopeptidases e amidases que atuam ao longo do ciclo celular bacteriano (FISHER *et al.*, 2006).

Alguns autores acreditam que a parede celular confere rigidez e forma uma barreira contra lise osmótica (RUIZ & SILHAVY, 2006). No entanto, estudos mais recentes utilizando camadas de peptideoglicano purificadas de *E. coli* e analisadas através de microscopia de força atômica, sugerem que a parede celular seja flexível. Isto porque foi mostrado que esta estrutura pode ser deformada e posteriormente retornar à conformação original, uma vez que a pressão sobre ela seja removida (MORRIS & JENSEN, 2008).

Ainda sobre a manutenção da forma bacteriana, mais recentemente, outros componentes estruturais foram encontrados, como proteínas homólogas as do citoesqueleto dos eucariotos. Estas proteínas estão envolvidas tanto no processo de divisão celular quanto no controle de remodelamento do peptideoglicano, modificando seu formato (DANIEL & ERRINGTON, 2003; FIGGE *et al.*, 2004; MORRIS & JENSEN, 2008). Podem ser destacadas como proteínas de citoesqueleto bacteriano a MreB, que apresenta homologia com a actina e ainda outras proteínas a ela relacionadas, como a Mbl e a MreBH. Já a FtsZ, é uma proteína que apresenta homologia funcional à tubulina e forma o anel Z, que participa da divisão celular. Mais recentemente, tem sido proposto o papel da FtsZ na formação do septo e na inserção de peptideoglicano nascente na parede celular (JENKINS *et al.*, 2002; VARMA *et al.*, 2007).

1.7 Composição das membranas bacterianas

Normalmente os esteróis estão ausentes nas membranas bacterianas. Já a composição fosfolipídica pode ser variada, mas usualmente apresenta fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) e cardiolipina (CL). A PE e a CL formam domínios que podem contribuir para a localização de proteínas polares e seleção do local de divisão celular (MORRIS & JENSEN, 2008). A fosfatidilcolina (PC), fosfolípídeo majoritário em eucariotos, encontra-se especialmente em bactérias intracelulares, sejam elas parasitas ou simbioses de células eucariotas (LÓPEZ-LARA *et al.*, 2001).

A bicamada lipídica do envoltório celular é permeável a gases e pequenas moléculas lipofílicas e contém numerosas proteínas que formam canais, seja via transporte ativo ou sistemas de difusão facilitada, controlando o influxo e efluxo de íons e substâncias. Essas proteínas constituem aproximadamente 60% das membranas celulares e centenas delas ainda não foram identificadas (MORRIS & JENSEN, 2008). Estrutura atômica de aproximadamente 75 proteínas de membrana interna e 47 de membrana externa de bactérias Gram-negativas já foram determinadas (LOMIZE *et al.*, 2006).

1.8 Composição proteica da membrana externa

A membrana externa (ME) das bactérias Gram-negativas, tal como outras membranas biológicas, é formada fundamentalmente por uma bicamada de lipídios. Por isso, exibe baixa permeabilidade a solutos hidrofílicos, incluindo a maioria dos nutrientes. Assim, apresenta proteínas do tipo canais que são responsáveis pelo influxo e efluxo de nutrientes e possivelmente de restos metabólicos (NIKAIDO, 2003).

A ME possui dois tipos principais de proteínas: as lipoproteínas e as proteínas integrais (OMPs - *outer membrane proteins*), que constituem aproximadamente 50% desta membrana, sendo a ela ancoradas por meio de ligações a lipídios na extremidade N-terminal. Enquanto uma pequena parcela de OMPs são constitutivamente expressas, a maioria destas proteínas apresenta síntese induzida de acordo com as necessidades metabólicas da bactéria (KOEHNICK *et al.*, 2000). Cerca de 90% do total das lipoproteínas estão localizadas na ME e encontram-se ancoradas ao folheto interno, enquanto as lipoproteínas da MI estão ancoradas ao folheto externo. Deste modo, as lipoproteínas estão sempre voltadas para o espaço periplásmico (TOKUDA & MATSUYAMA, 2004).

As proteínas de ME são sintetizadas *in vivo* no citoplasma bacteriano com uma sequência de peptídio-sinal a ser posteriormente clivada por peptidases durante sua exportação. A translocação através da MI é dependente de maquinaria de proteínas da família Sec. Alguns modelos foram propostos para explicar a inserção destas proteínas na membrana externa. O primeiro deles sugere que as OMPs sejam diretamente inseridas em sítios de contato entre a MI e a ME, chamados zonas de adesão. Assim, de acordo com esta proposta, a proteína nunca passaria pelo periplasma (BAYER *et al.*, 1982). Um segundo modelo propõe que existam intermediários periplasmáticos e que, portanto, essas proteínas passariam pelo periplasma com intermediários solúveis até sofrerem inserção na ME (SEN & NIKKAIDO, 1990; EPPENS *et al.*, 1997). O terceiro modelo propõe que as formas intermediárias permanecem associadas no lado periplasmático da MI e se enovela com o novo LPS aí sintetizado, antes da inserção na ME (DE COCK & TOMMASSEN, 1996; BOLLA *et al.*, 1988), Fig. 5. Proteínas com ação catalítica, que participam do processo de enovelamento (DsbA e SurA) e chaperonas periplasmáticas, também podem participar deste processo (BUCHANAN, 1999). Alguns estudos de síntese proteica usando a porina PhoE, que transporta preferencialmente ânions em *E. coli*, sugerem que, uma vez enovelados, os

monômeros podem ser agrupados em trímeros antes de serem encaixados na membrana externa (de COCK & TOMMASSEN, 1996).

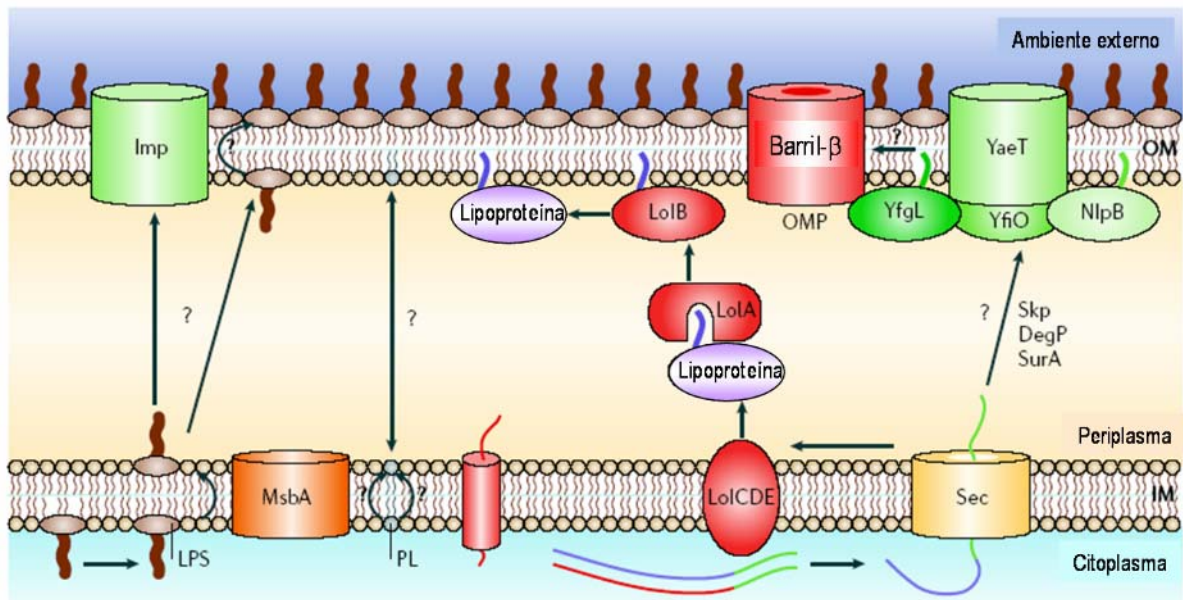


Figura 5: Esquema da biogênese da ME. Após a síntese do folheto interno da MI, o LPS e os fosfolipídios alcançam o folheto externo da MI por mecanismos ainda não bem esclarecidos. MsbA - participa da translocação do LPS e possivelmente dos fosfolipídios, através da membrana interna; OMP - proteínas com estrutura β pregueada presentes na ME; Sec- proteínas que formam o translocon na MI, permitindo a síntese e exportação simultânea das OMPs; LolA e LolB - chaperona do periplasma; LolCDE – chaperona de membrana interna; YaeT/YfgL/YfiO/NlpB – complexo proteico que participa da montagem das OMPs por um mecanismo ainda desconhecido. Adaptado de: RUIZ *et al.*, 2006.

1.9 As porinas

As porinas, um tipo especial de OMP, são diferentes de outras proteínas integrais da MI, pois ao invés de possuírem domínios transmembrana em motivo α - hélice, atravessam a

ME como folhas β -pregueadas, anfipáticas e antiparalelas (Fig. 6). A forma monomérica das porinas apresenta estruturas β -pregueadas com 8, 12, 14, 16 ou 22 passagens pela membrana (BUCHANAN, 1999; KOEBNIK *et al.*, 2000). Em geral esses monômeros são arranjados na membrana como homotrímeros bem resistentes à desnaturação por dodecil sulfato de sódio (HANCOCK, 1987), mas também podem ser encontradas como monômeros ou dímeros na membrana de acordo com a localização e função que desempenham, tais como atividade enzimática, transporte e lise celular (BUCHANAN, 1999). Tais proteínas adotam uma conformação semelhante a barris, a qual permite servir como canais ou poros (SCHULTZ, 2002).

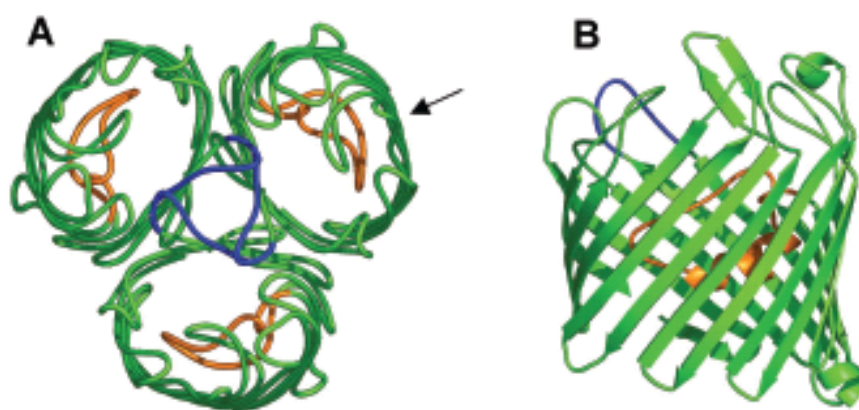


Figura 6: Esquema da estrutura de barril β da OmpF de *E. coli*. A: vista superior do arranjo em trímero. B: vista lateral do monômero indicada pela seta em A. NIKAIDO, 2003.

Outra característica estrutural interessante das porinas é que suas sequências quase invariavelmente terminam com uma fenilalanina na sua extremidade C-terminal, exceto em poucos casos em que este resíduo é o triptofano. As regiões transmembranares são conectadas a sequências hidrofílicas que formam “voltas” curtas no lado periplasmático e longos “loops” voltados para o espaço extracelular (NIKAIIDO, 2003).

Como as membranas são normalmente impermeáveis a solutos hidrofílicos, os canais que as porinas formam são essenciais para a captura de nutrientes e para a excreção de produtos tóxicos, transportando moléculas hidrofílicas com tamanho de até 600 Da. Os monômeros possuem em geral um peso molecular entre 33 e 44 KDa (CALDWELL *et al.*, 1981), e não apresentam especificidade a substrato, mas apenas alguma seletividade a cátions ou ânions. Além disso, as cargas elétricas da abertura e do interior do canal constituem um fator de seletividade iônica, que confere propriedades únicas a cada tipo de porina. A presença de porinas na membrana externa de bactérias intracelulares obrigatórias é fundamental nas trocas metabólicas com o hospedeiro eucarioto (KOEBNIK *et al.*, 2000).

De acordo com KLEBBA & NEWTON (1998), as bactérias Gram-negativas apresentam 3 classes de porinas: (i) as genéricas, não-específicas, exemplificadas pela OmpF, OmpC e PhoE, que transportam íons em *E. coli*; (ii) específicas para soluto, mas a ele ligando-se com baixa afinidade, como é o caso da LamB, que transporta maltodextrina; (iii) canais acoplados a receptores (*ligand gated*) e dependentes de gasto energético para mudança de conformação. Tais porinas, exemplificada pelo receptor ferroenterobactina (FepA), ligam-se com alta afinidade ao substrato e utilizam energia para facilitar o transporte de moléculas. Entretanto, é importante mencionar que para alguns autores, a palavra “porina” define apenas canais não-específicos (NIKAIDO, 2003)

Usualmente, a atividade dos canais formados pelas porinas é medido em células intactas através da determinação do fluxo de solutos hidrofílicos ou íons. No caso de proteínas nativas ou recombinantes purificadas, estas são reconstituídas em lipossomos, o que permite a medida do fluxo de íons através dos canais formados por monômeros (NIKAIDO, 1994).

A expressão das porinas pode ser depender da osmolaridade do meio, temperatura, pH e mudanças químicas do ambiente, e do papel que cada porina desempenha na fisiologia da célula bacteriana (DELIHAS & FORST, 2001; NIKAIDO, 2003). Além disso, a expressão

destas proteínas está sujeita a outro tipo de regulação, mediada por pequenos RNAs, que podem atuar na repressão de sua síntese. Em *E. coli* muitos dos gens envolvidos na síntese, montagem e homeostase das OMPs são regulados por σ^E , um fator sigma alternativo. O enovelamento das porinas por exemplo, é monitorado pelo sistema σ^E , que em resposta a presença de porinas não enoveladas ou mal enoveladas induz a expressão de genes que vão combater o problema. σ^E também regula a transcrição de sRNAs que por sua vez regulam a expressão de porinas em *E. coli* (VALENTIN-HANSEN, 2007).

Além das bactérias, algumas organelas das células eucarióticas também apresentam porinas, especialmente aquelas que possuem origem simbiótica. Nas mitocôndrias, as porinas são conhecidas como VDAC (*voltage-dependent anion channels*) e apesar de não estarem envolvidas na exclusão de metabólitos tóxicos, sua estrutura apresenta similaridade com o barril- β pregueado das porinas de bactérias Gram-negativas. Diversos grupos vêm mostrando que a permeabilidade das porinas mitocondriais é regulada por metabólitos, nucleotídeos e moduladores proteicos presentes do espaço intermembranar (HOLDEN & COLOMBINI, 1988; LIU & COLOMBINI 1991, 1992). Além disso, tem sido descrito que a troca de ATP/ADP via VADC exerce controle na respiração (LEE *et al.*, 1994) e no mecanismo de apoptose celular (SHIMIZU *et al.*, 2000). Os cloroplastos também possuem proteínas de ME que são resquício das porinas do procarioto ancestral, mantendo a estrutura de barril β e funcionando como canais com certa seletividade no transporte (DUY *et al.*, 2007). Os diferentes tipos de porinas encontradas nos cloroplastos apresentam especificidades distintas para os diversos substratos, sugerindo que possuem papéis diferentes em processos metabólicos e desafiando a idéia de que são poros não específicos (POHLMAYER *et al.*, 1997, BÖLTER *et al.*, 1999). Outro exemplo de organela na qual as porinas já foram descritas é o peroxissomo (REUMANN *et al.*, 1995; 1996).

Mais recentemente, foi descrito um complexo proteico formador de poro na membrana externa de uma Archea do gênero *Ignicoccus*, em cujo interior se encontra uma outra Archea da espécie *Nanoarchaeum equitans*. Tal complexo apresenta características similares às das porinas de bactérias Gram-negativas, ou seja, resistência à desnaturação térmica e à dissociação por detergentes. Porém, a estrutura proposta para tal complexo proteico difere da classicamente encontrada nas porinas, pois apresenta-se em α -hélice transmembrana ao invés de β -pregueado. Acredita-se que este complexo proteico exerce papel importante na interação entre as duas archeas já que a *Nanoarchaeum equitans* depende metabolicamente da célula hospedeira, inclusive para a sua divisão (BURGHARDT *et al.*, 2009).

As OMPs, que não funcionam como canais e não são classificadas como porinas, possuem funções variadas: podem apresentar atividade proteolítica (OmpT em *E. coli*), podem funcionar como adesinas (OLIVER *et al.*, 2003; RUIZ *et al.*, 2006) ou ainda como fatores de virulência em *E. coli* (VOGT & SCHULZ, 1999). Neste último caso, a OmpX que também está presente em *Yersinia enterocolitica* (KOEBNIK *et al.*, 2000) e em *Enterobacter cloacae* (DE KORT *et al.*, 1994) consegue se ligar a uma variedade de proteínas de superfície da célula hospedeira para realizar com sucesso os mecanismos de adesão e invasão. Em *Vibrio cholerae*, as OMPs também exercem importantes funções na fisiologia da bactéria, contribuindo para sua sobrevivência dentro das células hospedeiras bem como em ambientes variados (REIDL & KLOSE, 2002). Nesta bactéria, a OmpU permite a sobrevivência dos víbrios no intestino, fazendo com que o microrganismo seja mais resistente aos sais biliares (PROVENZANO & KLOSE, 2000), e outra Omp de 77 kDa possui expressão regulada por ferro (GOLDBERG *et al.*, 1990).

1.10 O envoltório do endossimbionte de tripanossomatídeos

Ao microscópio eletrônico de transmissão é possível observar que o endossimbionte de tripanossomatídeos é delimitado por duas unidades de membrana, tal como ocorre com bactérias Gram-negativas. Entretanto, a origem do seu envoltório é controversa, já que alguns autores acreditam que a ME pode ter sido originada a partir da célula hospedeira (CHANG, 1974), enquanto outros acreditam ser originada de um procarioto ancestral (GUTTERIDGE & MACADAM, 1971; SOARES & DE SOUZA, 1988; MOTTA *et al.*, 1991).

Evidências indicam que a parede que compõe o envoltório do endossimbionte de tripanossomatídeos encontra-se reduzida, tais como: ausência do septo bacteriano durante o processo de divisão (CHANG, 1974); a sensibilidade osmótica dos endossimbiontes quando isolados de seus protozoários hospedeiros (NEWTON, 1968) e resistência aumentada dos antibióticos β -lactâmicos em comparação a outras bactérias Gram-negativas (CHANG, 1974; MUNDIM *et al.*, 1974). Entretanto, cabe mencionar que os antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina e a cefalexina, promovem alterações ultraestruturais no endossimbionte e impedem a sua divisão. Isto indica que uma parede celular, ainda que degenerada, está presente no endossimbionte de tripanossomatídeos participando de importantes processos biológicos, como na manutenção da forma e na citocinese (MOTTA *et al.*, 1997a).

Quanto à composição lipídica das membranas do endossimbionte de *C. deanei*, sabe-se que esteróis estão ausentes e que o fosfolipídio majoritário é a CL, seguida de PC (PALMIÈ-PEIXOTO *et al.*, 2006). A PC não é comum em procariotos, mas está presente em bactérias que vivem intimamente associadas a células eucariotas (LOPEZ-LARA *et al.*, 2001). Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que o simbiote isolado do tripanossomatídeo *C. deanei* é capaz de sintetizar fosfolipídios após 3 horas de fracionamento

celular. Entretanto, a composição fosfolipídica é modificada, já que a PE é o fosfolipídio majoritariamente produzido, enquanto PC é encontrada em menores concentrações. Desta forma, é possível sugerir que a bactéria endossimbiótica obtém parte da PC ou os seus precursores metabólicos a partir da célula hospedeira (AZEVEDO-MARTINS *et al.*, 2007).

A composição proteica do endossimbionte de *C. deanei* foi pouco estudada. Em 1988, Novak e colaboradores sugeriram que ele contém entre 5% e 10% do total de proteínas do protozoário hospedeiro. Outra informação interessante é que frações de endossimbionte obtidas do protozoário hospedeiro incorporam [³H]-leucina e [³⁵S]-metionina em proteínas, indicando que são capazes de síntese independentemente da célula hospedeira após poucas horas de isolamento. Através da técnica de criofratura, foi possível verificar que os endossimbiontes presentes em *C. deanei*, *C. desouzai* e *B. culicis* apresentam uma grande quantidade de proteínas transmembranares no folheto externo da ME. Este número de proteínas é similar ao descrito para ME de bactérias Gram-negativas e bastante superior àquele encontrado na membrana plasmática do protozoário hospedeiro. Estes dados indicam que a ME do endossimbionte tem origem procariota, não derivando da célula hospedeira (SOARES & DE SOUZA, 1988; MOTTA *et al.*, 1991).

A presença de porinas e de outras proteínas características de membrana de bactérias Gram-negativas no envoltório do simbiote de *C. deanei* pode confirmar o caráter Gram-negativo desta bactéria, que é classificada na subdivisão β das proteobactérias e apresenta maior similaridade de RNA ribossomal 16S com procariotos do gênero *Bordetella* (DU *et al.*, 1994). Dados obtidos no projeto genoma do endossimbionte de *C. deanei*, que está em fase final de anotação, indicam a *B. parapertussis* como possível ancestral (PROBST *et al.*, 2006).

O gênero *Bordetella* inclui sete espécies e as mais estudadas são: *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*. A espécie *B. pertussis* é responsável por infecções respiratórias somente em humanos. Já a *B. parapertussis* causa infecções em humanos e

ovelhas e a *B. bronchiseptica* infecta algumas espécies de animais, incluindo humanos. Estes patógenos produzem uma grande variedade de fatores de virulência, dentre os quais toxinas, citotoxinas, hemolisinas, porinas e outras proteínas de ME (BOURSAUX-EUDE & GUIZO, 2000). Em *B. pertussis*, ocorre expressão de ao menos duas porinas: a principal delas, a porina OmpP, codificada pelo gene *ompP*, que parece ser expressa sob condições moduladas e não-moduladas (ARMSTRONG *et al.*, 1986) e OmpQ de 39,1 kDa, codificada pelo gene *ompQ* (também presente em *B. paraptus* e *B. bronchiseptica*) e expressa constitutivamente (FINN *et al.*, 1995).

Outras proteínas de ME presentes no gênero *Bordetella* são a pertactina (PRN), BfrA, BfrB, e BfrC. A PRN é uma proteína que pertence à família de autotransportadores do tipo V (HENDERSON *et al.*, 1998, 2000; HENDERSON & NATARO, 2001) com habilidade de catalisar seu próprio transporte através da membrana e relacionada com a aderência a tecidos hospedeiros (LENINGER *et al.*, 1991, 1992). A PRN possui massa molecular aparente de 69 kDa em *B. pertussis*, 70 kDa em *B. paraptus* e 68 kDa em *B. bronchiseptica* (CHARLES *et al.*, 1989; LI *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1992). Em *B. Pertussis*, a PRN possui a capacidade de estimular a produção de anticorpos específicos (BRENNAN *et al.*, 1988). Já as proteínas BfrA, BfrB e BfrC são receptoras de membrana que são reguladas por disponibilidade de ferro e parecem estar envolvidas em captação de complexo de ferro. A BfrA é específica de *B. bronchiseptica*, enquanto BfrB e BfrC são muito conservadas no gênero *Bordetella* (NICHOLSON & BEALL, 1999).

2 JUSTIFICATIVA

Desde a década de 70 existem controvérsias sobre a origem da ME, um componente do envoltório do endossimbionte de tripanossomatídeos. Alguns autores acreditam que esta membrana se origina, ao menos em parte, da membrana plasmática do protozoário hospedeiro durante o processo de englobamento. Já outros autores acreditam na natureza procariota da membrana externa.

Estudos recentes sobre o endossimbionte de *C. deanei* mostraram ausência de esteróis nas membranas, como em outras bactérias. Entretanto, observamos a presença de PC, um fosfolípido incomum em procariotos, exceto naqueles que possuem estreita relação simbiótica ou de parasitismo com células eucariotas. Além disso, os simbiontes isolados sintetizam menores quantidades de PC, quando comparados a simbiontes residentes na célula hospedeira. Este dado, juntamente com o fato do endossimbionte não apresentar as principais enzimas da via de síntese de PC, nos faz acreditar que parte deste fosfolípido é obtido a partir do tripanossomatídeo hospedeiro.

