

Análise de interações entre as PABPs e parceiros

**ANÁLISE DE INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE TRÊS HOMÓLOGOS DA
PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A CAUDA POLI-A (PABP) COM PROTEÍNAS COM
DOMÍNIO RRM DE LIGAÇÃO AO RNA DE *LEISHMANIA SP.***

**LUCAS EDUARDO BEZERRA DE LIMA*, ITÁLO BARBOSA ALVES DA SILVA*,
TAMARA DE CARLI DA COSTA LIMA***

***Centro Universitário Tabosa de Almeida, Avenida Portugal, 584, Universitário,
55016-901 Caruaru, PE, Brasil**

e-mail para correspondência: tamaralima@asces.edu.br

RESUMO:

Os tripanossomatídeos possuem uma combinação não usual de mecanismos moleculares, e seus processos de regulação de expressão gênica ocorreram a nível pós-transcricional. Acredita-se que essa regulação envolva tanto o controle da estabilidade dos mRNAs, como sua tradução em proteínas, eventos em que atua a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP – Poly-A Binding Protein), uma das principais proteínas de ligação a RNAs em eucariotos. Um grande número destas proteínas está presente nos tripanosomatídeos, se caracterizando por possuírem domínios típicos de ligação a RNA, como o domínio RRM como as Linj.04.1190, Linj.09.1180 e Linj.35.2240. Este trabalho se propôs a contribuir na caracterização funcional das PABPS a partir da análise da interação entre os homólogos destas e as citadas acima. Para isto, os genes codificantes das Linj.04.1190, Linj.09.1180 e Linj.35.2240 foram amplificados e clonados em vetor de expressão de *Leishmania*. Em seguida foram realizados ensaios de interação do tipo pull-down que mostrou a ligação dos três homólogos de PABP apenas com a Linj.35.2240.

INTRODUÇÃO

Os principais representantes da família Trypanosomatidae são os microorganismos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, parasitas flagelados responsáveis por enfermidades de impacto mundial, como as várias formas de leishmaniose, a doença de chagas e a doença do sono. A leishmaniose constitui um elevado problema de saúde pública sendo endêmica em 99 países, onde afeta cerca de 1,5 milhões de pessoas atualmente, com cerca de 500 mil novos casos por ano. (WHO, 2016). Esta doença é transmitida aos mamíferos pela picada do inseto hematófago e, por estar presente em dois hospedeiros, possui um complexo ciclo de vida envolvendo várias formas de desenvolvimento. Este ciclo de vida exige respostas rápidas dos seus mecanismos de regulação da expressão gênica para que o patógeno possa se adaptar eficientemente a mudanças de condições ambientais em diferentes hospedeiros.

Os tripanossomatídeos divergiram muito cedo da linhagem evolutiva que deu origem aos demais eucariotos e desta forma possuem uma combinação não usual de mecanismos de expressão gênica, onde a maturação do mRNA difere dos processos encontrados na maioria dos eucariotos. Entre as características diferenciadas na biologia molecular destes organismos, relevantes para esta proposta por estarem associadas diretamente ao metabolismo dos seus RNAs mensageiros, se destaca a síntese dos mRNAs de forma policistrônica em longas moléculas precursoras (Martinez-Calvilo, 2010), o seu processamento em trans

(trans-splicing) (Kramer, 2012) e a ausência de mecanismos de controle da transcrição dos mRNAs que permitam regulação da expressão gênica (Clayton and Shapira, 2007; Kramer, 2012; Clayton, 2014). A iniciação da tradução é a etapa mais complexa do processo de síntese de proteínas e o principal alvo de mecanismos de regulação, pois nesse momento ocorre o reconhecimento dos mRNAs a serem traduzidos pelos ribossomos. Este é um evento altamente controlado e regido pelos fatores de iniciação da tradução (eIFs – *eukaryotic initiation factors*), porém pouco se conhece a seu respeito nos tripanosomatídeos e quais elementos estariam sujeitos à regulação (Haile & Papadopoulou, 2007; Kramer & Carrington, 2011).