Sabe-se muito pouco sobre a composição proteica do envoltório do endossimbionte. Estudos de criofratura revelaram que o número de proteínas integrais presentes na ME é similar aquele descrito em bactérias Gram-negativas. Entretanto, até o momento, nunca foi demonstrada a presença de uma proteína característica desta membrana no endossimbionte de tripanossomatídeos. No presente trabalho realizamos a identificação, a caracterização e a localização de uma proteína similar à porinas no endossimbionte de *C. deanei*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Identificar uma proteína semelhante a porina no envoltório do endossimbionte de *Crithidia deanei*.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a ultraestrutura de *C. deanei* e das frações de simbionte obtidas;
- verificar a presença de sequências de genes que possuem homologia com porinas de bactérias Gram-negativas no genoma do simbionte;
- verificar a similaridade da sequência do gene da porina com as espécies do gênero *Bordetella*, bactérias ancestrais do endossimbionte;
- verificar a predição da estrutura secundária da proteína através de ferramentas de bioinformática;
- clonar, expressar e purificar a proteína semelhante à porina recombinante;
- utilizar a proteína purificada para a produção de anticorpos em camundongo;
- imunolocalizá-la por microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão.

4 METODOLOGIA

4.1 Cepas e condições de cultivo

Células da espécie *C. deanei*, cepas normal e curada (MUNDIM *et al.*, 1974), foram cultivadas em meio Warren (WARREN, 1960) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cultilab). Os protozoários foram mantidos através de repiques, de 1:10 de cultura de células em fase logarítmica de crescimento em meio fresco a 28 °C. As culturas foram crescidas em recipientes de vidro, como tubos de ensaio (10 mL) e garrafas de volume (100 mL). Em seguida, as células foram mantidas por 24 h em estufa a 28 °C. Após este período, os protozoários em cultura de 3 mL foram armazenados a 4 °C em tubos de vidro (10 mL) na geladeira.

4.2 Obtenção das frações de endossimbionte e mitocôndria

Para isolar o endossimbionte de *C. deanei*, utilizou-se a técnica de fracionamento celular estabelecida por ALFIERI *et al.* (1982) com algumas modificações, como descrito a seguir. Culturas de *C. deanei* de 800 e 1.200 mL foram centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram lavadas 2 vezes com PBS 10 mM pH 7,2 (solução salina tamponada com fosfato de sódio 0,002 M; NaCl 0,9%), e centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos a 4° C em centrífuga Sorvall (RC-5B *Refrigerated Superspeed Centrifuge* – Du Pont Instruments) rotor GSA. O sedimento obtido foi ressuspensão em 4 - 7 mL de água deionizada gelada e mantido a 4 °C, em banho de gelo, por cerca de 35 minutos. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos na mesma centrífuga e ressuspensas em 10 a 13 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M. O rompimento celular foi realizado em banho de gelo por ultrassom (*Ultrasonic processor*

model GEX-600), por três sessões de três séries de pulsos de 15 s com amplitude de 10%. Entre cada série de pulsos foi dado um intervalo de um minuto para promover a sedimentação das células inteiras, o que otimizou o rompimento. Em seguida, ao lisado foi adicionado um volume de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M, CaCl₂ 2 mM e MgCl₂ 10 mM e 25 µg/mL de DNase I (Sigma) para 20 mL em proveta de 50 mL, que foi incubada em estufa a 25 °C por 30 minutos. Após este período, adicionaram-se 10 mL de tampão tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mM. O volume total de 30 mL foi homogeneizado e centrifugado a 5.000 g por 20 minutos em centrífuga Sorvall (rotor SS-34). O sedimento obtido foi ressuspensão em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e 0,5 mg/mL de protease tipo XIV de *Streptomyces griseus* (Sigma). Em seguida, a solução foi centrifugada por 20 minutos a 4.000 g (Sorvall) e o sedimento formado foi ressuspensão em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e EDTA 2 mM. Com o objetivo de retirar as células inteiras de tripanossomatídeos, o homogeneizado foi colocado sob colchão de sacarose 0,5 M em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 (proporção de 2,5 mL de homogeneizado celular para 2,5 mL de tampão contendo sacarose). Após centrifugação a 550 g em centrífuga refrigerada (Spin IV – Incibrás) a 4 °C por 10 minutos, o sedimento contendo as células inteiras foi descartado e parte do sobrenadante contendo endossimbiontes e mitocôndrias (a banda formada na parte superior de cada tubo) foi recolhida e centrifugada a 4.000 g (Sorvall rotor SS-34) por 10 minutos a 4°C. O sedimento obtido (rico em endossimbiontes) foi separado e o sobrenadante, após centrifugação a 7.700 g (Sorvall rotor SS-34) por 10 minutos a 4°C, deu origem a um novo sedimento, que equivale à fração de mitocôndrias. O sedimento rico em endossimbionte foi ressuspensão em 6 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e aplicado sobre um gradiente de sacarose: foram utilizados 6 tubos contendo 1 mL de uma solução 0,88 M de sacarose, sobre esta camada foram adicionados 2 mL de solução 0,44 M de

sacarose e no topo 1 mL do homogeneizado celular. Após centrifugação a 1.740 g por 30 minutos em centrífuga Beckman (L8-70M *ultracentrifuge*, com rotor SW 50.1) a 4 °C, obteve-se uma fração purificada de endossimbiontes no sedimento, após eliminação dos fragmentos mitocondriais contaminantes, que se localizaram no sobrenadante.

4.3 Extração do DNA do endossimbionte

O DNA da fração de endossimbiontes foi extraído segundo AUSUBEL *et al.* (1988), como descrito sucintamente: o sedimento contendo endossimbiontes foi ressuspensão em Tris HCl 10 mM, pH 7,5 (TE) e EDTA 1 mM. Em seguida, adicionou-se tampão de lise contendo EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, SDS 0,5% e proteinase K 2mg/ml diluídos em Tris HCl 10 mM. Seguiu-se incubação por 1 hora a 55 °C. A extração do DNA foi feita com 1 volume de fenol/clorofórmio e a precipitação com 1/10 de volume de acetato de sódio 3 M, pH 6,0 e 2 volumes de etanol absoluto por 30 minutos em gelo seco. A amostra foi centrifugada a 13.000 g por 5 minutos a 4 °C. Após lavagem com etanol 70%, o sedimento contendo DNA foi seco e então ressuspensão em Tris HCl 10 mM, pH 7,5 (TE) e EDTA 1 mM.

4.4 Purificação do DNA do endossimbionte em gradiente de cloreto de cério

Durante o fracionamento celular, obtivemos endossimbiontes bastante purificados. Entretanto, para garantir a pureza do DNA do endossimbionte precisamos eliminar DNA de outras origens tais como aqueles do cinetoplasto e dos próprios tripanossomatídeos restantes, que podem eventualmente estar presentes. Assim adicionou-se 1 g de CsCl por ml de suspensão de DNA extraído do endossimbionte (item 4.3). Após suave agitação, adicionaram-se 80 µL de brometo de etídeo (EtBr) 10 mg/mL para cada 2 mL da solução de DNA/CsCl.

Seguiu-se centrifugação em rotor vertical (65Ti – Hitachi), a 50.000 rpm por 16 h a 4 °C. O RNA e as proteínas do endossimbionte depositaram-se na parede dos tubos e o DNA formou uma densa banda, vista com o auxílio de uma lâmpada de UV. Uma agulha acoplada a uma seringa de 10 mL foi então usada para perfurar o tubo plástico e recolher o DNA. Em seguida, foram misturados iguais volumes do DNA recolhido e álcool n-butílico (saturado com água). O álcool extrai o EtBr, deixando o DNA dissolvido em CsCl e após centrifugação de 2 minutos a 560 g, o sobrenadante contendo álcool e EtBr foi descartado. O restante da suspensão do DNA foi dialisado e quantificado em espectrofotômetro. Uma alíquota do DNA foi submetida à eletroforese em gel de agarose (BioRad) 0,8% em tampão TAE (Tris-base 0,02 M, de ácido acético glacial 0,12% e EDTA 0,001 M pH 8,0) para verificar sua integridade.

4.5 Busca de sequências de proteínas homólogas à de porinas de bactérias Gram-negativas no banco de dados de referências genômicas do endossimbionte de *C. deanei*

Embora o genoma do simbionte não esteja completamente anotado, os contíguos até o momento descritos foram utilizados para a busca de genes que codificam proteínas similares à porinas de bactérias Gram-negativas. O projeto genoma do endossimbionte de *C. deanei* vem sendo realizado em colaboração com o Dr. Marco Aurélio Krieger e o Dr. Christian Probst do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP, Fiocruz - Paraná) e está em fase de conclusão. O programa BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (NCBI) foi utilizado, juntamente com o programa Prompt do Windows, para comparar as informações presentes no genoma do endossimbionte, com aquelas já descritas para o gênero *Bordetella*, possível ancestral. A pesquisa genômica da porina putativa foi iniciada criando-se um banco de dados

no formato FASTA através dos comandos de busca “*porin[all fields] Bordetella[organism]*” (proteínas com o nome porina do gênero *Bordetella*), do banco de dados PROTEIN do NCBI (2007). A busca gerou 101 sequências que foram cruzadas com o banco de dados do genoma do endossimbionte (PROBST *et al.*, 2006) com o “*e value*” de $e10^{-5}$.

Também foi realizada uma consulta ao BLAST através do ExPASy BLAST2 Interface (<http://www.expasy.ch/tools/blast/>), contra o banco de dados de proteínas de bactérias gram-negativas para a obtenção dos alinhamentos com as maiores similaridades entre sequências de aminoácidos.

4.6 Predição estrutural

A predição estrutural da porina putativa foi realizada através da utilização de sua sequência de aminoácidos deduzida do gene no programa PRED-TMBB, utilizando-se os três métodos disponíveis: Viterbi, N-best e Posterior decoding (BAGOS *et al.*, 2004). A representação gráfica das estruturas de barril β foi feita com TMRPres2D.

4.7 Modelagem molecular comparativa

Foi realizada uma busca por similaridade entre a sequência de aminoácidos da porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* e as de outras proteínas através do Blastp (ALTSCHUL *et al.*, 1990) no Protein Data Bank – PDB (BERMAN, 2000) em busca de um modelo comparativo adequado. Para a predição do peptídeo sinal foi utilizado o *software* Signalp 3.0 (NIELSEN *et al.*, 1997) e para o alinhamento das sequências utilizou-se o PROMALS (PEI & GRISHIN, 2007). Os modelos moleculares foram construídos com o MODELLER 9v5 (ESWAR *et al.*, 2000). Os *loops* do modelo foram refinados utilizando-se o

protocolo de refinamento do Modeller. A qualidade estereoquímica dos modelos gerados foi avaliada através do gráfico de Ramachandran criados com o auxílio do PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993). O *software Visual Molecular Dynamics* (HUMPHREY *et al.*, 1996) foi utilizado para a visualização da estrutura. O RMSD (*Root Mean Square Deviation*) foi calculado com o *software* Swiss-PdbViewer (GUEX & PEITSCH, 1997).

4.8 Clonagem do gene da proteína semelhante à porina do endossimbionte

4.8.1 Desenho dos iniciadores para amplificação por PCR

A sequência do gene da porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* foi utilizada como base para o desenho dos iniciadores. Os oligonucleotídeos *primer forward porina* (5'- AATA **GGA TCC** AAA AAA ACT CTG CTT GCA GCT G-3') contendo o sítio de restrição *Bam*HI (sequência em negrito no iniciador) e *primer reverse porina* (5'- TATT **AAG CTT TTA** GAA GCG ATG ACG CAT ACC -3') contendo o sítio de restrição *Hind*III (sequência em negrito no iniciador) e um códon de terminação (em azul), ambos com T_m de 62 °C, foram desenhados manualmente de acordo com a sequência de DNA do gene semelhante à porina identificado no contig 987 do genoma do endossimbionte.

4.8.2 Condições de reação de PCR , purificação do produto amplificado, digestão com enzimas de restrição e ligação do inserto com o vetor

O DNA purificado do endossimbionte foi submetido a reações de PCR utilizando-se as seguintes condições:

Reagentes	Volume utilizado para reação de 10µL
Tampão da enzima 5x	2 µL
dNTPs 10 mM	0,2 µL
<i>Primer Forward porina</i> 10 µM	0,2 µL
<i>Primer Reverse porina</i> 10 µM	0,2 µL
Enzima elongase	2,5 U
DNA purificado simbionte	100 ng
Água livre de nucleases	6,2 µL

Foram realizadas 10 reações no termociclador MiniCycler utilizando a temperatura de 94° C durante 2 minutos para a desnaturação da dupla fita de DNA. Em seguida foram realizados 35 ciclos de anelamento dos *primers* e amplificação do DNA nas seguintes condições: 94° C durante 30 segundos, 55° C durante 1 minuto e 68° C durante 2 minutos. O término da reação ocorreu a 68° C durante 7 minutos.

Uma alíquota de 2 µL do produto de PCR obtido foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% em tampão TAE contendo BrEt 0,5 µg/mL para verificar se a sequência do gene da porina putativa foi amplificado como esperado, ou seja, resultando num fragmento de aproximadamente 1,2 Kb.

O produto do PCR foi então purificado utilizando-se o *kit* GFX PCR (*GE Healthcare*) de acordo com a metodologia especificada. Em seguida, cerca de 500 ng em 100 µL de água livre de nucleases foram utilizados na reação de digestão, dos quais 10 µL foram utilizados para corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% e 90 µL para a digestão enzimática pela enzima de restrição *Bam*HI (10,3 µL de tampão *Bam*HI 10X -Promega; 1 µL de BSA 100X; 2 µL de enzima *Bam*HI -Promega) realizada durante a noite à 37° C.

O produto da reação foi submetido novamente aos procedimentos descritos pelo *kit* GFX PCR (*GE Healthcare*), ressuspensão em 100 µL de água livre de nucleases. Uma nova

corrida eletroforética de gel de agarose 1,5% em tampão TAE contendo BrEt 0,5 µg/mL foi realizada com uma alíquota de 10 µL da amostra purificada e os 90 µL restantes foram submetidos à digestão enzimática pela enzima de restrição *HindIII* (10,2 µL de tampão 2 para *HindIII*-Promega; 2,0 da enzima *HindIII*-Promega) *overnight* à 37° C. O produto da reação foi novamente purificado de acordo com a metodologia do Kit GFX PCR da marca GE e o sedimento foi ressuspenso em 50 µL de água livre de nucleases, dos quais uma alíquota foi utilizada para corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% em tampão TAE.

Em seguida, foi realizada a reação de ligação da sequência do gene digerido pelas enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* com o vetor pET21d His-Tev (Novagen) como descrito abaixo. Este plasmídeo contém o gene de resistência ao antibiótico ampicilina. O vetor apresenta ainda uma sequência codificante de 6 aminoácidos de histidina fusionada com a sequência codificante do sítio proteolítico *nTev* proveniente do vírus do mosaico do tabaco (*Tabacco etch virus*), cujo objetivo é permitir a retirada da cauda de histidina após a purificação da proteína recombinante em coluna de níquel. A expressão da proteína recombinante é feita através da indução do operon *lac* pelo indutor IPTG.

O vetor previamente digerido com *BamH I* e *Hind III* e desfosforilado pela enzima *calf intestine phosphatase* (CIP) (para evitar religação do vetor sem inserto) foi utilizado para ligação com o fragmento de DNA purificado na relação 1:3 (em massa). Para a reação de ligação foram usados: 2 µL de T4 DNA *buffer* 10x (USB); 8,34 ng do vetor; 25 ng do fragmento amplificado por PCR e digerido com *BamHI* e *HindIII*; 1 U de enzima T4 DNA ligase (USB); 10 µL de água livre de nuclease. A reação foi realizada durante a noite à temperatura ambiente. O produto da reação foi precipitado com n-butanol (20 µL da reação; 30 µL de água livre de nuclease; 500 µL de n-butanol) seguido por agitação em vórtex e centrifugação a 11.000g em centrífuga Eppendorf 5804 por 10 minutos a 25°C. O

sobrenadante foi retirado e o sedimento deixado ao ar livre durante 1 hora para secar e posteriormente ressuspenso em 10 µL de água livre de nuclease.

4.9 Bactérias utilizadas nos procedimentos de clonagem e expressão

Para os procedimentos de clonagens, foram utilizados a *Escherichia coli* da cepa DH5α (Promega) contendo mutações nos genes *recA1* e *endA1*, que previnem eventos de recombinação proporcionando maior estabilidade do inserto e melhora na qualidade dos plasmídeos isolados, respectivamente (Tab. 2).

Já, as cepas BL21 (λDE3), Rosetta (λDE3) e Codon Plus (RIL), (todas da Novagen), foram utilizadas para expressão das proteínas recombinantes. As duas primeiras carregam em seus genômas o gene da T7 RNA polimerase (proveniente do bacteriófago λ) que é controlado pelo promotor *lacUV5*. Contudo, as cepas Rosetta (λDE3) e Codon Plus (RIL) acentuam a expressão de diversas proteínas, pois carregam plasmídeos que expressam RNAs transportadores para os aminoácidos Arg, Leu e Ile; e Arg, Leu, Ile, Pro e Gly, respectivamente (Tab. 2).

As quatro cepas foram crescidas rotineiramente em meio LB (SAMBROOK & RUSSELL, 2001), sendo a DH5α a única cepa não susceptível à expressão de proteínas clonadas em vetor pET (Novagen).

Tabela 2: Cepas de *E. coli* com seus respectivos genótipos.

Cepa	Genótipo
DH5 α	<i>F</i> - 80 <i>dlacZ</i> , <i>M15</i> (<i>lacZYA-argF</i>), <i>U169</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> -, <i>mk</i> +), <i>phoAsupE44</i> - <i>thi</i> -1, <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
Codon Plus - RIL	<i>E. coli</i> B <i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , <i>endA</i> , Hte [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^R]
Rosetta (λ DE3)	<i>F</i> ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> _B (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3) pRARE2 (Cam ^R)
BL21 (λ DE3)	<i>E. coli</i> B <i>F</i> ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>rB</i> ⁻ <i>mB</i> ⁻), <i>gal</i> λ (DE3)

4.10 Transformação por eletroporação de bactérias DH5 α

O produto da reação de ligação foi utilizado para eletroporação de células de *Escherichia coli* DH5 α (Promega) eletrocompetentes (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) em meio LB líquido (Bacto-triptona 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 5 g.L⁻¹; NaCl g.L⁻¹) em eletroporador BioRad nas condições de 2,5 KV e 25 μ F. O produto da eletroporação foi rapidamente transferido para tubo com um volume final de 1 mL de meio LB líquido, sendo submetido à agitação a 37° C durante 1 hora. A cultura foi centrifugada a 5.000 g em centrífuga Eppendorf 5804 por 15 segundos a 25°C e ressuspenso em um volume de 100 μ L de LB e posteriormente plaqueada em meio LB sólido (contendo 1,5% de ágar) com 100 μ g/mL de ampicilina. O crescimento bacteriano ocorreu durante a noite a 37 °C.

Algumas colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas e repicadas em outra placa de LB sólido com 100 μ g/mL de ampicilina, que foi deixada a 37 °C durante a noite. Foram selecionados seis clones recombinantes que continham o inserto. Estes foram cultivados em 10 mL de meio LB líquido com ampicilina a 100 μ g/mL. O crescimento foi realizado durante a noite em agitação a 37° C.

Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 5.000 g em centrífuga Eppendorf 5804 por 10 minutos a 25°C e os plasmídios purificados com o kit Miniprep da (Promega),

foram ressuspensos em 100 μ L de água livre de nuclease. Uma alíquota de 2 μ L foi utilizada para corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% em tampão TAE contendo BrEt 0,5 μ g/mL. Outra alíquota de 2 μ L foi utilizada para quantificar o DNA presente nas amostras em espectrofotômetro *Ultrospec 2100 Pro*-Amersham Bioscience.

Após quantificação das preparações plasmídeais dos clones de interesse, foram realizadas reações em volume final de 10 μ L, contendo 250 ng do plasmídeo recombinante e 3,2 μ M dos iniciadores *T7Promoter* e *T7Terminator* (em tubos separados) e 7,5 μ L do kit de sequenciamento *DYEnamycTM ET Terminator Cycle Sequencing Premix Kit[®]* (GE Healthcare), seguindo o protocolo do fabricante, o sequenciamento realizado no aparelho automático ABI3730 (*Applied Biosystems*).

Os resultados das reações de sequenciamento foram obtidos por análise dos eletroferogramas no programa *BIOEDIT* versão 7.0.5.3 (disponível na internet). As sequências de bases foram comparadas com a do gene semelhante à porina identificado no contig 987 do genoma do endossimbionte.

No eletroferograma, as regiões com ambiguidade foram representadas por “N”, o que indica a presença de alelos distintos. Para caracterizar a ambiguidade observada no sequenciamento direto do DNA plasmidial como uma variação, a mesma deveria ser lida no eletroferograma da fita complementar, caso não fosse verificada a ambiguidade em ambas as fitas, a hipótese de mutação era descartada, e o plasmídeo estocado a -20°C.

4.11 Expressão da proteína recombinante em cepas de *E. coli*

4.11.1 Transformação por choque térmico

Utilizando plasmídeos pET21d-His-Tev-porina a partir de clones das amostras do sequenciamento, foram realizadas transformações por choque térmico em diferentes cepas de *Escherichia coli*: BL21 (λ DE3), Rosetta (λ DE3) e Codon Plus (RIL), (todas da Novagen). Foram adicionados 137 ng de vetor do plasmídeo recombinante em tubo eppendorf contendo bactérias competentes preparadas em cloreto de cálcio (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), que foi posteriormente colocado em banho de gelo durante 30 minutos. O tubo foi então retirado e colocado em banho-maria a 42 °C por um minuto e resfriado novamente em banho de gelo. Ao tubo com as bactérias transformadas foram adicionados 800 μ L de meio LB líquido e posteriormente colocado em agitação a 37 °C durante 1 hora. Após a recuperação celular, as células foram centrifugadas a 5.000 g (Eppendorf 5804) por 5 minutos, ressuspensas em 100 μ L de LB líquido e plaquedas em meio LB sólido com ampicilina 100 μ g/mL, para BL21(DE3), e ampicilina 100 μ g/mL e cloranfenicol 34 μ g/mL, para Rosetta e Codon Plus. As placas foram levadas à estufa 37° C durante a noite.

4.11.2 Teste de expressão da proteína recombinante

Para verificar se cada cepa de *E. coli* transformada com o plasmídeo pET21d-His-Tev-porina expressava adequadamente a proteína recombinante foi realizado um teste de expressão. Foram utilizadas alíquotas de 100 μ L de culturas de 3 clones recombinantes de cada cepa de bactéria crescidos durante a noite em 5 mL de meio LB com ampicilina 100 μ g/mL

para BL21(DE3) e 34 µg/mL de cloranfenicol, 100 µg/mL de ampicilina para Rosetta e Codon Plus. As bactérias foram cultivadas em banho com agitação (200 rpm) a 37 °C. Após atingirem uma densidade ótica de 0,8 a 600 nm, as bactérias foram induzidas com 0,5 mM de IPTG (um análogo da lactose, que estimula a superexpressão da proteína recombinante), exceto um tubo controle, correspondente a cada cepa, que foi identificado como não-induzida. Os tubos foram incubados em agitação a 37 °C por mais 3 horas. Uma alíquota de 1 mL de cada tubo com absorbância de aproximadamente 1,5 foi retirada para avaliação da indução da expressão por gel SDS-PAGE a 12% de poliacrilamida e *Western Blot* (item 4.22), utilizando o anticorpo primário anti-histidina (Santa Cruz Biotechnology).

4.12 Eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e coloração das proteínas

Para avaliação das proteínas foram realizadas corridas eletroforéticas unidimensionais em gel desnaturante de poliacrilamida na concentração de 12% contendo SDS (SDS-PAGE) em tampão de corrida (Tris 250 mM, glicina 1,92 M e SDS 1% pH 8,3). As corridas foram realizadas em sistema Bio-Rad a 30 mA.

Os géis foram corados por Coomassie Blue (R-250) ou por Coomassie Coloidal (G-250). No primeiro caso, os géis foram corados por 1 hora em uma solução Coomassie Blue R-250 0,2% (USB) em 40% etanol (VETEC) e ácido acético 7% (VETEC), em água, e descorados com uma solução aquosa de metanol 40% (VETEC) e ácido acético 10% (VETEC).

Para coloração Coomassie Coloidal, os géis foram fixados com metanol 30%, ácido fosfórico 2% (Merck) em água por 40 minutos e lavados rapidamente com solução de ácido fosfórico 2% (Merck). Em seguida, os géis foram corados com uma solução contendo etanol 18% (VETEC), ácido fosfórico 2% (Merck), sulfato de amônio 15% (USB) e 1% de uma

solução contendo 20 g de Coomassie G-250 (USB) por litro de água durante 24 a 72 horas sob agitação moderada. A coloração inespecífica (*background*) foi removida com água.

4.13 Crescimento de bactérias BL21(DE3)/pET21d-His-Tev-porina para purificação da porina putativa recombinante

Uma alíquota de 1 mL de cultura da bactéria BL21(DE3)/ pET21d-His-Tev-porina foi incubada em durante a noite a 37 °C, sob agitação (200 rpm) inoculada em 50 mL com ampicilina 100 µg/mL. Após o crescimento, esta cultura de bactérias foi utilizada para inocular 4L do mesmo meio de cultura. A densidade ótica a 600 nm foi acompanhada em espectrofotômetro até atingir 0,8, quando realizou-se a indução da expressão da porina recombinante com 0,5 mM de IPTG. A cultura foi novamente incubada sob agitação a 37 °C durante 4 horas e então centrifugada em centrífuga Sorvall, rotor GSA, a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento congelado a -20° C.

4.14 Abertura de corpo de inclusão, lise celular e solubilização da proteína recombinante

O sedimento de BL21(DE3) foi descongelado, mantido em gelo e ressuspensos em 5 mL de tampão A (Tris-HCl 50mM, pH 8,0; de NaCl 100 mM; de β-mercaptoetanol 5 mM), com de PMSF 1 mM. À suspensão celular foram adicionados de lisozima 1 mg/mL (etapa 1). A amostra foi incubada em banho de gelo por 30 minutos sob agitação e então adicionou-se DNase para uma concentração final de 10 µg/mL e de MgCl₂ 5 mM, mantendo-se a suspensão no gelo por mais 30 minutos (etapa 2). A amostra foi sonicada com 6 ciclos de 30 segundos,

com intervalo de 1 minuto (etapa 3). O lisado foi submetido à centrifugação em Sorvall rotor SS34 durante 20 minutos a 4 °C. O sedimento foi então ressuspensão em 20 mL de tampão A com Triton X-100 1% e ureia 8 M e deixado durante a noite sob agitação a 4 °C. Após cada etapa do procedimento de lise uma alíquota foi retirada para análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%.

4.15 Purificação em coluna com resina de níquel

A coluna contendo resina de níquel (HisTrap GE) foi previamente equilibrada com um volume de 100 mL de tampão A. A amostra obtida após a suspensão do sedimento em tampão A com Triton X-100 1% e ureia 8 M (item 4.13) foi transferida para a coluna e foi recolhido todo o material que não se ligou à coluna. Foram realizadas 4 lavagens utilizando-se 40 mL de tampão A em cada uma. Posteriormente a coluna foi eluída com tampão A contendo 8 M de ureia e 0,5 M de imidazol, obtendo-se um volume final de 15 mL.

Para a eluição da coluna durante a segunda purificação em coluna de Níquel His-Trap (Qiagen) foi utilizado o tampão TEN (Tris- HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM) contendo 0,1% de ASB-14 (Calbiochem, EUA) com gradiente crescente de imidazol (0,01M a 0,5 M). Após cada etapa de passagem da amostra pela coluna, lavagens e eluição foram retiradas uma alíquota para análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% (item 4.12).

4.16 Reconstituição do enovelamento da proteína recombinante

O reenovelamento da proteína recombinante foi realizado diluindo-se a amostra lentamente, com auxílio de bomba peristáltica ou através de diálise. Inicialmente foi realizada diluição da amostra 1:1 em tampão TEN (Tris- HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 100

mM) contendo 10% de ASB-14 (Calbiochem, EUA). A amostra foi posteriormente sonicada durante 10 minutos e diluída novamente 1:20 em tampão TEN contendo 0,5% de ASB-14 com auxílio de bomba peristáltica.

Para a retirada da ureia por diálise, uma alíquota de 1 mL obtida após eluição da coluna (item 4.14) foi transferida para cassete de diálise com corte de 3.500 Da (Pierce). A diálise foi realizada contra tampão TEN contendo 0,5% de ASB-14 (Calbiochem, EUA).

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra obtida após diluição lenta e diálise foram analisadas em fluorímetro (Hitachi F4500), para verificação do reenovelamento da proteína recombinante.

A amostra obtida após diluição lenta foi filtrada em filtro de 0,45 µm para retirada de qualquer material agregado e novamente purificada em coluna contendo resina de Níquel (His-Trap), previamente equilibrada com o mesmo tampão diluente da amostra que contém a proteína recombinante. A amostra eluída da coluna de resina de níquel contendo a proteína recombinante foi concentrada em sistema Amicon com corte de 10.000 Da, reduzindo-se o volume de 70 mL para 5 mL. As etapas da purificação em coluna de níquel foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%.

4.17 Análise da proteína por espectrometria de massas

A banda correspondente à proteína de interesse foi retirada do gel (do item 4.15) e digerida com tripsina *in gel* de acordo com SHEVCHENKO *et al.*, 1996. Os fragmentos de gel foram lavados 3 vezes sob agitação em vórtex com 400 µL de (NH₄)CO₃ 25 mM em acetonitrila 50% pH 8,0 e posteriormente seco em *Speed Vac*. Uma solução de DTT 10 mM e (NH₄)CO₃ 25 mM foi utilizada em volume suficiente para cobrir o pedaço de gel. O tubo foi agitado rapidamente em vórtex e incubado a 56°C por 1 hora. O sobrenadante foi descartado e

ao tubo adicionou-se 25 µL de solução de iodoacetamida 55 mM, que foi deixado sob agitação durante 45 minutos ao abrigo da luz à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o material lavado 3 vezes 400 µL de (NH₄)CO₃ 25 mM em acetonitrila 50% pH 8,0. O material foi desidratado com acetonitrila 100% por 5 minutos e posteriormente seco em concentrador à vácuo (*Speed-Vac*). A amostra foi re-hidratada com solução gelada de tripsina (*Porcine Tripisin*, Promega) 10 mg/mL durante 10 minutos a 4°C. Foi adicionada solução de (NH₄)CO₃ 25 mM pH 8,0 em volume suficiente para cobrir o gel e a amostra foi incubada a 37°C por 20 horas.

Para a extração dos peptídios, 50 µL de solução acetonitrila 50% e ácido trifluoro acético 5% foram adicionados ao tubo com os fragmentos de gel, que foi agitado suavemente durante 30 minutos. A solução do tubo que continha o gel foi transferida para outro tubo previamente limpo com metanol e água deionizada. O processo foi repetido e posteriormente o volume de solução foi reduzido a 5 µL em concentrador à vácuo (*Speed-Vac*). A este volume foram adicionados 3 µL de solução de acetonitrila 50% e ácido trifluoro acético 5%. A amostra foi misturada na proporção 1:1 (em volume final de 1µL) com matriz ácido 4-hidroxicianamínico (α -ciano, SIGMA) e analisada no aparelho 4700 Proteomics Analyzer TOF/TOF (applied Biosystems). Os íons foram fragmentados utilizando N₂ como gás de colisão a uma pressão de 2.8×10^6 torr. Os espectros dos íons obtidos foram usados em busca da proteína mais provável contra um banco de dados de bactérias Gram-negativas, utilizando a interface Mascot (<http://www.matrixscience.com>).

4.18 Obtenção do antissoro anti-proteína recombinante do endossimbionte expressa em *E. coli*

A proteína recombinante purificada (obtida de acordo com o item 4.15) foi utilizada para inocular 5 camundongos, por via peritonial, com cinco aplicações de aproximadamente 50-100 µg de antígeno por camundongo, em intervalos de 15 dias, seguida de obtenção de 1 mL de sangue de cada camundongo após 10 dias da última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma), na primeira inoculação, e em adjuvante incompleto nas duas finais. O soro foi separado das células do sangue através de incubação em banho a 37°C durante 20 minutos seguida de centrifugação a 5.000 g em centrífuga Eppendorf 5804 durante 10 minutos a 37°C.

4.19 Ensaio de ELISA

Para confirmar a resposta imune dos camundongos contra a proteína recombinante purificada foi realizado um ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), que permitiu titular a atividade dos anticorpos. A proteína foi diluída em solução de PBS em uma concentração final de 5 µg/mL e foi distribuído um volume de 50 µL em cada poço da placa de 96 poços (Nunc). A placa foi incubada a 4 °C durante a noite para adsorção da proteína na placa. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e 200 µL de solução de PBS com 1% de gelatina foram adicionados a cada poço da placa contendo a proteína e aos controles (sem proteína), deixando-se incubar por 30 minutos a 37° C. O sobrenadante foi descartado e a placa foi lavada com PBS contendo 0,1% Tween. Para testar as atividades do soro anti-proteína recombinante e pré-imune foram realizadas 8 diluições seriadas de 1:3 a partir da

diluição inicial (o primeiro poço contendo 50 µL do antissoro ou soro pré-imune diluído 1:50 em solução de PBS contendo 1% de gelatina e 0,1% de *Tween*) e a placa foi então incubada a 4 °C durante a noite. Os poços da placa foram lavados três vezes com solução de PBS com 0,1% de *Tween* e a cada poço foram adicionados 50 µL de PBS contendo 1% de gelatina e 0,1% de *Tween* contendo o anticorpo secundário IgG Cam (conjugado a fosfatase alcalina) diluído 1:4.000. A placa foi incubada durante 90 minutos a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e para a revelação foi utilizada uma pastilha de PNPP (p-nitrofenil-fosfato) dissolvida em 5 mL de 100 mM de Tris-HCl e 3 mM de MgCl₂. Esta solução reveladora foi distribuída num volume de 50 µL em cada poço e a placa foi deixada à temperatura ambiente por 20 minutos. A análise da absorbância foi realizada a 450 nm no leitor de placas *ERspectraMax (Molecular Devices)*.

4.20 Purificação de anticorpo por afinidade

O antissoro obtido de camundongo foi submetido à purificação de anticorpo por afinidade em membrana de nitrocelulose. Para tanto, fez-se uma análise por SDS-PAGE unidimensional da proteína purificada. O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e posteriormente corado com vermelho de Ponceau (0,2% Ponceau S; ácido acético glacial 3%). A região contendo as bandas com a proteína recombinante foi excisada com auxílio de um bisturi. O fragmento de membrana foi descorado com água destilada e bloqueado por 1 hora em solução de bloqueio, PBS e BSA (albumina de soro bovina) 3%, pH 7,2. O antissoro (obtido de acordo com o item 4.17) foi incubado com a membrana por 48 horas a 4° C que foi posteriormente lavada três vezes com PBS pH 7,2. Os anticorpos específicos ligados à membrana foram eluídos com solução de glicina 0,2M e EDTA 1mM

pH 4,0 durante 8 minutos. Esta solução foi neutralizada com solução previamente resfriada de Tris 10mM em até o pH atingir 7,0.

4.21 Preparo de proteínas totais da cepa normal e curada de *C. deanei* e da fração de mitocôndria

Para o preparo de proteínas totais de *C. deanei*, cepas normal e curada, foram utilizados 10^8 parasitas/mL e para análise de proteínas de mitocôndria, utilizou-se fração obtida a partir de um fracionamento (item 4.2). As amostras foram ressuspensas em 256 μ L de tampão de lise contendo de fluoreto de sódio (NaF) 10 mM, de ortovanadato de sódio (NaVO_3) 1 mM, de fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF) 100 μ M, de azida sódica (NaN_3) 0,02%, E64 10 μ M, de EGTA 1mM em Tris-HCl 20mM, pH8,0. A este tampão foram adicionados DNase 0,1 mg/mL e 4 μ L de coquetel de inibidores de proteases (*for mammalian tissues* -Sigma). As amostras foram deixadas no gelo por 30 minutos e posteriormente centrifugada à 6.000 g em centrífuga Eppendorf 5804 durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi adicionado a 300 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH6,8; SDS 4%, glicerol 20%, 0,2 M de DTT e azul de bromofenol 0,002%).

4.22 Preparo de proteínas solúveis e de membrana das frações de endossimbionte

As frações de endossimbionte obtidas obtida a partir de quatro fracionamentos (item 4.2) foram ressuspensas em 0,6 mL de PBS, pH 7,2, contendo RNase 0,025 mg/mL, DNase 0,1 mg/mL, inibidor de proteases PMSF 1,0 mM e inibidor de proteases leupeptina 10 μ g/ μ L (Sigma-EUA). As frações foram então lisadas em ultrassom (*Ultrasonic processor*). O lisado foi centrifugado a 5.000 g em centrífuga Eppendorf 5804 durante 10 minutos a 4°C para a

sedimentação dos endossimbiontes que permaneceram inteiros. O sobrenadante foi centrifugado a 35.000 g durante 1 hora em ultracentrífuga Beckman (L8-70M ultracentrifuge, com rotor SW 50.1) a 4 °C. O sobrenadante corresponde às proteínas solúveis do simbiote e o sedimento, correspondendo a proteínas de membrana foi ressuspenso em solução sarcosil 0.5% (Sigma) com 2-mercaptoetanol 1 mM e posteriormente incubado por 18 horas a 4 °C. A amostra foi centrifugada novamente a 35.000 g durante 1 hora em ultracentrífuga Beckman (L8-70M ultracentrifuge, com rotor SW 50.1) a 4 °C, obtendo-se no sobrenadante as proteínas de envoltório do endossimbiote.

4.23 Western Blotting

Com o objetivo de identificarmos a proteína de interesse, usamos extrato total da cepa normal de *C. deanei* e da fração de endossimbiontes, amostra de proteínas de membrana interna e externa de simbiotes, assim como a cepa apossimbiótica e frações de mitocôndria (controle negativo). Estas amostras foram utilizadas em corridas eletroforéticas de SDS-PAGE (6 a 8 µg de proteína por poço). Um dos géis obtidos foi corado com Coomassie Coloidal e os demais foram transferidos com tampão Tris-glicina (Tris 0,025 M e glicina 0,192 M) para membrana de nitrocelulose (BioRad) em câmara semi-seca (BioRad) por 90 minutos a 350mA. Os sítios de ligação não-específica à membrana foram bloqueados com solução de bloqueio contendo 5% do leite desnatado em pó e 0,1% Tween-20 em PBS, pH 7,3 por 45 minutos. A membrana foi então, incubada com anticorpo primário (anti-proteína recombinante do simbiote) diluído em solução de bloqueio (1:250) durante 1 hora a 4 °C. A membrana foi lavada três vezes em PBS pH 7,3 e, em seguida, incubada durante 45 minutos, com anticorpo secundário anti-mouse IgG HRP anti-peroxidase (Pierce) diluído 1:4000 em

solução bloqueio. Anticorpos ligados à proteínas foram detectados com a solução do *kit SuperSignal West Pico Mouse IgG Detection* (Pierce).

4.24 Microscopia eletrônica de transmissão

4.24.1 Preparação de rotina

As células de *C. deanei* e as frações de endossimbionte foram fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após lavagem neste mesmo tampão, o material foi pós-fixado por 1 hora em solução de ferrocianeto de potássio 0,8%, tetróxido de ósmio 1% e CaCl_2 10 mM diluídos (1:1) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após lavagem, o material foi desidratado em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e duas vezes 100%). Em seguida o material foi infiltrado por aproximadamente 12 horas em resina epóxi (*Polybed*) diluída em acetona 100% em igual proporção (1:1 v/v). No dia seguinte, o material foi infiltrado em resina *Polybed* pura por cerca de 6 horas e depois foi incluído e polimerizado a 60 °C em forno (Biomatic) por 48 horas. Cortes ultrafinos foram obtidos após ultramicrotomia dos blocos em ultramicrotomo *Reichert Ultracuts*. A contrastação das amostras foi realizada em acetato de uranila 5% por aproximadamente 45 minutos, seguido de citrato de chumbo 4%, por cerca de 5 minutos e para a observação utilizou-se o microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 900).

4.24.2 Preparação de amostras para imunocitoquímica

As células foram fixadas em solução de glutaraldeído 0,3%, sacarose 0,25 M, paraformaldeído 4% e ácido pícrico 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2, por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M, pH

7,2, e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 2 vezes 100%) a 4 °C, por 1 hora em cada etapa. Posteriormente, as amostras foram colocadas em solução de 2 volumes de etanol 100% e 1 volume de resina Unicryl, a -20° C, por aproximadamente 16 horas. Após este período, as amostras foram transferidas para solução de iguais volumes de etanol 100% e resina Unicryl (v/v), por 8 horas, a -20° C, e em seguida em solução de 1 volume de etanol 100% e 2 volumes de resina, a -20 °C, por 16 horas. O material foi mantido em resina Unicryl por 12 h, e em seguida incluído na mesma resina. A polimerização da resina ocorre sob luz ultravioleta por 72 horas, à -20 °C.

4.25 Ensaios de imunolocalização

4.25.1 Por microscopia ótica

Os protozoários foram fixados em paraformaldeído 4% diluído em PBS e despositados em lamínulas previamente cobertas com poli-L-lisina (1 mg/mL). Seguiu-se permeabilização com 2% de Triton X-100 por 30 minutos. Posteriormente, o material foi incubado em solução de bloqueio (PBS pH 8,0 contendo BSA 1%) por 30 minutos, seguido da incubação por 1 hora com diferentes concentrações do antissoro primário obtido contra a proteína recombinante do endossimbionte. As lamínulas foram posteriormente incubadas por 45 min com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488 (Invitrogen) na diluição 1:400. Em seguida, os protozoários foram incubados com DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) na concentração de 5 µM por 10 min e as lamínulas foram montadas sobre as lâminas com N-propil-galacto (Sigma). O material foi observado ao microscópio ótico de fluorescência convencional (Zeiss) ou no modo confocal (Zeiss). Nos experimentos controle, a incubação com o antissoro anti-porina foi omitida.

4.25.2 Por microscopia eletrônica

As grades de níquel contendo cortes ultrafinos dos protozoários preparadas como descrito no item 4.22.2 foram incubadas em solução de bloqueio contendo BSA 1,5%, gelatina de peixe 0,5% e *Tween* 20 0,02%, diluídos em PBS pH 8,0. Em seguida, o material foi incubado por 1 hora com os anticorpos obtidos contra a porina recombinante do endossimbionte. Estes anticorpos, purificados por afinidade (item 4.19), foram diluídos 1:5 em solução de bloqueio. As amostras foram posteriormente lavadas nesta mesma solução e então incubadas por 30 minutos com anti-IgG de camundongo acoplado a partículas de ouro coloidal de 15 nm diluído 1:250 em solução de bloqueio. Após incubação com os anticorpos, os cortes são lavados em solução de bloqueio e em água destilada. No controle, a incubação do material com antissoro primário foi omitida. As grades foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo, como descrito anteriormente (item 4.23.1), e observadas ao microscópio Zeiss 900.

5 RESULTADOS

5.1 Análise ultraestrutural de *C.deanei* e das frações de endossimbionte

Análises por microscopia eletrônica de transmissão mostram que *C. deanei* apresenta mitocôndria única e ramificada, cinetoplasto com arranjo frouxo das fibrilas de DNA e presença de bolsa flagelar (Fig. 7). Mostraram também um endossimbionte próximo ao núcleo e aos glicossomos. Em um maior aumento, pode-se observar o endossimbionte, cujo envoltório apresenta duas unidades de membrana: uma interna e outra externa. No espaço entre estas membranas, não observamos uma parede celular típica de Gram-negativos, mas sim uma região eletrônica-lucente (Fig. 8).

As frações enriquecidas com endossimbionte também foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão. Os endossimbiontes isolados apresentam membrana externa e membrana interna preservadas após o fracionamento celular, sendo que estas podem apresentar-se mais separadas uma da outra, quando comparadas a bactérias simbióticas que estão no citoplasma do protozoário hospedeiro (Fig. 9).



Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão de *C.deanei*. BF: bolsa flagelar; E: endossimbionte; F: flagelo; G: glicosomo; K: cinetoplasto; M: mitocôndria; N: núcleo. Seta: retículo endoplasmático. Barra = 1 μm.

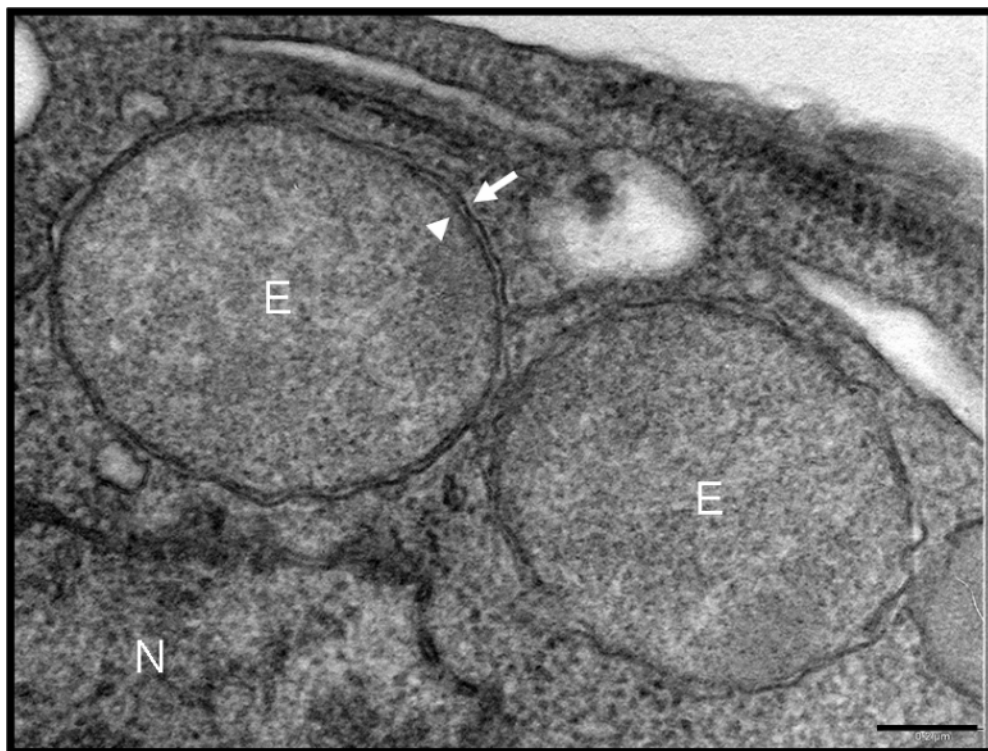


Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão de *C. deanei* mostrando em maior aumento o endossimbionte (E) próximo ao núcleo (N) do protozoário hospedeiro. Notar que o envoltório da bactéria simbiótica é composto por duas unidades de membrana: a externa (seta) em contato com o citoplasma da célula hospedeira e a interna (cabeça de seta) em contacto com a matriz bacteriana. Barra = 0,5 μm .