A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) é uma das principais proteínas de ligação ao mRNA nos eucariotos, cujo papel vem sendo demonstrado como crítico na iniciação da tradução e sua regulação. Esta proteína se liga a cauda poli-A presente na extremidade 3' dos mRNAs e promove a interação entre suas extremidades 3' e 5', através da ligação com fatores de tradução específicos, reforçando assim a iniciação da tradução e a estabilidade do mRNA. Nos tripanosomatídeos, dois homólogos de PABP (PABP1 e 2) foram identificados conservados nas suas diferentes espécies e um terceiro homólogo foi encontrado apenas em espécies de *Leishmania* (PABP3). Dados indicam que em *Leishmania* a PABP1 parece ter um papel mais geral na tradução, enquanto que as PABPs 2 e 3, que se ligam aos mesmos mRNAs, podem ter funções diferenciadas. Além das PABPs, outras proteínas contendo RRM's únicos de função desconhecida também

foram identificadas em experimentos preliminares se ligando diferencialmente a um ou outro homólogo de PABP de *Leishmania* (Costa Lima et al., 2010).

Pelo exposto, o estudo do processo de iniciação da síntese protéica em tripanosomatídeos constitui uma etapa essencial para se conhecer melhor os mecanismos de controle da expressão gênica em tripanossomatídeos, bem como suas semelhanças e diferenças em relação a outros eucariotos. Um grande número de antibióticos e agentes quimioterápicos agem inibindo a síntese protéica para impedir a proliferação de agentes patogênicos. A descoberta recente de que compostos que interferem com a interação entre subunidades do complexo eIF4F podem ser potenciais ferramentas terapêuticas em mamíferos sugerindo que compostos semelhantes poderiam ser utilizados contra agentes patogênicos, desde que tenhamos o conhecimento de particularidades exclusivas dos mesmos. Este trabalho visa avaliar a expressão em *L. infantum* de diferentes proteínas com domínios de ligação a RNA e investigar suas interações com os três homólogos de PABP deste organismo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo laboratorial (experimental) que foi realizado através do grupo de pesquisa em Biotecnologia (GBIOTEC) do Centro Universitário Tabosa de Almeida Asces-UNITA e dentro do convênio da mesma com o Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

Período e local de Estudo

A pesquisa foi realizada de janeiro a junho no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, dentro do convênio previamente estabelecido. (ANEXO 1).

Coleta de dados

Os dados foram coletados através de análises *in vitro* da interação proteica a entre a proteína PABP e proteínas hipotéticas de *Leishmania infantum*.

Critérios de inclusão e exclusão

Uma vez que se trata de um projeto experimental não se aplicam os critérios de inclusão e de exclusão.

Procedimentos experimentais

Escolha dos genes hipotéticos a serem utilizados no projeto

Com o intuito de identificar novos parceiros que possam dar indícios de funções diferenciadas associadas aos três homólogos de PABP de *Leishmania*, foram realizadas imunoprecipitações em *L. infantum* utilizando as três PABPs fusionadas a HA (dados não mostrados), as quais foram enviadas para a análise em espectrometro de massas. Foram observadas que algumas proteínas se ligam preferencialmente na PABP1 enquanto outras tem preferência de ligação com as PABP2 e 3. Destas proteínas com diferentes ligações foram escolhidas através de análise de sequência, as que possuem o domínio RRM de ligação. As mesmas já foram clonadas em trabalhos anteriores e esses clones foram utilizados neste

estudo visando observar a capacidade de ligação das mesmas com os três homólogos de PABP.