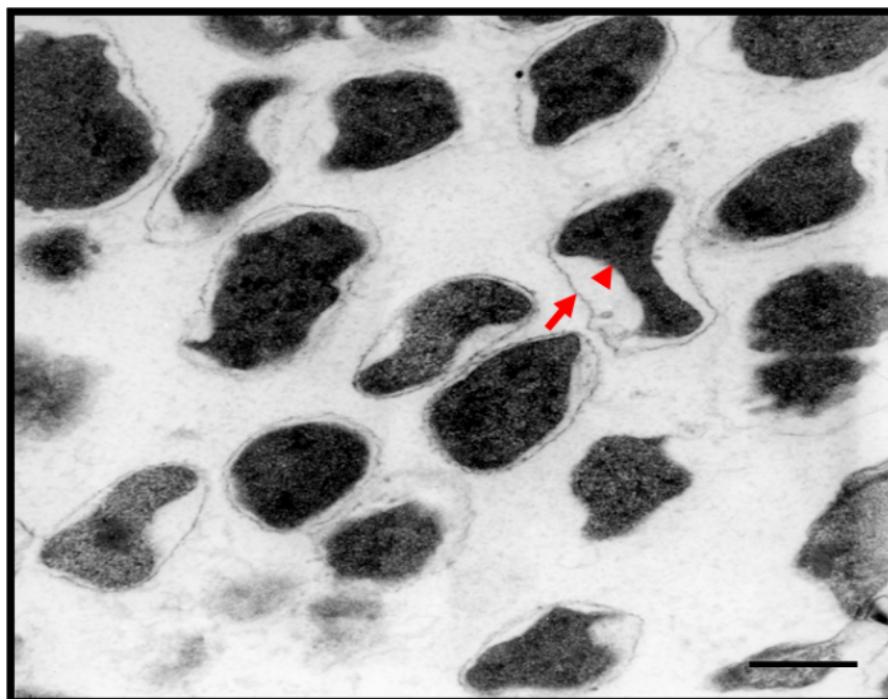


Figura 9: Microscopia eletrônica de transmissão de *C. deanei* de fração de endossimbionte. A seta vermelha mostra a membrana externa de um simbiote e a cabeça de seta, a membrana interna. Barra = 0,5 μm .

5.2 Identificação de referências codificadoras de porinas putativas no genoma do endossimbionte de *C. deanei*

Foram realizadas buscas no genoma do endossimbionte de *C. deanei* por genes envolvidos na síntese de porinas. O contígua 987 (Fig. 10) de aproximadamente 1,2 Kb foi o único que apresentou similaridade com sequências codificantes para porinas de bactérias Gram-negativas, segundo busca no banco de dados PROTEIN do NCBI (2007). Através do programa BLAST, foram comparadas as sequência aminoácidos do contígua 987 (Fig. 11) com as de aminoácidos de porinas ou de seus precursores presentes em bactérias gênero *Bordetella*, possível ancestral do endossimbionte de *C. deanei*. Os dados de maiores similaridade, identidade, identidade positiva e *gaps* entre as sequências são mostrados na Tab. 1. A maior identidade positiva encontrada (64%), foi com uma porina presente em *B. pertussis* e com um precursor de porina de *B. parapertussis* (64%). Na tabela 2 foram listadas as maiores similaridades encontradas pelo programa ExPASy BLAST2 Interface. Com estes resultados, a maior identidade positiva encontrada foi de 67% com porinas de *B. petrii*, *B. bronchseptica*, *B. pertussis* e *B. parapertussis*.

A sequência de aminoácidos referente ao contig 987, mostrado na Fig.11 possui em sua extremidade N-terminal uma sequência-sinal de endereçamento para a membrana, que é composta por 20 aminoácidos. A região inicial MKK é característica de porinas do gênero *Bordetella*, assim como o resíduo de fenilalanina na região C-terminal.

ATGAAAAAACTCTGCTTGCAGCTGCTTTGGTTACCAGTTTTGCTGGTGTGCCC
 AGGCAGAAACAGCTGTTAATCTATATGGATTAATTGATACAGGTGTTAATGTAA
 AACTGTAGAAAGTACGTGACTTTCGGAGAGTAAAACACAAGATTAGTCGTGTTG
 GTCCTGTATCTGGAGCTCAAAGTGGTTCTCGTTGGGGTCTTAAAGGGACTGAAG
 AGATTGGAATGGTTTGC GCGCTGAGTTCGTTTTAGAAAGGTGGTTTTAATTCTG
 GAAATGGTGATGCTGCTCAAACGTATTTTTGGTAGACAGGTCACCTGTTG
 GCGTAGCAAATGATGCTTGGGGACGTTTAGATATTGGTCGTCAAACCTAATGTTG
 CTAGCAAATATTTTGCAGATATAGATCCATTTAAAGGTGGTTTTGAACAGTCAG
 CTATTGGAATGAGCATTGGTTCTTCGAATGTTTCGTTATGATAATATGATTATGTA
 TCAAACCTCCTTCTTTCCGTGGAATTGATATCGGAGTTGGTTATTCTTTCAGCGTT
 GATACTAAGTCTTCTAAATCTGAGCATGTTACTGTTAATAACGCATTCTCAGCA
 GAAGAAGCAGCAAACCTGGAGAACAAATGAAAACGATCGTGCTTTTACAACAGG
 CATTCGTTACTCTAATGGTCCTGTAGTTGCTACTGCATCATTGATTATGTTAAA
 GGTTCTAAACGCAGAGTGGAACGTGATGCTTACTTTGATGTAAGTCCATGTTCT
 TATGCTGTTGGTGGAGCTTATGATTTTGATGTAGCTAAAGTTTCCGTAGCTTATG
 CAAAAACCATGGATGGATGGATTGGAGCATTGAATGTAGACGGCTATAGAGAT
 CTAATTGGCTTAAGTAGATTAATAACAGAATATGCTGATGGATTCCGTTCTAGT
 TCATATGTTGTTGGAGTAAGTGCGCCAATTAATGAACTAGTAATGTTTTTGGTA
 TCTTGGAACGCGTTTCTGTAAATGCAAAACCAAAAGGAGCTAGATTAACCTGGC
 GATAATGACTCCATGAATGTATATAGTGTAGGCTATACACAAGATTTGTCTAAA
 CGTACAAATTTATATGCTTATGGTTCTTATGCCTCTGACTATGCTTTCTTGTATA
 GTGCAAAAAGTAAAGTTGTTGGTTTCGGTATGCGTCATCGCTTCT**TAA**

Figura 10: Sequência de nucleotídeos do gene da porina putativa (ORF número 11) no Contígua 987 do genoma do de *C. deanei*. O códon iniciador está indicado em vermelho e em azul o códon de término. A sequência contém 1185 bases.

MKKTLLAAALVTS**FAGVAQA**ETAVNLYGLIDTGVNVNTVEVRDFRRVKHKISRV
 GPVSGAQSGSRWGLKGTEEIGNGLRAEFVLEGGFNSGNGDAAQTQRIFGRQVTV
 GVANDAWGRLDIGRQTNVASKYFADIDPFKGGFEQSAIGMSIGSSNVRYDNMIM
 YQTPSFRGIDIGVGYSFSVDTKSSKSEHVTVNNAFSAEEAANWRTNENDRAFTTGI
 RYSNGPVVATASFYVKGSKRRVERDAYFDVSPCSYAVGGAYDFDVAKVSVA
 AKTMDGWIGALNVDGYRDLIGLSRLITEYADGFRSSSYVVGVSAPINETSNVFGS
 WQRVSVNAKPKGARLTGDNDSMNVYVSGYTQDLSKRTNLYAYGSYASDYAFL
 YSAKSKVVGFGMRHRF

Figura 11: Sequência de aminoácidos correspondente ao gene da possível porina encontrada no genoma do endossimbionte de *C. deanei*. Em vermelho a sequência sinal de endereçamento.

Tabela 3: Similaridade da sequência do gene da porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* com seqüências codificadoras de porinas do gênero *Bordetella*. Os dados foram obtidos através do BLAST (NCBI).

Sequência	Proteína	Espécie	Score (bits)	Identities	Identities positivas	Gaps
Contig 987(porina)	porina	<i>B. pertussis</i>	338 (866)	198/408 (48%)	262/408 (64%)	23/408 (5%)
Contig 987(porina)	porina - OMP Q	<i>B. pertussis</i> (Tahoma I)	122 (205)	108/386 (27%)	172/386 (44%)	45/386 (11%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	273 (698)	164/397 (41%)	234/397 (58%)	28/397 (7%)
Contig 987(porina)	porina - OMP Q	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	122 (305)	108/386 (27%)	172/386 (44%)	45/386 (11%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	340 (872)	199/408 (48%)	263/408 (64%)	20/408 (4%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. parapertussis</i> 12822	281 (720)	167/374 (44%)	232/374 (62%)	28/374 (7%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. pertussis</i> Tohama I	271 (694)	163/397 (41%)	233/397 (58%)	28/397 (7%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. pertussis</i> Tohama I	338(866)	198/408 (48%)	262/408 (64%)	23/408 (5%)
Contig 987(porina)	porina	<i>B. pertussis</i>	281 (720)	167/374 (44%)	232/374 (62%)	28/374 (7%)
Contig 987(porina)	porina	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	283 (723)	167/374 (44%)	232/374 (62%)	28/374 (7%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. bronchiseptica</i> RB51	340 (872)	199/408 (48%)	263/408 (64%)	20/408 (4%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. bronchiseptica</i> RB50	92.8 (229)	63/181 (34%)	88/181 (48%)	6/181 (3%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. parapertussis</i> 12822	271 (694)	163/397 (41%)	233/397 (58%)	28/397 (7%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. parapertussis</i> 12822	91.7 (226)	62/181 (34%)	87/181 (48%)	6/181 (3%)
Contig 987(porina)	porina - OMP Q	<i>B. parapertussis</i> 12822	122 (305)	108/386 (27%)	172/386 (44%)	45/386 (11%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. parapertussis</i> 12822	337 (865)	196/408 (48%)	262/408 (64%)	20/408 (4%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. parapertussis</i>	271 (694)	163/397 (41%)	233/397 (58%)	28/397 (7%)
Contig 987(porina)	precursor de porina	<i>B. parapertussis</i>	337 (865)	196/408 (48%)	262/408 (64%)	20/408 (4%)
Contig 987(porina)	porina - OMP Q	<i>B. parapertussis</i>	122 (305)	108/386 (27%)	172/386 (44%)	45/386 (11%)

Tabela 4: Similaridade da sequência do gene da porina do endossimbionte de *C. deanei* com porinas presentes em *Bordetella* baseados nos alinhamentos do ExPASy BLAST2 Interface.

Proteína	Espécie	Socore (bits)	Identities	Identities Positivas	Gaps
Porina	<i>Bordetella petrii</i>	410 (1054)	213/405 (52%)	273/405 (67%)	8%
Porina	<i>Bordetella brochseptica</i>	409 (1050)	211/408 (51%)	276/408 (67%)	8%
Porina	<i>Bordetella pertussis</i>	405 (1041)	210/408 (51%)	275/408 (67%)	9%
Porina	<i>Bordetella parapertussis</i>	404 (1038)	208/408 (50%)	275/408 (67%)	8%
Proteína precursora de porina	<i>Bordetella avium</i>	398 (1023)	209/400 (52%)	274/400 (68%)	4%
Porina	<i>Bordetella petrii</i>	377 (969)	195/398 (48%)	266/398 (66%)	8%
Porina	<i>Bordetella petrii</i>	369 (947)	193/395 (48%)	253/395 (64%)	6%
Porina	<i>Bordetella brochseptica</i>	338 (868)	183/396 (46%)	249/396 (62%)	7%
Porina	<i>Bordetella parapertussis</i>	338 (866)	183/396 (46%)	249/396 (62%)	7%
Proteína precursora de porina	<i>Bordetella avium</i>	335 (860)	182/402 (45%)	251/402 (62%)	9%
Porina	<i>Bordetella brochseptica</i>	320 (821)	173/397 (43%)	245/397 (61%)	7%
Porina	<i>Bordetella petrii</i>	320 (819)	183/408 (44%)	242/408 (59%)	11%
Porina	<i>Bordetella pertussis</i>	319 (818)	172/397 (43%)	244/397 (61%)	7%
Porina	<i>Bordetella parapertussis</i>	320 (817)	172/397 (43%)	244/397 (61%)	7%
Porina	<i>Bordetella petrii</i>	281 (719)	157/406 (38%)	237/406 (58%)	8%
Porina - OmpQ	<i>Bordetella pertussis</i>	154(388)	188/406 (46%)	190/406 (46%)	13%
Porina - OmpQ2	<i>Bordetella pertussis</i>	152(384)	111/382 (29%)	183/382 (46%)	12%
Porina - OmpQ	<i>Bordetella brochseptica</i>	152(384)	111/382 (29%)	183/382 (46%)	12%

5.3 Predição da topologia da porina putativa utilizando o programa PRED-TMBB

A sequência de aminoácidos teórica deduzida da sequência do gene correspondente a porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* foi utilizada para obter a predição da topologia da molécula através uso do programa PRED-TMBB, empregando 3 métodos distintos. De acordo com o resultado obtido o valor do *score* foi de 2,928, abaixo de 2,965, indicando que provavelmente esta proteína corresponde a uma porina, já que o algoritmo é específico para avaliação da topologia deste tipo de proteína. Vale ressaltar que a predição estrutural segundo os três métodos é muito semelhante. Na Fig. 12, pode-se verificar a predição estrutural da proteína em questão, de acordo com os métodos *Viterbi*, *N-best* e *Posterior decoding* (BAGOS *et al.*, 2004). Notar que a proteína apresenta 18 domínios transmembrana e características estruturais de porinas de Gram-negativas, com as alças curtas voltadas para o periplasma e os *loops* longos voltados para o lado externo, neste caso, para o citoplasma do protozoário hospedeiro. Nos domínios transmembranares, há predominância de aminoácidos apolares, enquanto nos domínios formadores dos *loops* longos e voltas curtas, há predominância dos aminoácidos polares.

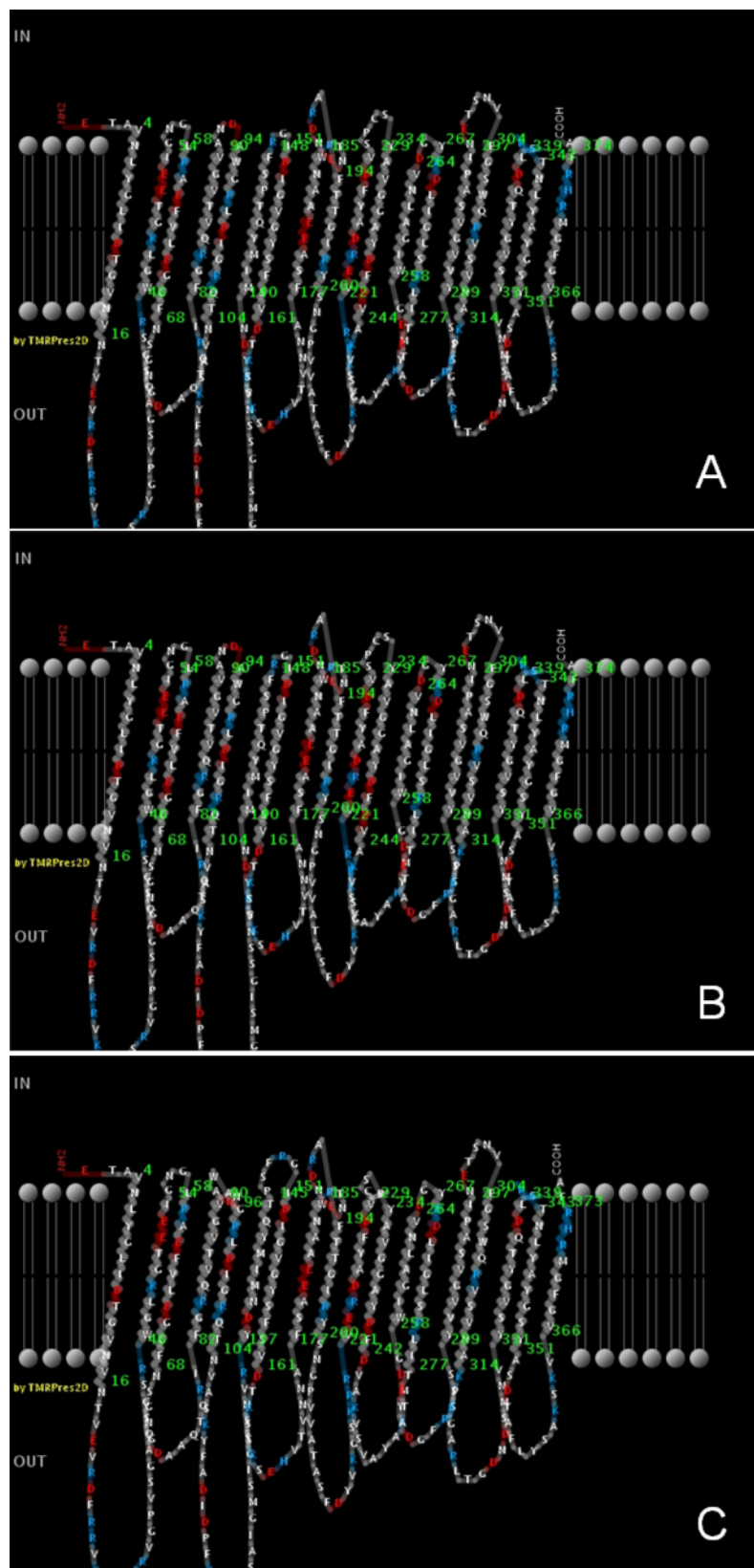


Figura 12: Predição da topologia da porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* pelo programa PRED-TMBB. A: Método Viterbi; B: Método N-best; C: Método Posterior decoding. Aminoácidos marcados em azul são positivos; em vermelho aminoácidos negativos. IN: lado citoplasmático do endossimbionte de *C. deanei*. OUT: lado citoplasmático do protozoário hospedeiro.

5.4 Modelagem molecular comparativa

Para construção de um modelo molecular, foi realizada uma busca no banco de dados PDB (*Protein Data Bank*) com a finalidade de encontrar uma proteína, cuja estrutura já foi resolvida, que possuísse a melhor identidade de sequência de aminoácidos com a porina putativa do endossimbionte de *C. deanei*. Esta busca levou à proteína Omp32 de *Comamonas acidovorans* (ZACHARIAE *et al.*, 2005), cuja identidade foi de 26%. Esta proteína foi então utilizada como modelo estrutural comparativo para a construção de um modelo molecular hipotético do arranjo espacial 3D da porina putativa do endossimbionte. Foi realizado o alinhamento das seqüências de aminoácidos comparadas através do programa Promals (Fig. 13), que mostrou as regiões conservadas e de consenso, nas quais ambas proteínas apresentavam mesma estrutura secundária. Com a utilização do *software Modeller* (ESWAR *et al.*, 2000) foi obtido o modelo molecular hipotético da porina do endossimbionte de *C. deanei*, onde se observa que os 18 domínios transmembrana correspondem às folhas- β pregueadas. Estas análises mostraram também que a proteína apresenta *loops* longos e alças curtas e é arranjada na forma de canal, ou de “barril- β ” em cujo interior existe uma pequena região em α -hélice (Fig. 14). A análise de qualidade energética do modelo com o gráfico de Ramachandran resultou em 297 aminoácidos (92%) nas regiões mais favoráveis (dado não mostrado). O cálculo do RMSD que revela a distância dos carbonos α e de seus ligantes entre os 2 modelos resultou em um valor de 1.28 Å, um valor satisfatório para a qualidade do modelo proposto. Na Fig. 15, é possível observar a sobreposição do modelo proposto para a porina do endossimbionte de *C. deanei* com a porina Omp32 de *Comamonas acidovorans*.

Conservation:
P1_porinaendo
P1_2FGR
Consensus_ss:

```

          9 9 9 9 99 9          99 9          9 99 99 999 9 99 9 9 999
1  ETAVNLYGLIDTGVNNTVEVRDFRRVKHKISRVPVSGAQSGSRWGLKGTEEIGNGLRAEFVLEGGFNS 70
1  ESSVTLFGIVDTNVAYVNKDA-----AGDSRYGLGTSGASTSRLGLRGTEDLGGGLKAGFWLEGEIFG 63
          eeeeeeeeeeeeeee          eeeee          eeeeeeeeeee eeeeeeeeeee

```

Conservation:
P1_porinaendo
P1_2FGR
Consensus_ss:

```

          9 9          9 9 99          9 99          9 9          9 9 9
71  GNGDAAQTQRIFGRQVTGVANDANGRLDIGRQTNVASKYFADIDPFKGG-----FEQSAIGMSIGSS 133
64  DDGNA--SGFNFKRRSTVSLSG-NFGEVRLGRDLVPTSQKLTSYDLFSATGIGPFMGFRNWAAGQGADDN 130
          eeeeeeeee eeeeeeeee hhhhhhheeeee

```

Conservation:
P1_porinaendo
P1_2FGR
Consensus_ss:

```

          9 9 9 9 99 9 9 9 99 9          9 99          9 99
134 NVRYDNMIMYQTPSFRGIDIGVGYSFSDTKSSKSEHVTVNNAFSAEEAANWRTNENDRAFTTGIRYSNG 203
131 GIRANNLISYYTPNFGGFNAGFGYAFDEKQTIGT-----ADSVGRYIGGYVAYDNG 181
          eeeeeeeee eeeeeeeee          eeeeeeeee

```

Conservation:
P1_porinaendo
P1_2FGR
Consensus_ss:

```

          9 9          9          9 9 9 999 9 9          9
204 PVVATASFQDYVKGSKRRVERDAYFDVSPCSYAVGGAYDFDVAKVSVAYAKTMDGWIGALNVDGYRDLIGL 273
182 PLSASLGLAQQTAVGG-----LATDRDEITLGASYNFGVAKLSGLLQQTQKFRD----- 231
          eeeeeeeee eeeeeeeee eeeeeeeee eee eeeeeee

```

Conservation:
P1_porinaendo
P1_2FGR
Consensus_ss:

```

          99 9 999          9          9          99 99999
274 SRLITEYADGFRSSSYVVGVSAPINETSNVFGSQWRVSVNAKPKGARLTGDNDSMNVYVGYTQDLSKRT 343
232 -----IGGDIKTNSYMLGASAPVGGVGEVKLQYALYDQKAI-----DSKAHQITLGVVHNLKSKRT 286
          eeee eeeeeeeee eeeeeeeee eeeeeeeee e

```

Conservation:
P1_porinaendo
P1_2FGR
Consensus_ss:

```

          99          9 9 99 9
344 NLYAYGSYASDYAFL-----YSAKSKVVGFGMRHRF----- 374
287 ALYGNLAFLNKNDASTLGLQAKGVYAGGVQAGESQTGVQVGIRHAFDNWQNGTS 340
          eeeeeeeee eeeee eeeeeeeee

```

Figura 13: Alinhamento entre as sequências de aminoácidos deduzidos da sequência gênica sem o peptídeo sinal da porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* (P1_porina endo) e da Omp32 de *Comamonas acidovorans* (P1_2FGR) utilizando-se o programa Promals. Regiões conservadas (*Conservation*) e consenso de estrutura secundária (*Consensus_ss*). As letras “h” indicam regiões de α -hélice, “e” indicam as regiões em folhas β e os números “9” a probabilidade do alinhamento correto dos aminoácidos. As regiões em azul correspondem à folhas β , em vermelho α -hélice.