Amplificação e purificação dos fragmentos gênicos de interesse

As sequências codificantes dos genes hipotéticos foram escolhidos e obtidas por PCR, utilizando oligonucleotídeos que foram desenhados a partir de sequências identificadas no genoma de *L. infantum* (www.genedb.org). Os fragmentos gerados obtidos eram flanqueados pelos sítios de restrição BamHI/HindIII. Para a amplificação foi utilizada 1 unidade a enzima Pfx DNA Polymerase (2,5 U/μL, Invitrogen), seu tampão específico, MgSO₂ para uma concentração final de 1mM, 10mM de dNTPS e uma solução Enhancer, de acordo com as recomendações do fabricante. A PCR foi conduzida para o termociclador para a amplificação do material genético requerido. As condições da reação foram: de 94°C por 3 minutos, para desnaturação do DNA, 60-50°C por 1 minuto para anelamento dos primers (a cada ciclo era diminuída um grau na temperatura por dez ciclos e utilizada 50°C por 1 minuto nos demais 20 ciclos) e 70°C por 1 minuto, para a extensão do fragmento com um total de 30 ciclos.

Após amplificação os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com Syber® Safe e utilizado um aparelho de emissor de luz ultravioleta de ondas longas para visualizar as bandas. Em seguida os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados utilizando o *GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com instruções do fabricante.

Clonagem em plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa

Para a etapa de clonagem, os fragmentos gênicos gerados e o plasmídeo foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III durante 6 horas e em seguida cada fragmento obtido individualmente e o plasmídeo foram purificados e posteriormente ligados pela enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs®) de acordo com o fabricante, a 4°C por 16 horas.

As construções foram utilizadas para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* cepa DH10B através de choque térmico. Para isso, a um tubo contendo 50 µl de células quimiocompetentes foi acrescido de 500 ng do DNA a ser transformado, imerso no gelo por 30 minutos e logo após transferido para um banho-maria à 37°C, por 5 minutos. Em seguida, essas células foram plaqueadas em meio LB (Lauria Bertani) sólido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL. Logo após as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas. As colônias obtidas na placa foram isoladas e inoculadas em tubos contendo 2 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37°C, por aproximadamente 18 horas. Depois do crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos para a obtenção de um sedimento através de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos.

A partir desse sedimento foi realizado o protocolo de extração de DNA plasmidial em pequena escala (minipreparações), segundo Sambrook e Russel (2001). As minipreparações foram verificadas em gel de agarose 1% e as clonagens foram confirmadas por digestão com a enzima de restrição Eco RI (*New England Biolabs*) a 37°C por 2 horas em banho-maria. Os clones que liberarem o inserto no tamanho esperado foram então encaminhados para o sequenciamento.

Transcrição e Tradução in vitro

Para a transcrição in vitro foram utilizadas as construções dos genes codificando Linj.04.1190, Linj.09.1180 e Linj.35.2240, clonados no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa. Para a reação foram utilizados 3 ug de DNA linearizado na região 3' com a enzima HindIII, posicionado imediatamente após o fim do gene, e a enzima T7 RNA polimerase (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de transcrição foram realizadas em um volume final de 50 uL na presença de tampão de transcrição (40 mM Tris pH 8,0, 15 mM MgCl₂), rNTPs (4 mM de ATP, CTP e UTP, cada; 0,4 mM de GTP; todos da GE Healthcare), 0,5 mM de m⁷-GTP (New England Biolabs), 10 mM DTT, 30 U de inibidor de RNase (Promega), 10 U de T7 RNA polimerase (Pharmacia) e água deionizada, tratada com DEPC. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C e após os 30 minutos iniciais e adicionada de GTP para uma concentração final de 1 mM. Após mais 30 minutos de reação foi adicionado 2,5U de T7 RNA polimerase. Ao término das reações de transcrição, 1 uL de cada transcrito sintetizado foi analisado em gel de agarose 1% corado com Syber® Safe. Os mRNAs sintéticos obtidos foi precipitados com 0,3 M NaCl e 2,5 volumes de etanol 100 % e o sedimento ressuspenso em água deionizada tratada com DEPC.

Para a tradução in vitro, alíquotas de 0,1, 0,2 e 1 uL dos RNAs purificados foram traduzidos em lisado de reticulócito de coelho (RRL) suplementado com metionina marcada radioativamente com ³⁵S, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). As reações de tradução foram realizadas na temperatura de 30°C, durante 90 minutos. Após a tradução, alíquotas de 5 uL de cada amostra foram acrescidas de tampão de amostra para gel SDS-PAGE, e submetidas à migração por eletroforese. Após a migração, o gel foi corado com azul de

Coomassie R-250 (Sigma) e submetido a secagem em papel de filtro a 70°C, durante uma hora, sob vácuo.

Para visualização das proteínas recombinantes marcadas com ³⁵S, o gel foi exposto a um filme de autorradiografia Hiperfilme MP Amersham (GE Healthcare®) e revelada com dektol 1:1 (Kodak®).

Ensaio de interação proteína-proteína (pull-down)

Para os ensaios de interação proteína-proteína, a resina Glutathiona- Sefarose 4B (GE Biosciences®) foi previamente equilibrada com o tampão de ligação BB3 (100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Hepes pH 7.2, 0,2% NP-40, 5% glicerol). Em seguida a resina foi bloqueada utilizando o tampão BB3 acrescido de 10 µg/mL de BSA para evitar ligações inespecíficas. Para cada ensaio, aproximadamente 10 µL de cada resina bloqueada foi incubada com 2 µg de proteína recombinante em um volume final de 200 µL (em tampão BB3), durante 1 hora sob agitação, a 4°C. As resinas foram lavadas duas vezes com tampão BB3 e incubadas com 5 µL de proteínas marcadas radiotivamente (no volume final de 200 µL de tampão BB3), durante 2 horas sob agitação a 4°C. Após três lavagens com 500 µL de tampão BB3, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 40 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e 10 µL de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel 15%. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250, para visualização das proteínas recombinantes, e submetidos à autorradiografia para visualização das proteínas radioativas marcadas com ³⁵S (DHALIA et al., 2005), verificando a associação ou não das proteínas avaliadas.

RESULTADOS

A proposta desse estudo visou dar continuidade a caracterização de homólogos de PABP assim como expandir os estudos referentes a proteínas nunca antes estudadas também classificadas na família de proteínas com domínio RRM. Em estudos anteriores feitos por da Costa Lima (da COSTA LIMA, 2012), imunoprecipitações seguidas de análise em espectrometria de massa, realizadas na Universidade de Laval (Canadá) identificaram novas interações que parecem indicar possíveis mecanismos de ação inéditos, ao menos para as PABPs 2 e 3. Inúmeras proteínas foram identificadas diferencialmente ligadas ou a PABP1 ou as PABPs 2 e 3. Dentre elas foram identificadas várias proteínas hipotéticas com domínios conhecidos de ligação a RNA. O quadro abaixo mostra a dinâmica de ligação entre as proteínas hipotéticas encontradas e as respectivas PABPs de *Leishmania* as quais elas poderiam se ligar.

Quadro 1: Análises de parceiros funcionais das PABPs

PABP1	Linj.04.1190, Linj.17.0610
PABP2	Linj.09.1180, Linj.32.0790 e Linj.35.2240
PABP3	Linj.35.2240

Fonte: O autor

Amplificação dos genes codificantes de proteínas de ligação a RNA

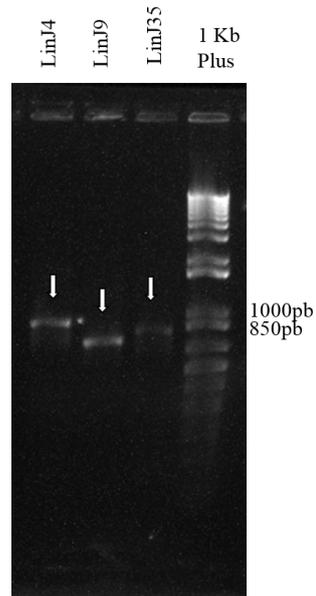
Os genes que codificam proteínas hipotéticas de ligação a RNA selecionadas para este estudo foram inicialmente amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *L. infantum*, sendo que todos os fragmentos foram flanqueados pelos sítios das enzimas de restrição HindIII e BamHI. A amplificação de cada gene produziu seus respectivos fragmentos em tamanho esperado (Linj.04.1190 - 935 pb; Linj.09.1180 - 728 pb; Linj.35.2240 – 824 pb - Quadro 2), como mostrado na figura 1. Em seguida foi realizada a purificação dos fragmentos, com o intuito de dar confiabilidade, garantindo que apenas os fragmentos desejados fossem adicionados ao vetor.