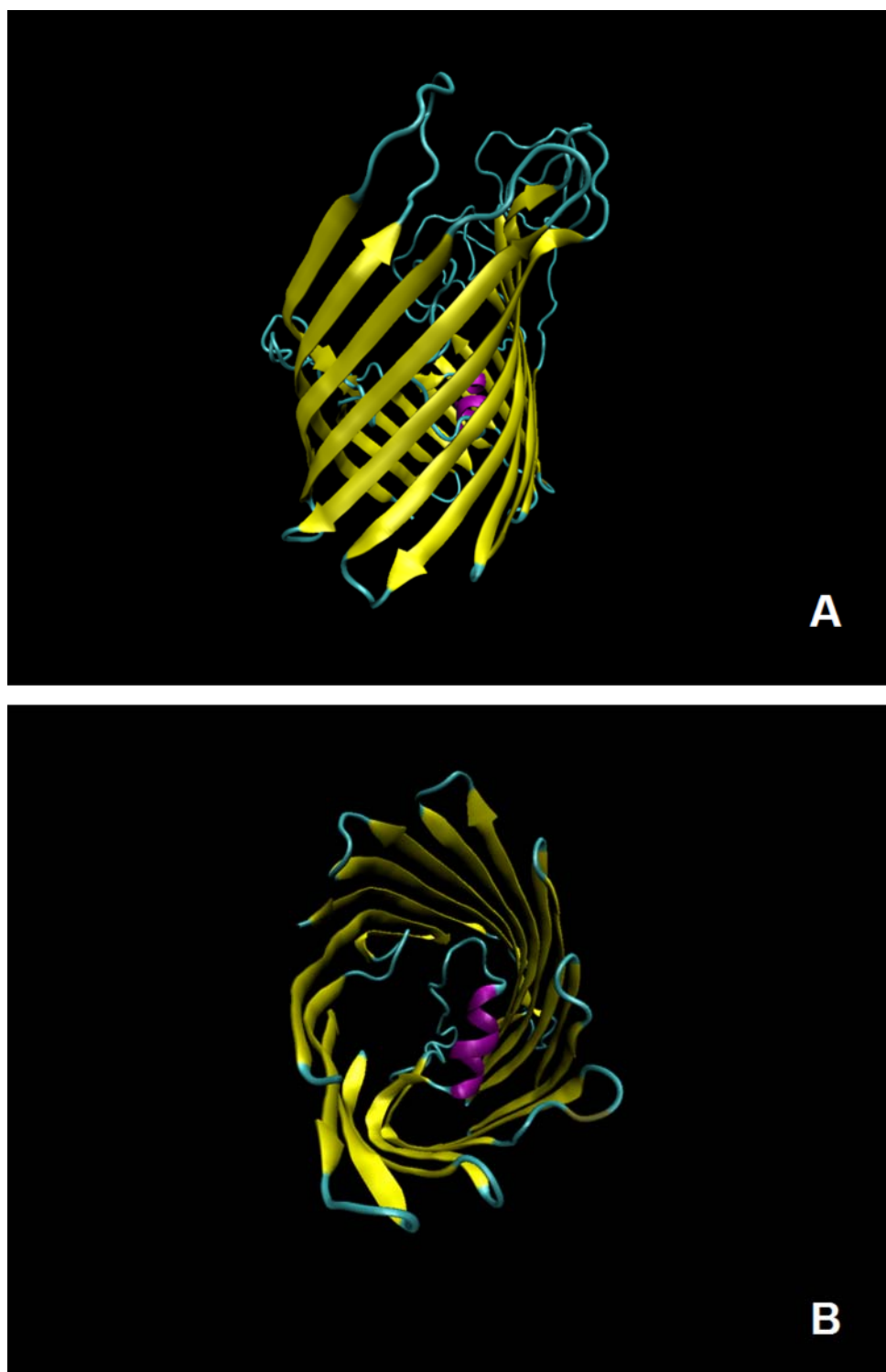


Figura 14: Modelo molecular 3D hipotético da porina do endossimbionte de *C. deanei*. As folhas β são mostradas em amarelo, as voltas e loops em azul e em rosa a região α -hélice. Em A, a vista lateral e em B a vista da região que fica voltada para o periplasma da bactéria, da qual foram omitidas as regiões correspondentes aos *loops* entre os aminoácidos 20 a 30, 68 a 84, 159 a 194, 211 a 230 e 258 a 282 para a melhor visualização do canal formado pela proteína.

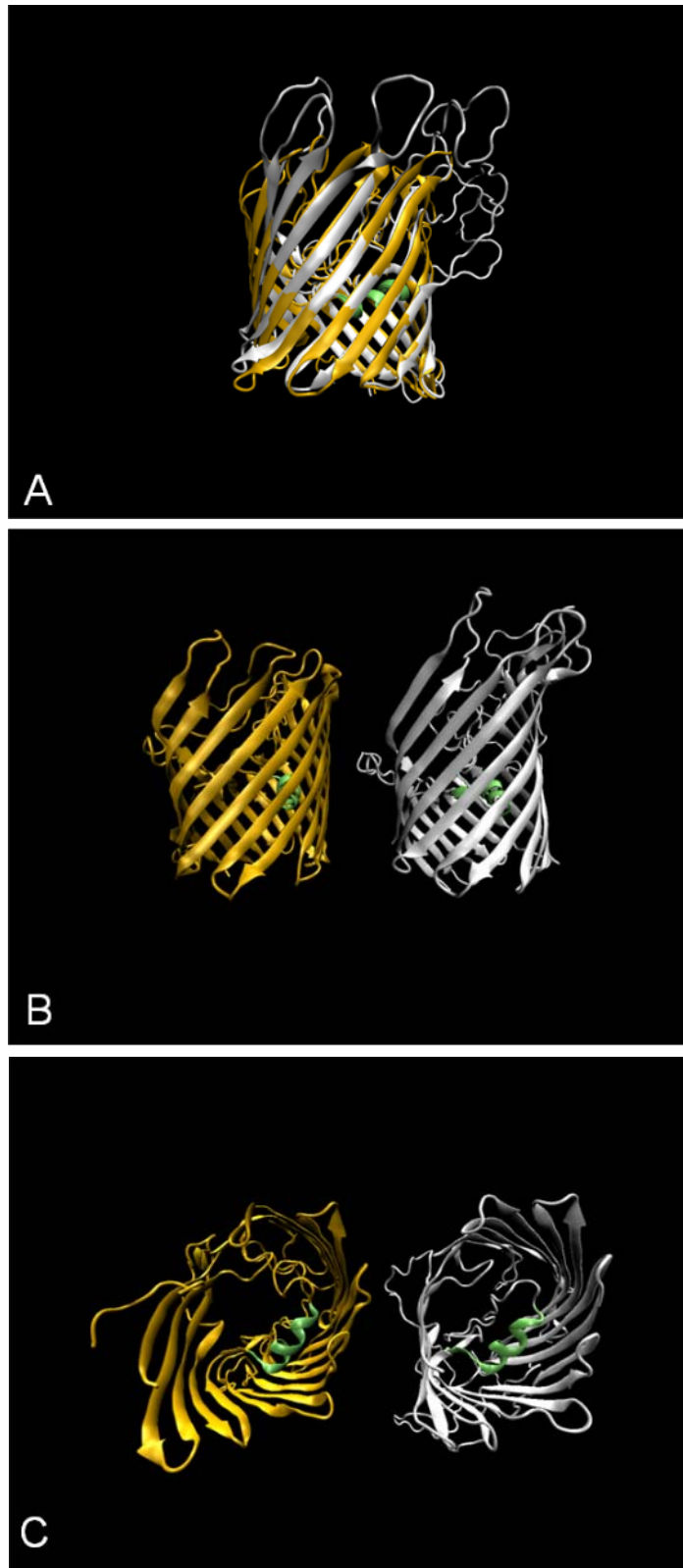


Figura 15: Comparação do modelo proposto para a porina putativa do endossimbionte de *C. deanei* (branca) e da estrutura cristalina da Omp32 de *Comamonas acidovorans* (amarela). As regiões de α -hélice estão indicadas em verde. A: sobreposição das estruturas. B: vista lateral das estruturas. C: vista da região das proteínas que fica voltada para região do periplasma das respectivas bactérias.

5.5 Análise da preparação do DNA cromossomal do endossimbionte de *C. deanei*

Após obtenção de frações de endossimbiontes, o DNA cromossomal foi purificado (item 4.4) e avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Fig. 16). Uma banda correspondente a aproximadamente 850 Kb foi observada através de análise por eletroforese *pulsed-field* (PROBST *et al.*, 2006) indicando uma redução de tamanho quando comparado ao do genoma do possível ancestral (*Bordetella parapertussis*) que apresenta aproximadamente 4 Mpb (PARKHILL *et al.*, 2003). Este dado indica uma elevada perda genômica do endossimbionte de *C. deanei* (em torno de 8 vezes) em relação ao procarioto ancestral (PROBST *et al.*, 2006).

5.6 Amplificação do gene da porina putativa do endossimbionte

O fragmento contendo o gene da porina putativa do endossimbionte foi amplificado por reação de PCR com auxílio da enzima *elongase* e avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo BrEt 0,5 µg/mL em tampão TAE. Uma banda de 1,2 Kpb do mesmo tamanho do gene da possível porina putativa encontrado no genoma do endossimbionte de *C. deanei* foi amplificada (Fig. 17).



Figura 16: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TAE do DNA purificado do endossimbionte de *C. deanei*.

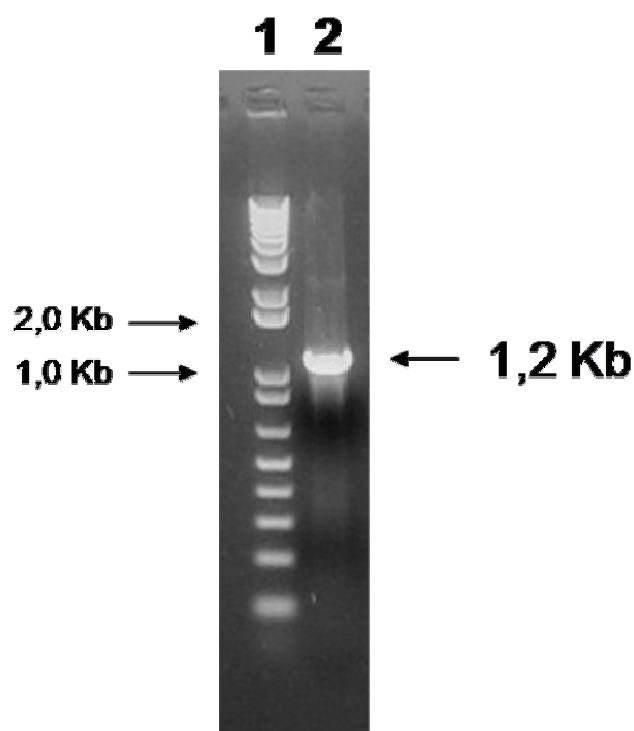


Figura 17: Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% em tampão TAE do fragmento contendo o gene da porina putativa do simbionte de *C. deanei* amplificado por PCR (poço 1). Poço 2 – padrão de peso molecular 1Kbp plus (Invitrogen).

5.7 Análise da expressão da proteína recombinante em cepas de *E. coli*

Os produtos da reação de ligação entre o fragmento contendo o gene da porina putativa do simbionte e o plasmídeo pET21d-His-Tev foram utilizados para transformação por eletroporação de células DH5 α competentes. As bactérias foram selecionadas em meio contendo ampicilina, já que o vetor possui gene que codifica resistência para tal antibiótico. Foram selecionados aleatoriamente seis clones resistentes a ampicilina para a realização de miniprep, procedimento a partir do qual se obteve plasmídios recombinantes extraídos das bactérias. Foram utilizados 137 ng de vetor recombinante purificado para transformação de bactérias das cepas BL21(λ DE3), Códon Plus e Rosetta por choque térmico. Realizou-se crescimento das bactérias transformadas em meio contendo antibióticos, de acordo com a respectiva resistência. Para testar a expressão da proteína recombinante, amostras das culturas

induzidas foram submetidas a SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% (Fig. 18). Porém, a BL21(λ DE3) foi a cepa escolhida, por apresentar proliferação celular mais rápida. Análises em gel de SDS-PAGE mostram que a proteína recombinante apresenta a um peso molecular aproximado de 50 KDa.

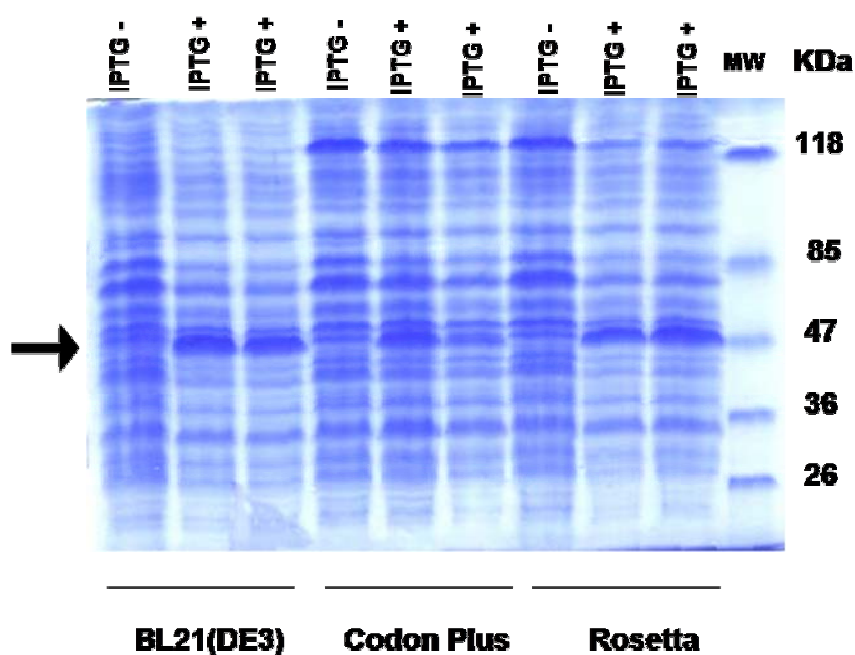


Figura 18: Análise eletroforética por gel SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% da expressão da proteína recombinante. IPTG-: sem estímulo de IPTG, que equivale ao controle negativo; IPTG+: com estímulo de 0,5 mM IPTG; seta: destaca a expressão da proteína recombinante induzida por IPTG. MW: Peso molecular. O gel foi revelado por coloração *Comassie Blue*.

Utilizamos a técnica de *Western blotting* para verificarmos a superexpressão da porina recombinante pela cepa BL21(λ DE3) transformada com vetor recombinante e estimulada por IPTG 0,5 mM. Observa-se uma banda com aproximadamente 47 kDa, correspondente à proteína recombinante, após o uso de anticorpo que reconhece a cauda de histidina. Uma hidrolase com peso molecular de 30 kDa foi utilizada como controle positivo, confirmando que a proteína recombinante apresenta cauda de histidina (Fig. 19). Outras bandas mais fracas correspondem à marcações inespecíficas.

5.8 Solubilização da proteína recombinante

Após o crescimento de 4 L de cultura de células BL21(λ DE3)/pET21d-His-Tev-porina putativa, centrifugação e retirada do sobrenadante, seguiu-se o procedimento de abertura do corpo de inclusão, já que a proteína recombinante é de membrana e insolúvel. Uma alíquota da suspensão celular após cada etapa do procedimento (item 4.14) foi submetida à SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. Observa-se que ao final do procedimento, após centrifugação do material, a maior parte da proteína recombinante se encontra no sedimento e insolúvel (Fig. 20, pista 6). Deste modo, o sedimento foi ressuspensão em tampão A contendo 8 M de ureia e 1% de Triton X-100. A suspensão foi purificada em coluna de resina de níquel e uma alíquota de cada etapa de lavagem e da eluição foi analisada em gel SDS-PAGE 12%. Observa-se que nas primeiras lavagens com tampão A (com ureia 8M e Triton X-100 e sem imidazol), uma pequena parte da proteína não se liga à coluna. Já na amostra eluída com imidazol 0,5 M, que possui grande afinidade pela resina de níquel, ocorre a saída da maior parte da proteína recombinante que se ligou à coluna (Fig. 21).

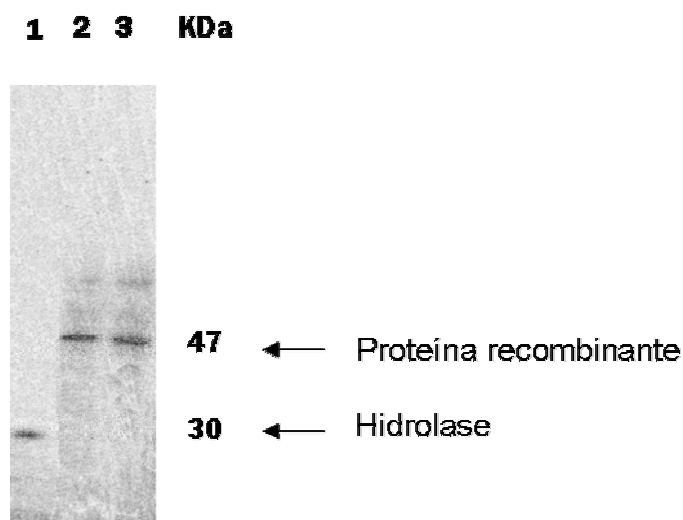


Figura 19: Análise por *Western blotting* utilizando anticorpo primário anti-histidina (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:5000 revelou a expressão da porina recombinante pela cepa BL21(λDE3) transformada com BL21(λDE3)/pET21d-His-Tev-porina putativa. 1: Controle positivo - hidrolase de 30 kDa; 2 e 3: colônias transformadas de BL21(λDE3)/pET21d-His-Tev-porina putativa e estimuladas com 0,5 mM de IPTG.

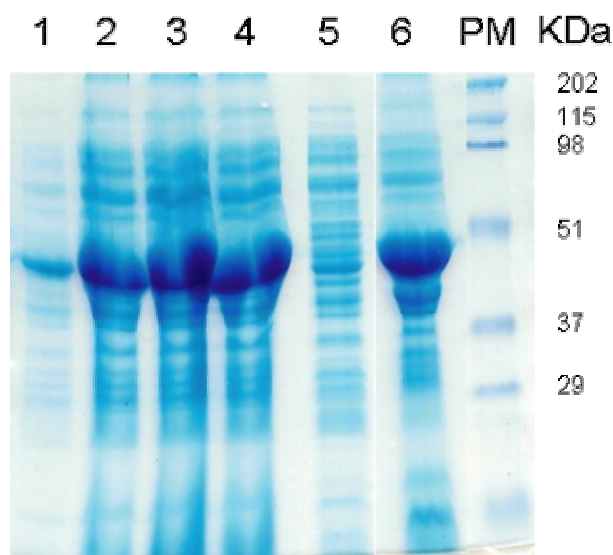


Figura 20: SDS PAGE 12% mostrando as etapas da solubilização da proteína recombinante. 1: controle- lisado total de BL21(λDE3)/pET21d-His-Tev-porina expressando proteína recombinante; 2: lisado total da amostra tratada com PMSF (etapa 1); 3: lisado total da amostra tratada com DNase (etapa 2); 4: lisado após amostra sonicada (etapa 3); 5: lisado após amostra sonicada (etapa 4); 6: lisado após amostra sonicada (etapa 5).

sobrenadante do material centrifugado; 6: sedimento após etapa 3; PM: Peso molecular BioRad. O gel foi revelado por coloração *Coomassie Blue*.

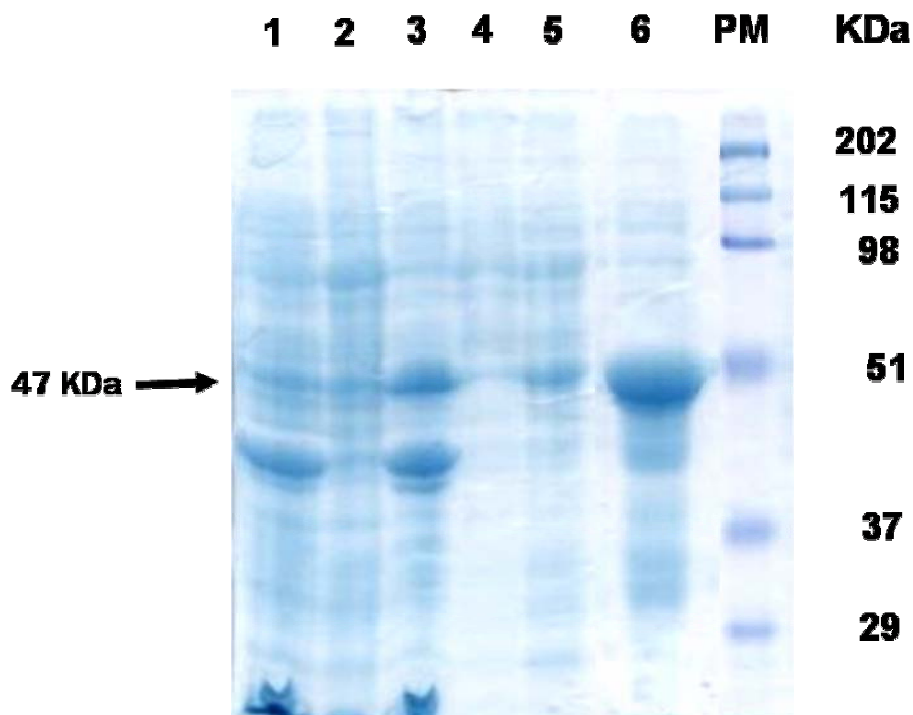


Figura 21: SDS PAGE 12% mostrando a purificação da proteína recombinante em coluna com resina de níquel. 1: amostra que não se aderiu à coluna; 2-5: lavagens com tampão A.; 6: eluição com 0,5 M de imidazol em tampão A (com ureia 8M e Triton X-100). Seta: indica a proteína recombinante de interesse. PM: Peso molecular BioRad. O gel foi revelado por coloração *Coomassie Blue*.

5.9 Análise do enovelamento da porina putativa recombinante

Após a primeira purificação em coluna de níquel, a amostra eluída com imidazol foi submetida a uma diluição lenta com tampão TEN contendo ASB-14 10% (diluição de 1:1). Após sonicação, a amostra foi diluída novamente na proporção de 1:20 no mesmo tampão contendo ASB-14 0,5%. Após a diluição e diálise, uma alíquota da proteína em tampão TEN com ASB-14 0,5% foi retirada para análise da reconstituição do enovelamento da proteína recombinante. Verificamos pelo espectro que a proteína em questão encontra-se enovelada visto que o pico máximo do espectro encontra-se a um comprimento de onda de

aproximadamente 340 nm, que é típico de uma proteína enovelada devido à emissão de fluorescência intrínseca do triptofano (Fig. 22). Este perfil é diferente para a proteína em presença de ureia, cujo pico possui um deslocamento para o comprimento de onda 350 (dados não mostrados).

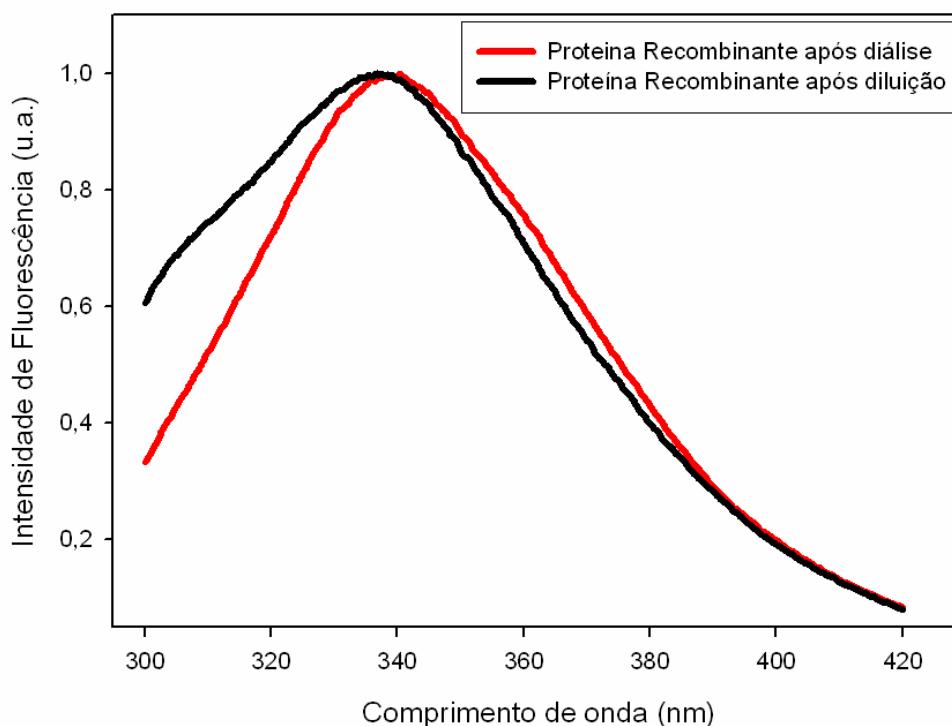


Figura 22: Gráfico do espectro de fluorescência do enovelamento da porina recombinante do endossimbionte de *C. deanei*. A diferença de comprimento de onda entre os picos máximos das curvas não é significativa.