Quadro 2: identificação dos genes com os seus tamanhos preditos

Identificação do gene	Tamanho do gene pb.
Linj.04.1190	935
Linj.09.1180	728
Linj.35.2240	824

Fonte: O autor

Figura 1: Amplificação dos genes hipotéticos.



Fonte: O autor

Nota: Gel representativo de agarose 1% mostra os fragmentos amplificados nos seus tamanhos preditos (indicados por seta).

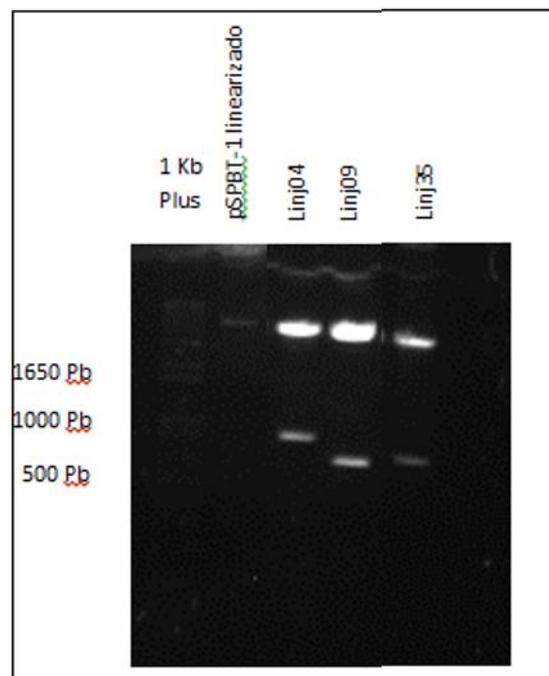
Clonagem no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa

Após a amplificação e purificação dos genes de interesse os mesmos foram clonados no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa, como descrito na metodologia. Este plasmídeo foi escolhido pois permitia realizar a superexpressão das proteínas de interesse em *L. infantum*.

O referido vetor permite a integração de genes heterólogos dentro do gene BT1 de *L. infantum*, conferindo resistência à neomicina e expressão constitutiva das proteínas de interesses. Com isso, as células de *L. infantum* transfectadas expressam tanto as proteínas endógenas quanto as proteínas contendo as seqüências marcadoras possibilitando a análise dos efeitos desta superexpressão.

A clonagem dos genes de interesse entre os sítios BamHI/HindIII do vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA permitiu então a obtenção das seguintes construções plasmidiais a partir do pSP72 (promega); Linj.04.1190/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, Linj.09.1180/pSP-BT1-Y-Neo-alfa, e Linj.35.2240/pSP-BT1-Y-Neo-alfa. Estas foram confirmadas por digestão utilizando as enzimas BamHI/HindIII, liberando assim os fragmentos esperados e observados na (Figura 2). As amostras foram quantificadas e serão enviadas para o sequenciamento de DNA para confirmar a identidade e qualidade das sequencias.

Figura 2: genes com domínio RRM inseridos no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA – confirmação de clonagem.



Fonte: O autor

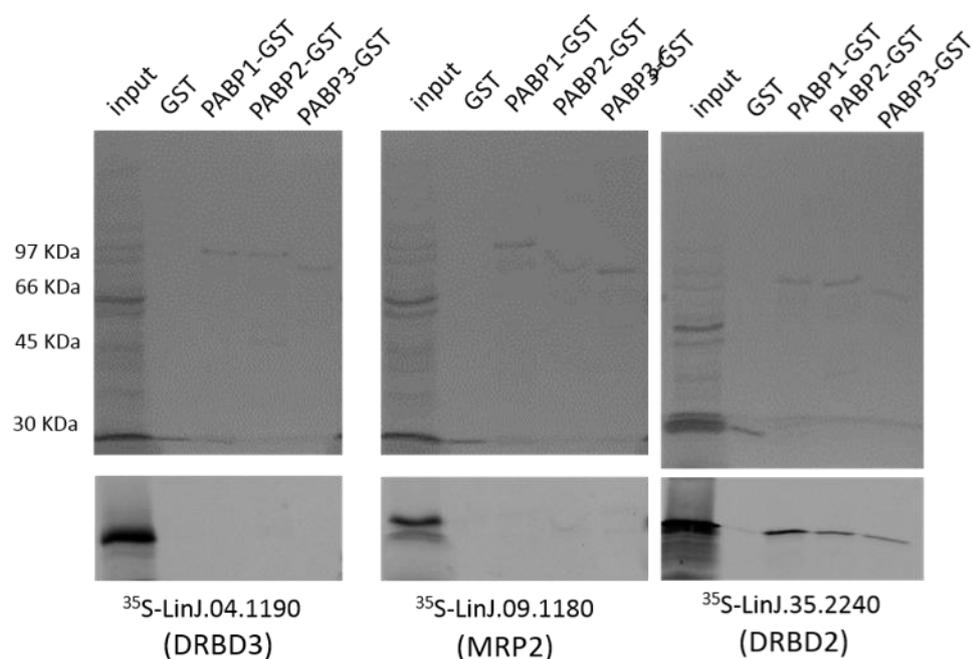
Nota: Gel de agarose mostrando construções plasmidiais em vetor de expressão após a digestão por enzimas BamHI/HindIII.

Após a confirmação de que os insertos foram adequadamente adicionados ao vetor de expressão, os mesmos foram utilizados para obter as linhagens transfectantes.

Análise da interação entre as Linj.04.1190, Linj.09.1180 e Linj.35.2240 e as PABPs

Com o intuito de determinar novos parceiros funcionais das PABPs e confirmar os dados obtidos previamente com a espectrometria de massas foram realizados ensaios de ligação do tipo pull-down entre as PABPs1-3 recombinantes fusionadas a GST (previamente obtidas em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa) e os as ³⁵S-Linj.04.1190, ³⁵S-Linj.09.1180 e ³⁵S-Linj.35.2240 radioativas. Foi observado que todas as PABPs interagem apenas com a Linj.35.2240 (Figura3).

Figura 3: Pull-down entre as PABP1-3 e as ³⁵S-Linj.04.1190, ³⁵S-Linj.09.1180 e ³⁵S-Linj.35.2240 radioativas



Fonte: O autor

Nota: Autorradiografias dos ensaios de Pull-down entre as PABP1- 3 fusionadas a GST com as Linj.04.1190, Linj.09.1180 e Linj.35.2240 marcada [³⁵ S]. As três PABPs interagiram com a Linj.35.2240.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLAYTON CE, SHAPIRA M 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* 15: 93-101.

CLAYTON CE 2014. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 195: 96-106.

COSTA LIMA TDC, et al. 2010. Functional Characterization of Three LeishmaniaPoly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. *Eukaryotic Cell.* 9:1484 – 1494

HAILE S, PAPADOPOULOU B 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:569-577.

KRAMER S, CARRINGTON M 2011. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *TRENDS in Parasitology*, 27:23-30.

KRAMER S 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 181:61-72,

Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martinez LE, Manning-Cela RG, and Figueroa-Ângulo EE 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 525241.

Referências eletrônicas:

WHO –World Health Organization 2016. Leishmaniasis. Disponível em:<
www.who.int/td>. Acesso em: 26 de Julho de 2016