A amostra contendo a proteína recombinante reenovelada foi então submetida a uma segunda passagem em coluna de resina de níquel, com a finalidade de concentrá-la por afinidade da cauda de histidina e para a obtenção de uma amostra mais purificada. Um gel de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% foi utilizado para análise de cada fração obtida da coluna. Observa-se que a amostra após a segunda passagem pela coluna possui menos proteínas contaminantes (Fig. 23). Os tubos da purificação com gradiente de imidazol tiveram o seu conteúdo unido e a amostra final foi visualizada em gel SDS-PAGE 12% (Fig. 24).

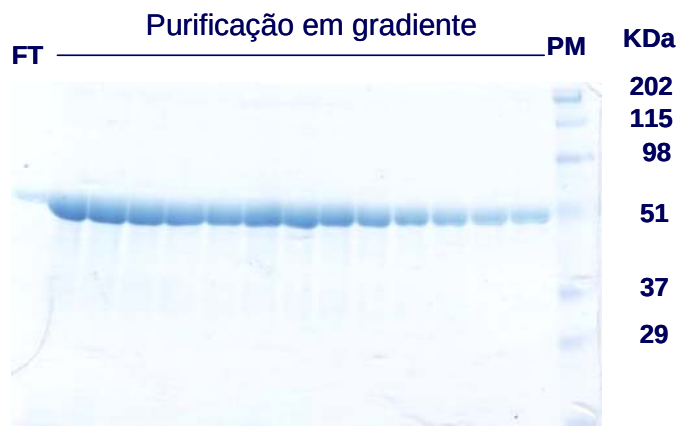


Figura 23: Análise eletroforética em gel de SDS-PAGE 12% da proteína recombinante após a segunda etapa de purificação em coluna com resina de níquel e eluição com gradiente de imidazol (0,01 M a 0,5 M). FT: *flow through* (amostra que não se aderiu à coluna); PM: padrão de peso molecular BioRad. O gel foi revelado com Coloração por *Coomassie Blue*.

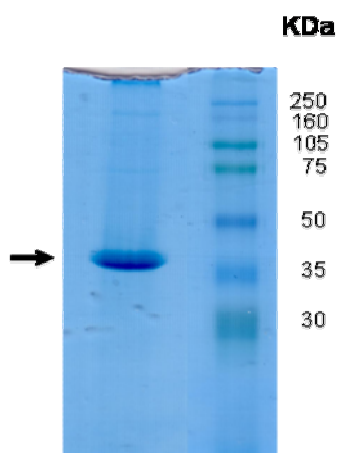
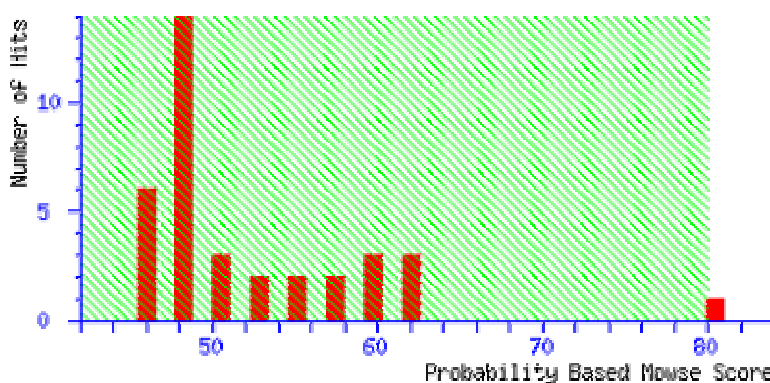


Figura 24: Análise eletroforética por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% da amostra de porina putativa purificada (união das amostras da purificação em gradiente de imidazol de 0,01 M a 0,5 M). O gel foi revelado com Coloração por *Coomassie Blue*.

5.10 Identificação da proteína recombinante por espectrometria de massas:

A banda correspondente à proteína purificada do gel (Fig. 20) foi recortada e então submetida à preparação para identificação por espectrometria de massas, após digestão enzimática com tripsina. A amostra contendo os peptídeos resultantes da digestão enzimática foi aplicada no MALDI-TOF (MS/MS) e a relação massa/carga obtida foi analisada através do programa MASCOT. Como resultado, obtivemos o maior *score* com o valor de 80 (Fig. 25) e a confirmação de que a proteína analisada foi a proteína esparada.



Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 80 are significant ($p < 0.05$).

Figura 25: Relação número de *hits* x probabilidade (*score*) obtido através de espectrometria de massas.

5.11 Análise do antissoro produzido contra a proteína recombinante

A proteína purificada foi utilizada para a imunização de camundongos Balb-c com a finalidade de produzir antissoro contra a mesma. Antes das imunizações, foi obtido de cada camundongo, uma alíquota de soro (soro pré-imune), que foi testado através de ensaios de *Western blotting* contra a proteína recombinante, para verificar se antes das imunizações já

ocorria reconhecimento por anticorpos dos camundongos. Não foi observada nenhuma reação antígeno/anticorpo antes das imunizações (dado não mostrado).

Obtivemos o antissoro anti-proteína recombinante após 5 imunizações dos camundongos em intervalos de 15 dias. Foi realizado um ensaio de ELISA para verificar a reação anticorpo específico do antissoro contra a proteína recombinante. Através do resultado do ensaio mostrado na Fig. 26, observamos a curva de concentração de anticorpo específico contra a proteína recombinante, na qual estimamos que tal concentração se encontra alta.

Foi realizado então, ensaio de *Western blotting* contra diferentes concentrações de proteína recombinante (Fig. 27). No primeiro poço do gel que foi transferido para membrana de nitrocelulose foram aplicados 64 µg de proteína (diluição 1:10), 6,4 µg no segundo (diluição 1:100), 0,64 µg no terceiro (diluição 1:1000) e 0,064 µg no quarto (diluição 1:10000). Foi observado que a concentração ideal de proteína para estes ensaios corresponde a diluição de 1:1000 contra o antisoro obtido diluído 1:250. Um novo *Western blotting* foi realizado, desta vez usando as frações de endossimbionte e mitocôndria de *C. deanei*, o que resultou em marcações inespecíficas (Fig. 28). Assim, realizou-se a purificação de anticorpo em membrana de nitrocelulose, por afinidade, utilizando-se apenas a região da membrana que continha a transferência da proteína recombinante. Após esta etapa a concentração dos anticorpos tornou-se menor, mas ainda compatível com o uso em ensaios de *Western blotting* e de localização por microscopia ótica de fluorescência.

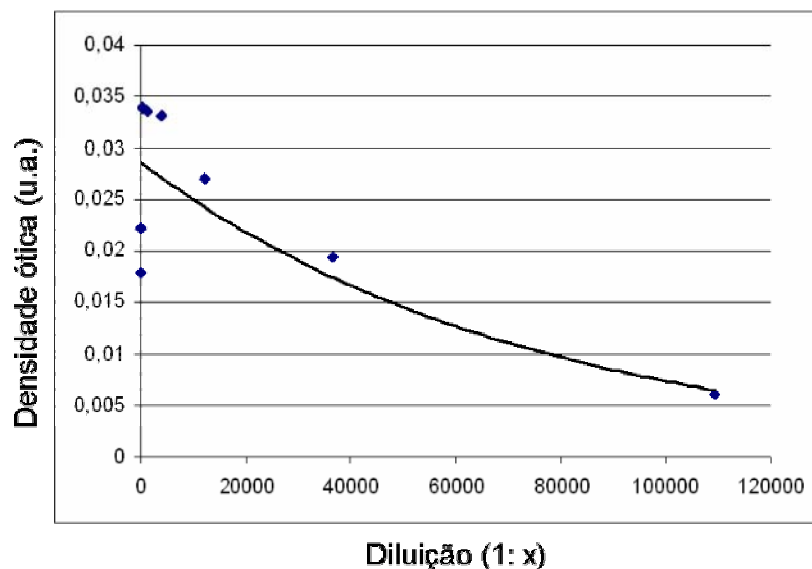


Figura 26: Ensaios de ELISA usando o antissoro produzido em camundongo (diluições 1:50 a 1:109350) contra a porina recombinante. Eixo x: corresponde às diluições do antissoro contra a proteína recombinante. Eixo y: corresponde à leitura em densidade ótica (a 450 nm). A leitura do soro pré-imune correspondeu à densidade ótica 0,000.

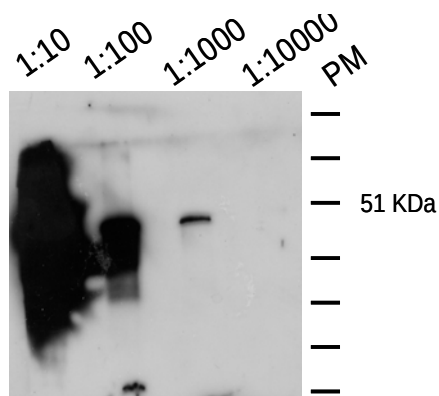


Figura 27: *Western blotting* da proteína recombinante contra o antissoro obtido de camundongo. A concentração inicial de proteína foi diluída 1:10 (64 µg de proteína), 1:100 (6,4 µg de proteína), 1:1000 (0,64 µg de proteína) e 1:10000 (0,064 µg de proteína). A diluição do antissoro utilizada foi de 1:250. PM: Padrão de peso molecular BioRad.

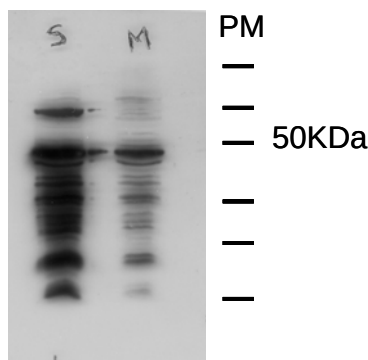


Figura 28: *Western blotting* das frações de simbiote e mitocôndria de *C. deanei* contra o antissoro obtido de camundongo. A diluição do antissoro utilizada foi de 1:250. S: endossimbionte; M: mitocôndria; PM: Padrão de peso molecular BioRad.

5.12 Ensaaios de *Western Blotting*

Realizamos inicialmente a análise do perfil proteico de *C. deanei* normal, *C. deanei* curada, de proteínas totais de mitocôndria e endossimbionte e de proteínas solúveis e de membrana do endossimbionte, através por eletroforese em gel SDS-PAGE. Este método revelou perfis proteicos distintos para as diferentes amostras (Fig. 29). As mesmas amostras foram utilizadas em outro gel SDS-PAGE que foi transferido para membrana de nitrocelulose, que foie tratada com anticorpos anti-porina putativa do simbiote purificados diluídos 1:250. Podemos observar que nesta condição ocorreu o reconhecimento de uma única banda específica na fração de endossimbionte de *C. deanei* no ensaio de *Western blotting*, enquanto que na fração de mitocôndria não visualizamos nenhuma banda (Fig.30). Ensaaios por *Western blotting* utilizando anticorpos purificados por afinidade, mostraram a marcação de apenas uma banda na cepa de *C. deanei* contendo endossimbionte, mas a cepa curada não apresentou marcação. Já em amostras de proteínas solúveis e de membrana do endossimbionte, preparadas através de extração com sarcosil 0,5%, observamos marcação de uma banda na fração solúvel enquanto na fração de membrana a banda correspondente à porina mostra-se mais intensa, entretanto outras bandas também podem ser vistas (Fig. 31).

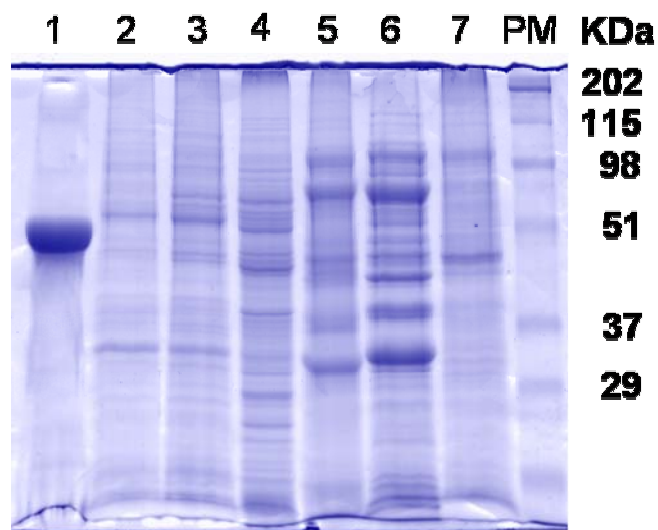


Figura 29: Análise eletroforética por SDS-PAGE em poliacrilamida 12% de extratos de proteínas. 1: Porina purificada (60 µg); 2: Extrato de proteínas de *C. deanei* com endossimbionte (10^8 protozoários); 3: Extrato de proteínas de *C. deanei* curada (10^8 protozoários); 4: Proteínas totais de mitocôndria (8 µg); 5: Proteínas totais de simbionte (8 µg); 6: Proteínas solúveis de simbionte (8 µg); 7: Proteínas de membrana de simbionte (6 µg); PM: Padrão de peso molecular.

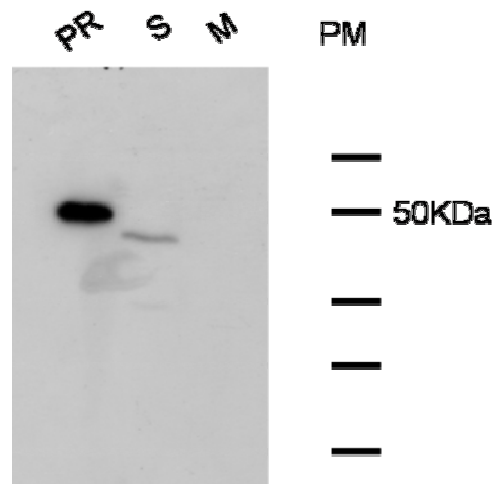


Figura 30: Western blotting da proteína recombinante (PR) e das frações de simbionte (S) e mitocôndria (M) usando anticorpos purificados por afinidade. A diluição de anticorpo utilizada foi de 1:250. PR: proteína recombinante; S: endossimbionte; M: Mitocôndria; PM: Padrão de peso molecular.

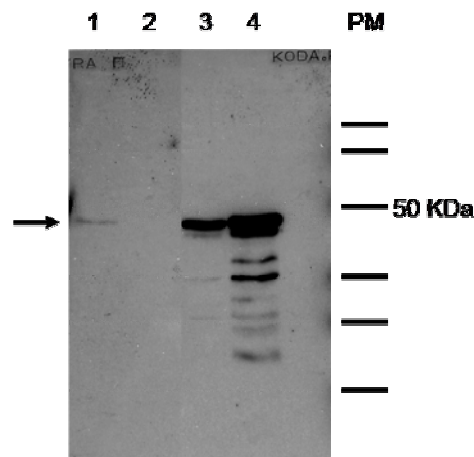


Figura 31: *Western blotting* das proteínas de *C. deanei* cepa normal (1), curada (2), proteínas solúveis (3) e proteínas de membrana (4) do endossimbionte usando anticorpos contra a proteína recombinante purificados por afinidade. A diluição utilizada foi de 1:250. PM: Padrão de peso molecular.

5.13 Ensaio de imunolocalização

5.14.1 Por microscopia ótica

Foram realizados processamentos de amostras para microscopia ótica de fluorescência utilizando-se células de *C. deanei* e o anticorpo anti-porina recombinante purificados por afinidade e diluídos 1:5. Utilizamos como anticorpo secundário, o anticorpo anti-mouse conjugado a Alexa-488. Observa-se, na microscopia ótica de fluorescência, que ocorreu uma marcação específica no endossimbionte de *C. deanei*. Além disso, observamos que em alguns protozoários a marcação na bactéria simbiótica ocorre de forma homogênea, enquanto em outros o endossimbionte apresenta marcação mais forte em seu envoltório (Fig. 32). As mesmas amostras também foram examinadas por microscópio confocal, realizando-se a reconstrução no plano Z (Fig. 33).

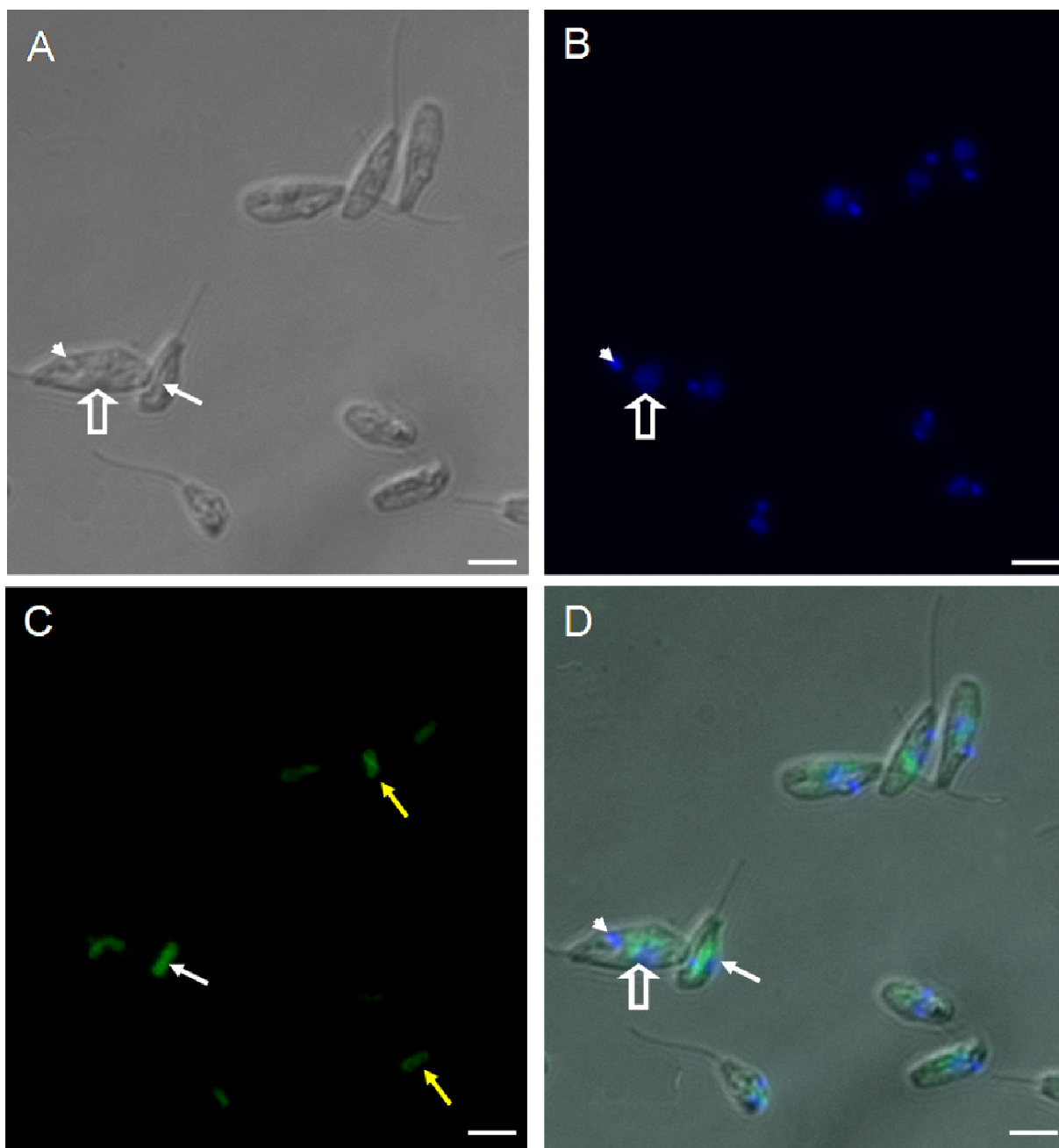


Figura 32: Microscopia ótica de fluorescência de *C. deanei* usando anticorpos anti-porina recombinante purificado por afinidade. A: microscopia de interferência (DIC), B: marcação com DAPI, C: uso do anticorpo anti-porina e anticorpo secundário Alexa-488, D: sobreposição do anticorpo anti-porina, DAPI e DIC. A seta branca indica o endossimbionte, que aparece marcado homogeneamente e a seta amarela o endossimbionte com marcação mais forte no envoltório. A cabeça de seta indica o cinetoplasto e a seta aberta o núcleo. Barras = 1 μ m

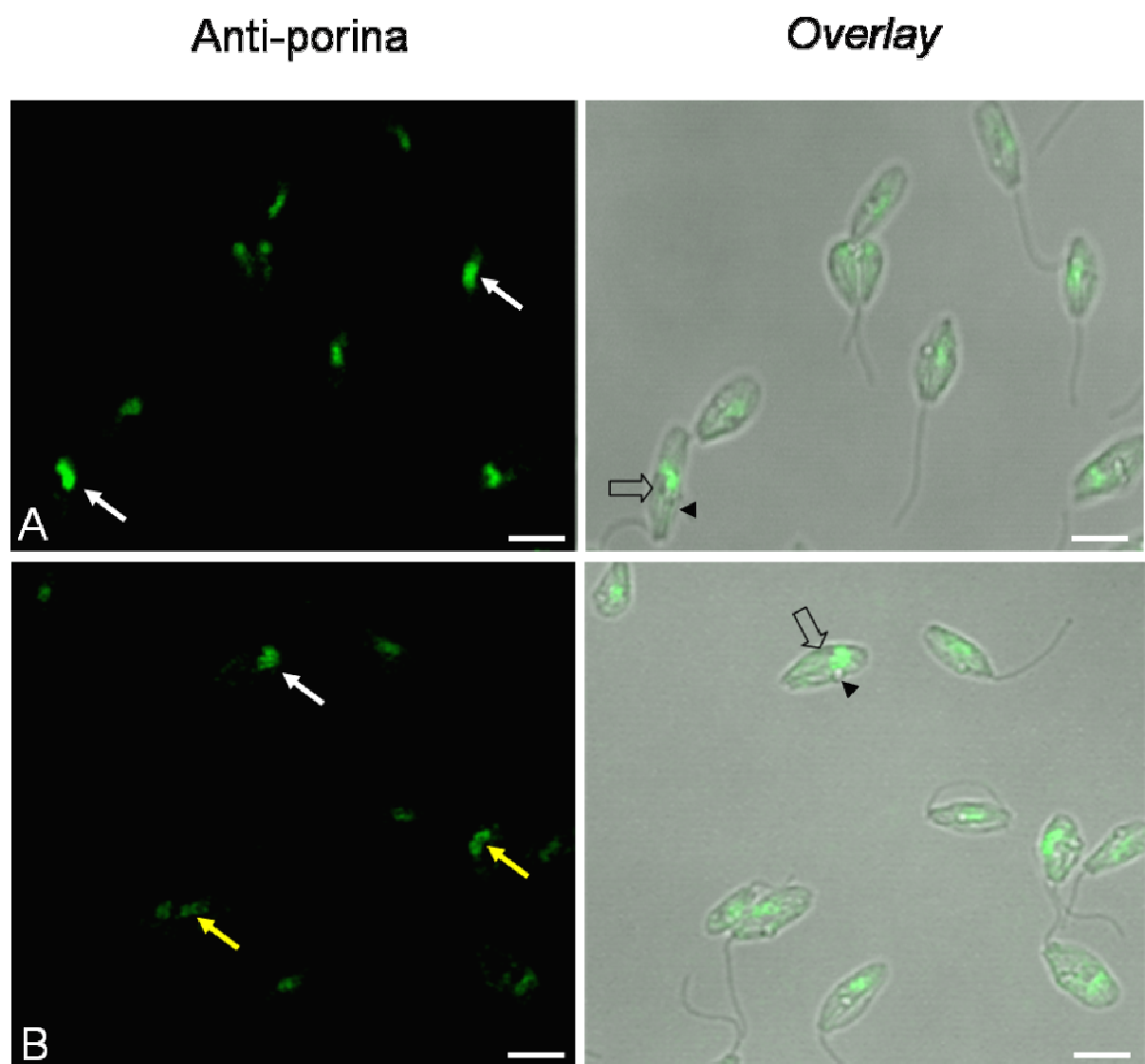


Figura 33: Microscopia ótica confocal de *C. deanei* mostrando marcação do endossimbionte pelo anticorpo anti-porina recombinante purificado (anticorpo primário) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado a Alexa-488. A: Setas brancas indicam endossimbiontes marcados de forma homogênea. B: As setas amarelas indicam simbiosites com marcação mais forte no envoltório. Seta larga: indica o núcleo. Cabeça de seta: cinetoplasto. Barras = 1 μ m.

5.14.2 Por microscopia eletrônica de transmissão

Grades de níquel contendo cortes de *C. deanei* emblocada em resina hidrofílica foram submetidas a ensaios de imunolocalização, nos quais foi utilizado o anticorpo anti-porina purificado por afinidade na concentração de 1:2. As partículas de ouro coloidal acopladas ao anticorpo secundário apresentam 15 nm. A imunocitoquímica ultraestrutural mostra marcação específica no endossimbionte, especialmente em sua membrana externa e uma marcação bem menos intensa na matriz bacteriana (Fig. 34).

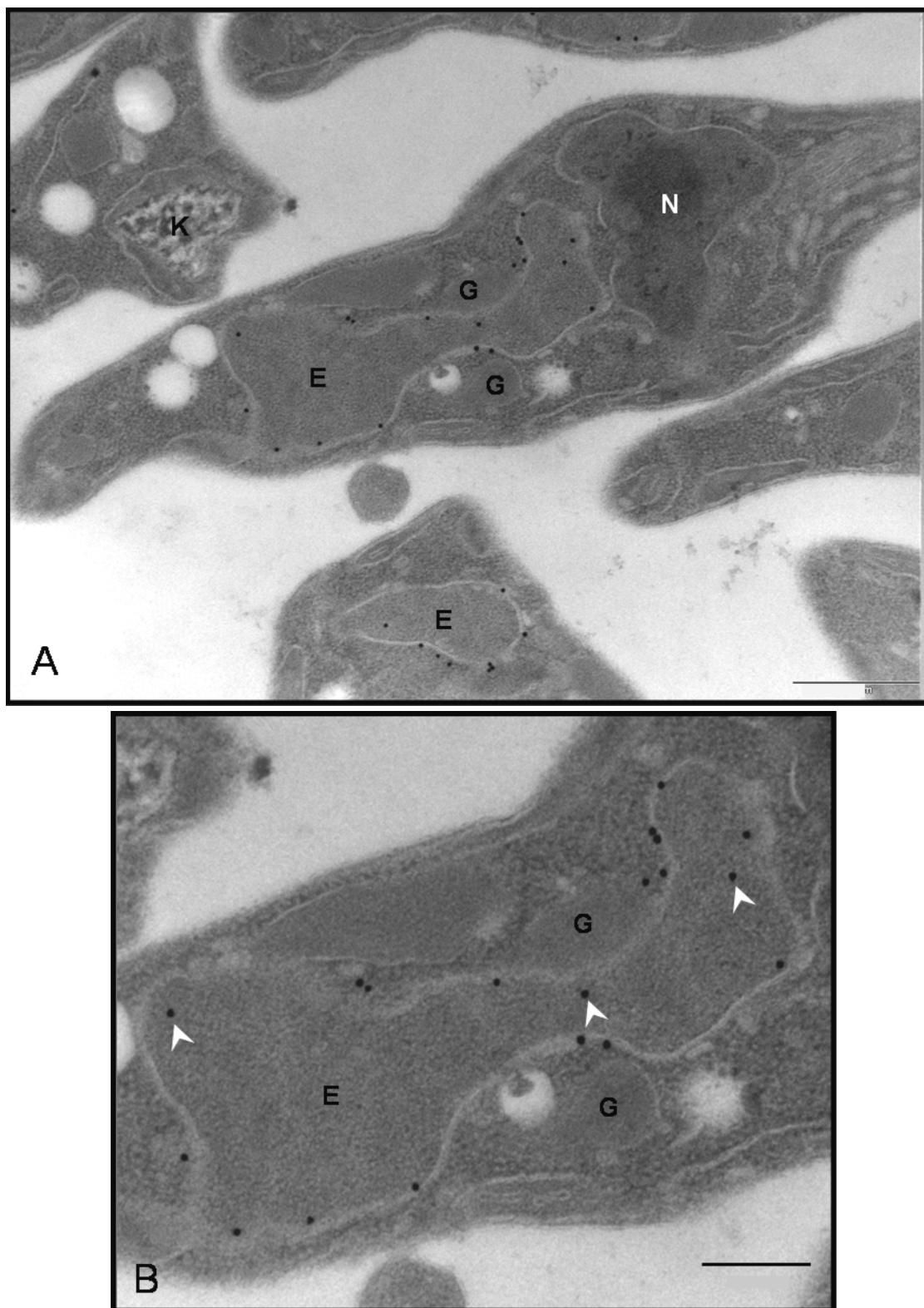


Figura 34: Imunocitoquímica ultraestrutural *C. deanei* usando anticorpo anti-porina purificado por afinidade como anticorpo primário e anticorpo secundário anti-mouse conjugado a partículas ouro coloidal de 15 nm. A: podemos observar a marcação específica do endossimbionte (E) e a sua proximidade em relação ao núcleo (N) e aos glicossomos (G) B: no inset em maior aumento, podemos observar marcação preferencial na membrana externa do endossimbionte. As cabeças de setas indicam algumas marcações na matriz bacteriana. Barras: 0,5 μ m (A) e 0,25 μ m (B).

6 DISCUSSÃO:

Tripanosomatídeos contendo uma bactéria simbiótica representam um excelente modelo de estudo sobre as relações entre procariotos e eucariotos e também para a melhor compreensão sobre a origem simbiótica das organelas. O genoma do endossimbionte de *C. deanei* encontra-se em fase final de anotação. Os dados obtidos indicam uma bactéria Gram-negativa do gênero *Bordetella* como provável ancestral. Vale ressaltar que o endossimbionte apresenta genoma reduzido, com aproximadamente 850 Kb (PROBST *et al.*, 2006), em relação ao procarioto ancestral, que possui um genoma de aproximadamente 4 Mpb (PARKHILL *et al.*, 2003). Sabemos, inclusive, que parte dos genes envolvidos na divisão do endossimbionte já foram perdidos (YIM *et al.*, 2005). Já foi observado que esta redução genômica pode ocorrer em bactérias que mantêm estreita relação com eucariotos, seja por simbiose (BLAXTER, 2007) ou parasitismo (WERNEGREEN, 2005). Organelas de origem simbiótica, como a mitocôndria e os cloroplastos também apresentam genoma reduzido por processos de perda ou transferência gênica para o núcleo da célula eucariota (KLEINE *et al.*, 2009).

Através da microscopia eletrônica de transmissão é possível observar que os endossimbiontes são envoltos por duas unidades de membrana, assim como ocorre com bactérias Gram-negativas, porém uma parede celular típica está ausente, sugerindo uma redução desta estrutura (SOARES & DE SOUZA, 1988; MOTTA *et al.*, 1991, 1997a). Entretanto, é importante destacar que a presença de parede celular reduzida é frequente em bactérias intracelulares obrigatórias, podendo ser uma condição que facilita as trocas metabólicas com o hospedeiro, permitindo a aquisição de nutrientes e moléculas energéticas (COSARO *et al.*, 1999; GOEBEL & GROSS, 2001).

As bactérias do gênero *Clamydia*, por exemplo, são parasitas intracelulares obrigatórias e após entrarem nas células hospedeiras, escapam da lise e localizam-se em

vacúolos. O envoltório destes procariotos é semelhante ao de Gram-negativos, apresentando membrana interna, externa, espaço periplasmático e lipopolissacarídeos que atuam como antígenos (RAULSTON, 1995). Porém, apesar das clamídias não apresentarem uma parede celular típica, possuem as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que estão envolvidas na síntese da camada de mureína ou peptidoglicano (GEORGOPAPADAKU & LIU, 1980; BARBOUR *et al.*, 1982). Os endossimbiontes de tripanosomatídeos também não apresentam uma parede celular típica de bactérias Gram-negativas quando observados ultraestruturalmente. Entretanto, as PBPs estão presentes e podem ser inibidas após o tratamento do protozoário hospedeiro com antibióticos β -lactâmicos, como cefalexina e ampicilina. O uso destes antibióticos impede a divisão do endossimbionte, que se torna filamentoso e sofre posteriormente lise celular. Estes dados sugerem que, apesar de reduzida, a parede no endossimbionte de tripanosomatídeos é importante para a forma e para a divisão celular (MOTTA *et al.*, 1997a).

A presença de uma proteína do tipo porina no envoltório do endossimbionte de *C. deanei* pode ser de fundamental importância para a realização de trocas metabólicas entre o procarioto e seu hospedeiro. É possível que tais proteínas transportem substratos, açúcares ou íons, que sejam essenciais para a manutenção da relação simbiótica. Em bactérias Gram-negativas, como em *E. coli*, a mudança do aminoácido glicina para asparagina na posição 119 da porina OmpF, reduz o tamanho do canal e implica em reduções drásticas na permeabilidade de açúcares e íons (JEANTEUR, 1991). Em *Pseudomonas aeruginosa*, já foi observado que mutantes que não apresentam a porina OprF, que transportam a rafinose, não são capazes de crescer tão rapidamente como o tipo selvagem (BELLIDO *et al.*, 1992), evidenciando a importância das porinas no metabolismo bacteriano. Recentemente, um complexo protéico formador de poro foi descrito em archeas. Tal complexo apresenta semelhanças com as porinas de bactérias Gram-negativas e promove a interação celular e

possível troca de nutrientes entre *Ignicoccus hospitalis* e, *Nanoarchaeum equitans*, a menor archaea até hoje descrita (BURGHARDT *et al.*, 2009).

Através de consultas às anotações do genoma do endossimbionte, encontramos uma sequência de nucleotídeos apresentando grande similaridade com porinas presentes na membrana externa de Gram-negativos. Além disso, o cruzamento de dados através do BLAST, utilizando a sequência de aminoácidos teórica desta proteína, resultou em grande similaridade (acima de 60%), com porinas presentes no gênero *Bordetella*. Dados da literatura mostram que *Bordetella pertussis* apresenta três porinas, sendo que a majoritária é uma proteína de seletividade iônica (PARKER & ARMSTRONG, 1988), com peso molecular de aproximadamente 39 KDa (LI *et al.*, 1991).

Em relação aos dados estruturais teóricos da porina do endossimbionte, obtivemos um score do programa PRED-TMBB dentro do padrão esperado para proteínas de membrana externa de bactérias. Além disso, previsões estruturais (TMRPres2D) realizadas através de três métodos diferentes disponíveis no programa revelaram resultados bastante similares: observamos que a porina putativa do endossimbionte apresenta seqüências na extremidade amino e carboxi terminal, que são características de porinas de Gram-negativos, devido à presença de seqüência-sinal e resíduo fenilalanina, respectivamente. Os dados mostraram também, 18 domínios transmembrana conectados entre si por curtas voltas no lado periplasmático e por longas alças voltadas para o lado externo, neste caso para o citoplasma do protozoário hospedeiro. Estes “loops” externos e longos apresentam predominância de aminoácidos polares, mas por outro lado, apresentam alguns aminoácidos apolares que contêm anel aromático, como a fenilalanina. Esta característica é considerada comum a porinas, visto que a superfície externa do barril- β pode apresentar cadeias laterais lipofílicas. Em *Rhodobacter capsulatus*, uma bactéria fixadora de nitrogênio, alguns aminoácidos aromáticos estão presentes tanto no lado interno quanto no lado externo do canal, nas interfaces entre a

bicamada lipídica e o meio aquoso (WEISS *et al.*, 1991). A presença destes anéis aromáticos também foi observada na estrutura da OmpF e na PhoE de *E. coli* (COWAN *et al.*, 1992), assim como em outras OMPs.

Os dados obtidos a partir da modelagem molecular comparativa gerada pelo software Modeller, reafirmam tais características e mostram ainda que os domínios transmembrana são constituídos por folhas β -pregueadas, enquanto o interior do canal contém uma região em α -hélice. De acordo com dados da literatura, as porinas bacterianas são constituídas por monômeros com 8 a 22 passagens pela membrana, na forma de cadeias β -pregueadas (BUCHANAN, 1999; KOEBNIK *et al.*, 2000). Usualmente, as porinas de *E. coli* apresentam em sua extremidade C-terminal o aminoácido fenilalanina, tal como ocorre com a OmpF e a PhoE (COWAN *et al.*, 1992). Além disso, as sequências transmembranares destas proteínas são conectadas por voltas curtas no lado periplasmático, e por “loops” longos no lado externo (NIKAIDO, 2003). Estas mesmas características foram encontradas na porina do endossimbionte, através de estudos de predição estrutural da sequência teórica desta proteína.

Em bactérias Gram-negativas, o número de cadeias β -pregueadas que forma a estrutura de poro é bastante variado. As porinas não específicas apresentam em geral 16 domínios transmembranares, enquanto as porinas específicas e as que formam canais acoplados a receptores apresentam 18 e 22 domínios, respectivamente. No endossimbionte de tripanosomatídeos, a proteína semelhante a porina apresenta 18 domínios de membrana que correspondem às regiões de folhas β e possivelmente se arranja na forma de um canal. Estudos futuros são necessários para caracterizar a estrutura e as funções desta proteína.

Neste trabalho, sugerimos a presença de uma sequência gênica no endossimbionte capaz de codificar uma proteína similar à porinas de bactérias Gram-negativas, cujo gene foi clonado e expresso em *E. coli* e a proteína avaliados através de ensaios de *Western blotting* e imunolocalização. Através de *Western blotting* observamos que a proteína realmente se

encontra no endossimbionte, visto que anticorpos purificados anti-proteína recombinante só reagiram com proteínas da cepa de *C. deanei* contendo simbionte e da fração de bactérias isoladas, e não com proteínas da cepa curada. A detecção de uma banda intensa na amostra de proteínas solúveis do endossimbionte pode ter ocorrido pela solubilização parcial das proteínas de membrana, pela ação do detergente utilizado ou pode ainda representar porinas em diferentes fases de síntese ou de processamento.

A partir dos resultados de imunomarcagem obtidos por microscopia de fluorescência, verificamos que o soro purificado obtido contra a porina recombinante marcou o endossimbionte de modo homogêneo ou mais fortemente o seu envoltório. Entretanto, dados de imunocitoquímica ultraestrutural observados por microscopia eletrônica de transmissão, mostram uma marcação preferencial do envoltório do endossimbionte, especialmente da membrana externa, ainda que uma marcação bastante fraca seja observada na matriz bacteriana. A marcação da matriz do endossimbionte com o anticorpo anti-porina e no *Western blotting* de suas proteínas solúveis e de membrana é compatível com a descrição da produção *in vivo* deste tipo de proteína, já que a sua síntese inicia-se no citoplasma (NIKAIDO, 2003; VALENTIN-HANSEN; 2007). O fato de componentes da bactéria simbiótica mostrarem reação com anticorpo anti-proteína recombinante (homogênea ou no envoltório) pode estar relacionado à expressão diferenciada desta porina ao longo do ciclo celular. Isto porque, precisamos considerar que este tipo de proteína é capaz de transportar íons e metabólitos entre a bactéria e seu hospedeiro eucarioto (KOEBNIK *et al.*, 2000). É importante ainda mencionar, que a expressão de porinas pode ser regulada em condições ambientais diversas e após mudanças químicas do meio (NIKAIDO, 2003; VALENTIN-HANSEN; 2007). Ensaios fisiológicos futuros são necessários para desvendarmos qual a real função desta porina encontrada no endossimbionte de *C. deanei*.

A presença de proteína semelhante a porina no envoltório do endossimbionte reforça a idéia de que esta bactéria representa um passo evolutivo entre procariotos e organelas. Neste sentido, é interessante destacar que as organelas de origem simbiótica, como mitocôndrias e cloroplastos, são integrados ao metabolismo da célula eucariótica pela presença de porinas em suas respectivas membranas externas (NIKAIDO, 2003; DUY *et al.*, 2007). As mitocôndrias possuem canais correspondentes à porinas, os VDAC, que apresentam seletividade a cátions e menor permeabilidade a nucleotídeos trifosfatados. Além disso, tais proteínas podem ser reguladas por metabólitos, substratos e nucleosídeos, os quais controlam a permeabilidade da membrana externa. Alguns fatores moduladores destas porinas se localizam no espaço intramembranar, tal como o β -NADH. Isto permite que metabólitos como o NADH possam controlar as trocas através dos VDACs, exercendo assim, o controle sobre a respiração (LUI & COLOMBINI, 1992; LEE *et al.*, 1994). Já os cloroplastos exibem 3 proteínas formadoras de canais: a OEP16, OEP21, e OEP24. A OEP16 assume um papel no metabolismo de nitrogênio da planta por estar relacionada à captação de aminoácidos. A OEP21 constitui um canal seletivo de ânions, podendo ser modulada por ATP para baixa seletividade a cátions e transportando intermediários metabólicos como fosfato inorgânico. Já a OEP24 possui função similar às VDACs mitocondriais, operando como um poro de difusão de solutos (BÖLTER & SOLL, 2001).

Esta é a primeira vez que se mostrou uma proteína marcadora de membrana externa no envoltório do endossimbionte de tripanosomatídeos. A presença de porinas nos permite sugerir que a membrana externa tem origem procariota, como anteriormente sugerido por outros autores (GUTTERIDGE & MACADAM, 1971; SOARES & DE SOUZA, 1988; MOTTA *et al.*, 1991). Este estudo possui grande relevância, pois a caracterização da composição protéica do envoltório do endossimbionte possibilita um melhor entendimento

sobre as intensas trocas metabólicas, que caracterizam a relação de endossimbiose em tripanosomatídeos.

7 CONCLUSÕES

- O genoma do endossimbionte de *C. deanei* apresenta uma sequência gênica que codifica uma proteína semelhante a porina, que é característica da membrana externa em bactérias Gram-negativas.
- A sequência de aminoácidos da proteína deduzida da sequência gênica apresenta grande identidade positiva com porinas de bactérias pertencentes ao gênero *Bordetella*.
- A predição estrutural da porina do endossimbionte, indica que esta proteína possui estrutura semelhante à porinas de Gram-negativos, apresentando 18 domínios transmembrana na forma de cadeias β -pregueadas.
- A porina do endossimbionte é expressa de maneira insolúvel, sendo necessário o uso de detergentes que mimetizem o ambiente de membrana para que ela seja reenovelada e mantida com suas características nativas.
- Ensaios de imunolocalização usando anticorpos anti-porina do endossimbionte mostram que esta proteína está localizada principalmente no envoltório.
- A origem da membrana externa no endossimbionte de *C. deanei* parece ser procariota.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, S. C. & CAMARGO, E. P. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts. Experimental Parasitology. **53**: 371-380, 1982.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. **215**: 403-410. 1990.
- ARMSTRONG, S. K., PARR, T. R. JR., PARKER, C. D., & HANCOCK, R. E. W. *Bordetella pertussis* major outer membrane protein forms small, anion-selective channels in lipid bilayer membranes. J. Bacteriol. **166**: 212-216, 1986.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SMITH, J. A., SEIDMAN, J. G. & STRUHL, K. Current protocols in molecular biology 1987-1988. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, Inc., New York. Vol. Único: **2.4.1-2.4.5**. 1987.
- AZEVEDO-MARTINS, A. C., FROSSARD, M. L., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M. & MOTTA, M. C. M. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia deanei*: the influence of the endosymbiont. FEMS Microbiol Lett. **275**: 229-236, 2007.
- BAGOS, P. G., LIAKOPOULOS, T. D., SPYROPOULOS, I. C. & HAMODRAKAS, S. J. PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. Nucleic acids research. **32**: 400-404, 2004.
- BARBOUR, A. G., AMANO, K., HACKSTADT, T., PERRY, L., CALDWELL, H. D. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. J. Bacteriol. **151**: 420-428, 1982.
- BAUMANN, P. & MORAN, N. A. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and others hosts. Antonie Van Leeuwenhoek. **72**: 39-48, 1997.

- BAYER, M. H., COSTELLO, G. P. & BAYER, M. E. Isolation and partial characterization of membrane vesicles carrying markers of the membrane adhesion sites. J. Bacteriol. **2**: 758-767. 1982.
- BELLIDO, F. N. L., MARTIN, R. J., SIEHNEL & HANCOCK, R. E. W. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. J. Bacteriol. **174**: 5196–5203, 1992.
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N. & BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. Nucleic acids research. **28**: 235-242. 2000.
- BLAXTER, M. Symbiont Genes in Host Genomes: Fragments with a Future? Cell Host & Microbe Previews. **2**: 211-213. 2007.
- BRANDÃO, A. A., MIRANDA, A., DEGRAVE, W. M. & SOUSA, M. A. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. Parasitol Res. **86**: 809-812, 2000.
- BRAY, D., LEVIN, M. D. & MORTON-FIRTH, C. J. Receptor clustering as a cellular mechanism to control sensitivity. Nature. **393**: 85-8, 1998.
- BRENNAN, M. J., LI, Z. M., COWELL, J. L., BISHER, M. E., STEVEN, A. C., NOVOTNY, P. & MANCLARCK, C. R.. Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. Infect. Immune. **56**: 3189-3195, 1988.
- BRUESK, W. A. The diplosome of *Blastocrithidia culicis*. Ph.D. dissertation, University of Minnesota, Minneapolis, 1967.
- BOLLA, J. M., LAZDUNSKI, C. & PAGÈS, J. M. The assembly of the major outer membrane protein OmpF of *Escherichia coli* depends on lipid synthesis. EMBO J. **7**:3595-3599, 1988.

- BÖLTER, B., SOLL, J., HILL, K., HEMMLER, R. & WAGNER, R. A rectifying ATP-regulated solute channel in the chloroplastic outer envelope from pea. EMBO J. **18**: 5505-5516, 1999.
- BOURSAUX-EUDE, C. & GUISO, N. Polymorphism of repeated regions of pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun. **68**: 4815-4817, 2000.
- BUCHANAN, S. K. Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. Curr Opin Struct Biol. **9**: 455-461, 1999.
- BURGHARDT, T., JUNGLAS, B., SIEDLER, F., WIRTH, R., HUBER, H. & RACHEL, R. The interaction of *Nanoarchaeum equitans* with *Ignicoccus hospitalis*: proteins in the contact site between two cells. Biochem Soc Trans. **37**: 127-132, 2009.
- CABEEN, M. T. & JACOBS-WAGNER, C. Bacterial Cell Shape. Nature rev. Microbiol. **3**: 601-609, 2005.
- CALDWELL, H. D., KROMHOUT, J. & SCHACHTER J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect immune. **31**: 1161-1176, 1981.
- CAMARGO, E. P. & FREYMÜLLER, E. Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyl transferase in a trypanosomatid. Nature. **270**: 52-53, 1977.
- CHANG, K. P. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*. J Protozool. **21**: 699- 707, 1974.
- CHANG, K. P. Reduced growth of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti* freed of intracellular symbionts by chlorophenicol. J Protozool. **22**: 271-276, 1975.
- CHANG, K. P., CHANG, C. S. & SASSA, S. Heme biosynthesis in bacterium-protozoan symbiosis: enzymic defects in host hemoflagellates and complementary role of their intracellular symbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**: 2979-2983, 1975.

- CHARLES, I. G., DOUGAN G., PICKARD D., CHATFIELD S., SMITH M., NOVOTNY P., MORRISSEY, P. & FAIRWEATHER, N. F. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. Proc. Natl. acad. Sci. USA. **86**: 3554-3558, 1989.
- COHEN, S. S. A guide of the polyamines. Oxford University Press, UK, 1^a ed. 595 pp. 1998.
- COPELAND, A., LUCAS, S., LAPIDUS, A., BARRY, K., DETTER, J.C., GLAVINA DEL RIO, T., HAMMON, N., ISRANI, S., DALIN, E., TICE, H., PITLUCK, S., CHAIN, P., MALFATTI, S., SHIN, M., VERGEZ, L., SCHMUTZ, J., LARIMER, F., LAND, M., HAUSER, L., KYRPIDES, N., TIEDJE, J. & RICHARDSON, P. Complete sequence of Chromosome1 of *Burkholderia vietnamiensis* G4. National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, USA. Submitted (30-MAR-2007).
- CORSARO, D., VENDITTI, D., PADULA, M. & VALASSINA, M. Intracellular life. Crit. Rev. Microbiol. **25**: 39-79, 1999.
- COWAN, S. W., SCHIRMER, T., RUMMEL, G., STEIERT, M., GHOSH, R., PAUPTIT, R. A., JANSONIUS, J. N. & ROSENBUSCH, J. P. Crystal structures explain functional properties of two *Escherichia coli* porins. Nature. **358**: 727–733, 1992.
- DANIEL, R. A. & ERRINGTON, J. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. Cell. **113**:767-76, 2003.
- DE COCK, H. & TOMMASSEN, J. Lipopolysaccharides and divalent cations are involved in the formation of an assembly-competent intermediate of outer-membrane protein PhoE of *E.coli*. EMBO J. **15**: 5567-5573, 1996.
- DE KORT G., BOLTON A., MARTIN G., STEPHEN, J. & VAN DE KLUNDERT, J.A. Invasion of rabbit ileal tissue by *Enterobacter cloacae* varies with the concentration of OmpX in the outer membrane. Infect Immun. **62**: 4722-4726, 1994.

- DELIHAS, N. & FORST, S. MicF: na antisense RNA gene involved in response of *E. coli* to global stress factors. J. Mol. Biol. **313**: 1-12, 2001.
- DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. Parasitol Research. **88**: 1013–1025, 2002.
- DE SOUZA, W. & MOTTA, M. C. M. Endosymbiosis in Trypanosomatids. FEMS Microbiol. Letters. **173**: 1-8, 1999.
- DOCAMPO R., DE SOUZA, W., MIRANDA, K., ROHLOFF, P. & MORENO, S. N. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nat Rev Microbiol. **3**: 251-261, 2005.
- DU, Y., MCLAUGHLIN, G. & CHANG, K. P. 16S ribosomal DNA sequence identities of β -proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. J.Bacteriol.**176**: 3081-3084, 1994.
- DUY, D., SOLL, J. & PHILIPPAR, K. Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. Biol. Chem. **388**: 879-889, 2007.
- DWYER, D. M. & CHANG, K. P. Surface membrane carbohydrate alterations of a flagellated protozoan mediated by bacterial endosymbionts. Proc. Natl. Acad. Sci USA **73**: 852-856, 1976.
- EPPENS, E. F., NOUWEN, N. & TOMMASSEN, J. Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. EMBO J. **16**: 4295-4301, 1997.
- ERNST, R., GUINA, T. & MILLER, S. I. How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host immune responses. J. Infect Dis. **179**: 326-330, 1999.
- ESTEVEES, M. J. G., ANDRADE, A. F. B., ANGLUSTER, J., DE SOUZA, W., MUNDIM, M. H., ROITMAN, I. & PEREIRA, M. E. A. Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. Eur. J. Cell Biol. **28**: 244-248, 1982.

- ESWAR, N., MARTI-RENOM, M. A., WEBB, B., MADHUSUDHAN, M. S., ERAMIAN D., SHEN, M. Y., PIEPER, U. & SALI, A. Comparative protein structure modeling using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics, vol. **Supplement 15 John Wiley & Sons, Inc.**, pp. 5.6.1-5.6.30, 2000.
- FAMPA, P., CORRÊA-DA-SILVA, M. S., LIMA, D. C., OLIVEIRA, S. M., MOTTA, M. C. & SARAIVA, E. M. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. Int J Parasitol. **33**: 1019-1026, 2003.
- FARIA E SILVA, P. M., SOLÉ-CAVA, A. M., SOARES, M. J., MOTTA, M. C. M., FIORINI, J. E. & DE SOUZA, W. *Herptomonas roitmani* (Fiorini *et al.*, 1989) n. Comb.: a trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm. J. protozool. **38**: 489-494, 1991.
- FARIA E SILVA, P. M., FIORINI, J. E., SOARES, M. J., ALVIANO, C. S., DE SOUZA, W. & ANGLUSTER, J. Membrane-associated polyssacarides composition in *Herptomonas roitmani*: influence of the endosymbiont. J. Eukaryotic Microbiol. **41**: 55-59, 1994.
- FIGGE, R. M., DIVAKARUNI, A. V. & GOBER, J. W. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. Mol Microbiol. **51**: 1321-1332, 2004.
- FINLAY, B. B. Bacterial disease in diverse hosts. Cell. **96**: 315-318, 1999.
- FINLAY, B. B. & COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science. **276**: 718-725, 1997.
- FINLAY, B. B. & FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revised. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 136-169, 1997.
- FINN, T. M., LI, Z. & KOCSIS, E. Identification of a *Bordetella pertussis* *bvg*-regulated porin-like protein. J. Bacteriol. **177**: 805-809, 1995.

- FIORINI, J. E, FARIA E SILVA, P. M., SOARES, M. J. & BRAZIL, R. P. Três novas espécies de tripanosomatídeos isolados em Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. **84**: 69-74, 1989.
- FISHER, J., MEROUEH, S. & MOBASHERY, S. Nanomolecular and Supramolecular Paths toward Peptidoglycan Structure. Microbe. **1**: 420-427. 2006.
- FREYMULLER, E. & CAMARGO, E. P. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. J Protozool **2**: 175-182, 1981.
- FROSSARD, M. L., SEABRA, S. H., DAMATTA, R. A., DE SOUZA, W., DE MELLO, F. G. & MOTTA, M. C. M. An endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids. Biochem Biophys Res Commun **343**: 443-449, 2006.
- GADELHA, C., WICKSTEAD, B., DE SOUZA, W., GULL, K. & CUNHA-E-SILVA, N. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. Eukaryot Cell **4**: 516-524, 2005.
- GALINARI, S. & CAMARGO, E. P. Trypanosomatid protozoa: survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. Exp. Parasitol. **46**: 277-282, 1978.
- GEORGOPAPADAKOU, N. H., LIU, F. Y. Penicillin-binding proteins in bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. **18**: 148-157, 1980.
- GILL, J. W. & VOGEL, H. J. A bacterial endosymbiont in *Crithidia* (Strigmonas) *oncopelti*: biochemical and morphological aspects. J. Protozool. **10**: 148-152, 1963.
- GRAM, H. C. J. Über die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortschr. Med. **2**: 185-189, 1884.
- GOEBEL, W. & GROSS, R. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. Trends Microbiol. **9**: 267-273, 2001.

- GOLDBERG, M. B, DIRITA, V. J. & CALDERWOOD, S. B. Identification of an iron-regulated virulence determinant in *Vibrio cholerae*, using TnpA mutagenesis. Infect Immun **58**: 55-60, 1990.
- GÖRTZ, H. D. & BRIGGE, T. Intracellular bacteria. Naturwissenschaften. **85**: 359-368, 1998.
- GUERX, N. & PEITSCH, M. C. Swiss-Model and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling, Electrophoresis. **18**: 2714-2723. 1997.
- GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Annu. Rev. Microbiol. **53**: 629-655, 1999.
- GUTTERIDGE, W. E. & MACADAM, R. F. An electron microscopic study of the bipolar bodies in *Crithidia oncopelti*. J. Protozool. **18**: 637- 640, 1971.
- HALL, B. F. & JOINER, K. A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. Parasitol. Today. **7**: 22-25, 1991.
- HATCH, T. P., AL-HOSSAINY E. & SILVERMAN J. A. Adenine nucleotide and lysine transport in *Chlamydia psittaci*. J Bacteriol. **150**: 662-670, 1982.
- HANCOCK, R. E. Role of porins in outer membrane permeability. J Bacteriol. **169**: 929-933, 1987.
- HENDERSON, I. R., NAVARRO-GARCIA, F. & NATARO, J. P. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol. **6**: 370-378, 1998.
- HENDERSON, I. R., CAPELLO, R. & NATARO, J. P., Autotransporter sporter proteins, evolution and redefining protein secretion. Trends Microbiol. **8**: 529-532, 2000.
- HENDERSON, I. R. & NATARO, J. P. Virulence functions of autotransporter proteins. Infect. Immun. **69**: 1231-1243, 2001.
- HINDAHL, M. S. & IGLEWSKI, B. H. Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. J.Bacteriol.**159**: 107-113, 1984.

- HOLDEN, M. J. & COLOMBINI, M. The mitochondrial outer membrane channel, VDAC, is modulated by a soluble protein. FEBS Lett. **241**: 105-109, 1988.
- HONG, H. & TAMM, L. K. Elastic coupling of integral membrane protein stability to lipid bilayer forces. Proc Natl Acad Sci U S A. **101**: 4065-4070, 2004.
- HUMPHREY, W., DALKE, A. & SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. Journal of molecular graphics. **14**: 27-38, 1996.
- JEANTEUR, D., SCHIRMER, T., FOUREL, D., SIMONET, V., RUMMEL, G., WIDMER, C., ROSENBUSCH, J. P., PATTUS, F. & PAGES, J. M. Structural and functional alterations of a colicin-resistant mutant of OmpF porin from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**: 10675–10679, 1994.
- JENKINS, C., SAMUDRALA, R., ANDERSON, I., HEDLUND, B. P., PETRONI, G., MICHAILOVA, N., PINEL, N., OVERBEEK, R., ROSATI, G. & STALEY, J. T. Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. Proc Natl Acad Sci U S A. **99**: 17049-17054. Epub 2002 Dec 16, 2002.
- KLEBBA, P. E., NEWTON, S. M. Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. Curr Opin Microbiol. **2**: 238-247, 1998.
- KLEINE, T., MAIER, U. G. & LEISTER, D. DNA Transfer From Organelles to the Nucleus: The Idiosyncratic Genetics of Endosymbiosis. Annu Rev Plant Biol. **60**: 115–138, 2009.
- KOEBNICK, R., LOCHER, K. P. & VAN-GELDER, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol. Microbiol. **37**: 239-253, 2000.
- LASKOWSKI, R., MACARTHUR, M., MOSS, D. & THORNTON, J. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. Journal of Applied Crystallography. **26**: 283-291. 1993.

- LEE, A. C., XU, X., BLACHLY-DYSON, E., FORTE, M. & COLOMBINI, M. β -NADH decreases the permeability of the mitochondrial outer membrane to ADP by a factor of 6. J. Biol. Chem. **269**: 30974-30980, 1994.
- LENINGER, E., ROBERTS, M., KENIMER, J. G., CHARLES, I. G., FAIR-WEATHER, N., NOVOTNY, P. & BRENNAN, M. J. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**: 345-349, 1991.
- LENINGER E., EWANOWICH, C. A., BHARGAVA, A., PEPPLER, M. S., KENIMER, J. G., & BRENNAN, M. J. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. Infect. Immun. **60**: 2380-2385, 1992.
- LI, L. J., DOUGAN G., NOVOTNY, P. & CHARLES, I. G. P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **5**: 409-417, 1991.
- LI, L. J., FAIRWEATHER, N. F., NOVOTNY, P., DOUGAN, G. & CHARLES, I. G. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. J. Gen. Microbiol. **5**: 409-417, 1992.
- LI, Z. M., HANNAH, J. H., STIBITZ, S., NGUYEN, N. Y., MANCLARK, C. R. & BRENNAN, M. J. Cloning and sequencing of the structural gene for the porin protein of *Bordetella pertussis*. Mol. Microbiol. **5**: 1649-1656, 1991.
- LIU M. Y., COLOMBINI, M. Voltage gating of the mitochondrial outer membrane channel VDAC is regulated by a very conserved protein. Am. J. Physiol. **260**: 371-374, 1991.

- LIU, M. Y. & COLOMBINI, M. Regulation of mitochondrial respiration by controlling the permeability of the outer membrane through the mitochondrial channel, VDAC. Biochim. Biophys. Acta, **1098**: 255-260, 1992.
- LOMIZE, M. A., LOMIZE, A. L., POGOZHEVA, I. D. & MOSBERG, H. I. OPM: orientations of proteins in membranes database. Bioinformatics. **22**: 623-625, 2006.
- LÓPEZ-LARA, I. M. & GEIGER, O. Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. J Biotechnol. **91**: 211-221, 2001.
- MACHEBOEUF, P., CONTRERAS-MARTEL, C., JOB, V., DIDEBERG, O. & DESSEN, A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. FEMS Microbiol Rev. **30**: 673-691, 2006.
- MARMUR, J., CAHOON, M. E., SHIMURA, Y. & VOGEL, H. DNA type attributable to a bacterial endosymbiont in the protozoon *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*. Nature **196**: 1228-1229, 1963.
- MC LAUGHLIN, G. L. & CAIN, G. D. Characterization of whole-cell and organelle protein synthesis in normal and aposymbiotic strains of *Crithidia oncopelti* and *Blastocrithidia culicis*. Comp. Biochem. Physiol. **82B**: 479-486, 1985.
- MORRIS, D. M. & JENSEN, G. J. Toward a biomechanical understanding of whole bacterial cells. Annu Rev Biochem. **77**: 583-613, 2008.
- MOTTA, M. C. M., SOARES, M. J. & DE SOUZA, W. Freeze-fracture study of endosymbiont-bearing trypanosomatids of the *Crithidia* genus. Micr. Electr. Biol. Cel. **15**: 131-144, 1991.
- MOTTA, M. C. M., MONTEIRO-LEAL, L. H., DE SOUZA, W., ALMEIDA, D. F. & FERREIRA, L. C. S. Detection of penicillin-binding proteins in endosymbionts of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. J. Euk. Microbiol. **44**: 492-496, 1997a.

- MOTTA, M. C. M., SOARES, M. J., ATTIAS, M., MORGADO, J., SAAD-NEHME, J. MEYER-FERNANDES, J. R. & DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. Eur. J. Cell Biol. **72**: 370-377, 1997b.
- MUNDIM, M. H., ROITMAN, J., HERMANS, M. A. & KITAJIMA, E.W. Simple nutrition of *Crithidia deanei* a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. J. Protozool. **21**: 518-521, 1974.
- MUNDIM, M. H. & ROITMAN, I. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. J. Protozool. **24**: 329-331, 1977.
- NEWTON, B. A. & HORNE, R. W. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*: 1 cytoplasmatic structures ribonucleoprotein. Exp. Cell Res. **13**: 563-574, 1957.
- NEWTON, B. A., Biochemical peculiarities of trypanosomatid flagellates. Annu Rev Microbiol. **22**: 109-30, 1968.
- NICHOLSON, M. L. & BEALL, B. Disruption of *tonB* in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. Microbiol. **145**: 2453-2461, 1999.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. & VON HEIJNE, G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Engineering. **10**:1-6, 1997.
- NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. J. Biol. Chem. **269**:3905–3908, 1994.
- NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67**: 593-656, 2003.
- NOGUCHI, H. & TILDEN, E. B. Comparative studies of herpionads and leishmanias. J. Exp. Med. **44**: 307, 1926.

- NOVAK, E., FREYMULLER, H., DA SILVA, S. & DA SILVEIRA, J. F. Protein synthesis in isolated symbionts from the flagellate protozoon *Crithidia deanei*. J. Protozool. **35**: 375-378, 1988.
- NOVEY, F. G., MCNEAL, W. J. & TORREY, H. N. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. J. Infect. Dis. **4**: 223-276, 1907.
- ODA, L. M., ALVIANO, C. S., COSTA E SILVA FILHO, F., ANGLUSTER, J., ROITMANI, I. & DE SOUZA, W. Surface anionic group in symbiot-bearing and symbiont-free strains of *Crithidia deanei*. J. Protozool. **31**: 131-134, 1984.
- OLIVER, D. C., HUANG, G., NODEL, E., PLEASANCE, S. & FERNANDEZ, R. C. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. Mol Microbiol. **47**: 1367-1383, 2003.
- OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Ann. Rev. Microbiol. **41**: 127- 151, 1987.
- OPPERDOES, F. R. & BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glicosome. FEBS Lett. **80**: 360-364, 1977.
- PALMIÉ-PEIXOTO, I., ROCHA, M., URBINA, J., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M. & MOTTA, M. C. M. Effects of sterolbiosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS Microbiol. Lett. **255**: 33-42, 2006.
- PARKER, C. D. & ARMSTRONG, S. K. Surface proteins of *Bordetella pertussis*. Rev Infect Dis. **10**: 327-30, 1988.
- PARKHILL, J., SEBAIHIA, M., PRESTON, A., MURPHY, L. D., THOMSON, N., HARRIS, D. E., HOLDEN, M. T., CHURCHER, C. M., BENTLEY, S. D., MUNGALL, K. L., CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M., TEMPLE, L., JAMES, K., HARRIS, B., QUAIL, M. A., ACHTMAN, M., ATKIN, R., BAKER, S., BASHAM, D., BASON, N., CHEREVACH, I., CHILLINGWORTH, T., COLLINS, M., CRONIN, A.,

- DAVIS, P., DOGGETT, J., FELTWELL, T., GOBLE, A., HAMLIN, N., HAUSER, H., HOLROYD, S., JAGELS, K., LEATHER, S., MOULE, S., NORBERCZAK, H., O'NEIL, S., ORMOND, D., PRICE, C., RABBINOWITSCH, E., RUTTER, S., SANDERS, M., SAUNDERS, D., SEEGER, K., SHARP, S., SIMMONDS, M., SKELTON, J., SQUARES, R., SQUARES, S., STEVENS, K., UNWIN, L., WHITEHEAD, S., BARRELL, B. G. & MASKELL, D. J. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet. **35**: 32-40, 2003.
- PEI, J. & GRISHIN, N. V. PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. Bioinformatics. doi: 10.1093/bioinformatics/btm017, 2007
- PODLIPAEV, S. A. & ROKITSKAYA, T. A. Classification of isolate of insects trypanosomatids: isoenzymes analysis. Parasitol (ST Petersburg). **33**: 350-357, 1999.
- POHLMAYER, K., SOLL, J., STEINKAMP, T., HINNAH, S. & WAGNER, R. Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. Proc Natl Acad Sci U S A. **94**: 9504-9509. 1997.
- PROBST, C. M., LEONE, L. N. Y., FOTI, L., UMAKI, A. C. S., GONÇALVES, R. E., SATAKE, T. S., MOTTA, M. C. M., FRAGOSO, S. P., GOLDENBERG, S. & KRIEGER, M. A. Structural and functional genomics of a endosymbiotic process: *Crithidia deanei* as a model. Anais da Sociedade Brasileira de Protozoologia. Vol. **Único**: 139, 2006.
- PROVENZANO, D. & KLOSE, K. E., Altered expresion of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**: 10220-10224, 2000.

- RAULSTON, J. E. Chlamydial envelope components and pathogen-host cell interactions. Mol Microbiol. **15**: 607-616, 1995.
- REIDL, J. & KLOSE, K. E. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol Rev. **26**: 125-139. 2002.
- REUMANN, S., MAIER, E., BENZ, R. & HELDT, H. W. The membrane of leaf peroxisomes contains a porin-like channel. J. Biol. Chem. **270**: 17559–17565, 1995.
- REUMANN, S., MAIER, E., BENZ, R. & HELDT, H. W. A specific porin is involved in the malate shuttle of leaf peroxisomes. Biochem. Soc. Trans. **24**: 754–757, 1996.
- RUDDER, K. E. E., THOMAS-OATES, J. E. & GEIGER, O. Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. **156**: 271-274, 1997.
- RUIZ, N., KAHNE, D. & SILHAVY, T. J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. Nat. Rev. Microb. **4**: 57-66, 2006.
- SALZMAN, T. A., DEL, C., BATTLE, A. M., ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. Heme synthesis in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiont. Int. J. Biochem. **17**: 1343-1347, 1985.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. 3rd edition, 2001.
- SCHULTZ, G. E. The structure of bacterial outer- membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta **1565**: 308-317, 2002.
- SEN, K. & NIKAIDO, H. In vitro trimerization of OmpF porin secreted by spheroplasts of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. **87**: 743-747, 1990.
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Analytical chemistry. **68**: 850-858, 1996.

- SHIMIZU, S., KONISHI, A., KODAMA, T., TSUJIMOTO, Y. BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**: 3100-3105, 2000.
- SHLOMAI, J. The assembly of kinetoplast DNA. Parasitol Today **10**: 341-346, 1994.
- SOUSA, M. A. & CORTE-REAL, S. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei*: proposal of a new genus. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. **33**: 58, 1991.
- SOARES, M.J., DE SOUZA, W. Fine structures of *Blastocrithidia culicis* as seen in the sections and freeze-fracture replicas. Biol. Cell. **61**: 101-108, 1987.
- SOARES, M. J. & DE SOUZA, W. Freeze-fracture study of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis*. J. Protozool. **35**: 370-374, 1988.
- SOARES, M.J., MOTTA, M.C.M, DE SOUZA, W., Bacterium-like endosymbiont and virus-like particles in the trypanosomatid *Crithidia desouzai*. Microbios Lett **41**: 137-144, 1989.
- TOKUDA, H. & MATSUYAMA, S. Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. Biochim. Biophys. Acta **1694**: 1-9, 2004.
- VALENTIN-HANSEN, P., JOHANSEN, J. & RASMUSSEN, A. A. Small RNAs controlling outer membrane porins. Curr Opin in Micobiol. **10**: 125-155, 2007.
- VARMA, A., DE PEDRO, M. A & YOUNG, K. D. FtsZ directs a second mode of peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. J Bacteriol. **189**: 5692-5704, 2007.
- VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Int. J. Parasitol. **24**:1317-1331, 1994.
- VOGT, J. & SCHULZ, G. E. The structure of the outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence. Structure. **15**:1301-1309, 1999.

- VOLLMER, W., VON RECHENBERG, M. & HÖLTJE, J. V. Demonstration of molecular interactions between the murein polymerase *PBP1B*, the lytic transglycosylase MltA, and the scaffolding protein MipA of *Escherichia coli*. J Biol Chem. **274**: 6726-6734. 1999.
- WALLACE, F. G. The trypanosomatids parasites of insects and arachnids. Exp. Parasitol. **18**:124-193, 1966.
- WARREN, L. G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Protozool. **5**: 529-539, 1960.
- WEISS, E. & WILSON, N. N. Role of exogenous adenosine triphosphate in catabolic and synthetic activities of *Chlamydia psittaci*. J Bacteriol **2**: 719-724. 1969.
- WEISS, M. S., ABELE, U., WECKESSER, J., WELTE, W. SCHILTZ, E. & SCHULZ, G. E.. Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin. Science. **254**: 1627–1630, 1991.
- WEISS, R. L. & FRASER, D. Surface structure of intact cells and spheroplasts of *pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. **2**: 963-8, 1973.
- WERNEGREN, J. J. For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism. Curr Opin Genet Dev. **15**:572-83, 2005.
- WHO. In: Thirteenth Programme Report, UNDP/World Bank/World Health Organization Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva: World Health Organization, 1997.
- WINLKER, H. H. Rickettsial permeability. An ADP-ATP transport system. J Biol Chem. **2**: 389-396, 1976.
- WOESE, C. R.; KANDLER, O. & WHEILIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archea, Bacteria and Eukarya. Proc. Natl. Sci. **87**: 4576-4579, 1991.

- YIM, L., GONÇALVES, R., MOTTA, M. C. M., FOTI, L., ARAÚJO, P., PROBST, C. M., SUNAGA, D., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M. A., FRAGOSO, S. P. Cell division in the endosymbiotic bacterium of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. Annals of XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. **1**: 50, 2005.
- ZACHARIAE, U., KLÜHSPIES T., DE S., ENGELHARDT, H. & ZETH, K. High resolution crystal structures and molecular dynamics studies reveal substrate binding in the porin Omp32. J. Biol. Chem. **281**: 7413–7420, 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)