

**ROSANA ELISA GONÇALVES GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MAQUINARIA DE DIVISÃO DO  
ENDOSIMBIONTE DO PROTOZOÁRIO TRIPANOSOMATÍDEO *Crithidia deanei***

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo  
Programa de Pós-graduação em Biologia  
Celular e Molecular, do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná**

**Orientador: Stenio Perdigão Fragoso**

**CURITIBA**

**2008**

**ROSANA ELISA GONÇALVES GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS DA MAQUINARIA DE DIVISÃO DO  
ENDOSIMBIONTE DO PROTOZOÁRIO TRIPANOSOMATÍDEO *Crithidia deanei***

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre, pelo  
Programa de Pós-graduação em Biologia  
Celular e Molecular, do Setor de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal do  
Paraná**

**Orientador: Stenio Perdigão Fragoso**

**CURITIBA**

**2008**

*Dedico este trabalho a meus pais,  
Pela dedicação infinita...  
Pelas viagens não feitas...  
Por carros não comprados...  
Por confortos e vontades deixados de lado...  
Tenham a certeza de apesar dos esforços pra que eu tivesse uma boa educação,  
A melhor educação que tive foi ter vocês como meus educadores!!! Pais heróis!!!  
Dedico também ao meu amado irmão,  
É um grande orgulho tê-lo como exemplo... Irmão mais velho!!!  
Serei eternamente grata por vocês terem feito a minha vida mais doce...  
Mais fácil...  
Mais divertida...  
Mais interessante...  
Mais humana...  
E assim nasceu minha consciência!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Stênio Perdigão Fragoso pela orientação, paciência e confiança. Pelo exemplo de pesquisador, mas mais que isso pelo exemplo de simplicidade, bom caráter, amizade e respeito. Pelo incentivo de trilhar novos caminhos em terras distantes. Fica aqui minha eterna admiração e meu mais sincero agradecimento.

À Dra. Lucia Yim pelos preciosos ensinamentos em biologia molecular e pela co-orientação deste trabalho. Exemplo de seriedade e vivacidade em tudo que faz.

Ao Dr. Maurílio Soares pela grande ajuda nas microscopias e formatação das figuras deste trabalho. Pelo jeitinho mineirinho de cativar as pessoas, pelas conversas e pelas jujubas.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Marco A. Kriger e Dr. Cláudia N. D. dos Santos pelo exemplo de profissionalismo.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Ao Dr. Christian Probst pelas contribuições nesse trabalho.

Aos amigos de laboratório Adriana Umaki, Alda Ferreira, Daniela Fiori, Flávia Oliveira, Janaína, Leonardo Foti, Márcia Shimada e Patrícia Mörking pela amizade, pelos risos, por aquela mãozinha, pelas conversas sérias ou não. Tudo isso fez parte da minha mais nova formação. Vocês são muito especiais!

Aos ex-companheiros de laboratório, mas ainda amigos Gisele Picchi e Édio Lourenço pela amizade, exemplo e motivação.

À Edilaine e ao Luiz pelo apoio administrativo, competência e muita paciência.

Aos amigos Nilson José Fidêncio, Paulo Arauco, Janaína e Vanessa pela amizade e apoio técnico.

A todos os amigos do Instituto de Biologia Molecular do Paraná pelo apoio e amizade.

Às minhas eternas amigas Francielle Kimura, Juliana Driessen, Lila Montalvão, Octaviana Fialho e Roana Yumi Arai por tudo que vivemos juntas, pela amizade e pelo respeito mútuo. Que o G6 sempre exista!

À minha irmã de coração Fabiana Ribeiro pela agradável companhia nesses últimos anos. Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos sambas de terças e quintas, às salsas de sexta e aos forrós de quartas e sábados pelos momentos de descontração e por recarregarem minha energia, por mais incrível que isso possa parecer.

Aos meus pais por me passarem a certeza de que sempre poderei contar com eles.

*Tem horas que a gente se pergunta “Por que é que não se junta tudo em uma coisa só?”...*

*O Teatro Mágico*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 JUSTIFICATIVA.....	4
1.2 DIVISÃO CELULAR EM BACTÉRIAS.....	6
1.2.1 Sistema Min.....	11
1.3 DIVISÃO CELULAR EM ORGANELAS DE ORIGEM ENDOSIMBIÓTICA.....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2 METAS.....	16
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	17
3.1 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS.....	17
3.1.1 Cultivo dos tripanosomatídeos.....	17
3.1.2 Cultivo de bactérias.....	17
3.2 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO DO ENDOSSIMBIONTE DE <i>Crithidia deanei</i> .....	18
3.2.1 Fracionamento celular: Isolamento do Endosimbionte.....	18
3.2.2 Purificação do DNA endosimbionte.....	19
3.3 EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO DE <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.4 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E MANIPULAÇÃO DO DNA.....	19
3.4.1 Amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase) de genes para clonagem.....	22
3.4.2 Clonagens.....	23
3.4.2.1 Clonagem do gene <i>minC</i> do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH.....	23
3.4.2.2 Clonagem dos genes <i>minCD</i> do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH.....	24
3.4.2.3 Clonagem do gene <i>minE</i> do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH.....	25
3.4.2.4 Clonagem dos genes <i>minCDE</i> do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH.....	25
3.4.2.5 Clonagem dos genes <i>minCDE</i> de <i>Escherichia coli</i> no vetor de expressão pJF119EH.....	25
3.4.2.6 Clonagem dos genes <i>minCDE</i> do endosimbionte no vetor de expressão pBAD22.....	25
3.4.2.7 Clonagem dos genes <i>minCDE</i> de <i>Escherichia coli</i> no vetor de expressão pBAD22.....	26
3.4.2.8 Clonagem do gene <i>zipA</i> do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH.....	26
3.4.2.9 Clonagem do gene <i>zipA</i> do endosimbionte no vetor de expressão pGFPXa.....	26
3.4.2.10 Clonagem do gene <i>minC</i> do endosimbionte no vetor de expressão pGEX-4T.....	27
3.4.2.11 Clonagem do gene <i>minD</i> do endosimbionte no vetor de expressão	

pGEX-4T.....	28
3.4.2.12 Clonagem do gene <i>minE</i> do endosimbionte no vetor de expressão pGEX-4T.....	28
3.4.2.13 Clonagem do gene <i>ftsK</i> do endosimbionte no vetor de expressão pGEX-4T.....	28
3.4.2.14 Clonagem do gene <i>minC</i> do endosimbionte no vetor de expressão pQE30.....	28
3.4.2.15 Clonagem do gene <i>minD</i> do endosimbionte no vetor de expressão pQE30.....	29
3.4.2.16 Clonagem do gene <i>minE</i> do endosimbionte no vetor de expressão pQE30.....	29
3.4.2.17 Clonagem do gene <i>zipA</i> do endosimbionte no vetor de expressão pQE30.....	30
3.4.2.18 Clonagem do gene <i>ftsZ</i> do endosimbionte no vetor de expressão pET47b.....	30
3.4.2.19 Clonagem do gene da dinamina de <i>Trypanosoma cruzi</i> ( <i>Tcdnm</i> ) no vetor de expressão de tripanosomatídeos pTEXGFP2.....	31
3.4.3 Ligação dos genes nos vetores de expressão.....	31
3.4.4 Preparação de células cálcio-competentes.....	32
3.4.5 Transformação e seleção dos clones recombinantes.....	32
3.4.6 Seleção dos clones recombinantes através da técnica da palitagem (toothpick).....	32
3.4.7 Preparação dos plasmídeos contendo os produtos de PCR (miniprep).....	33
3.5 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	33
3.6 TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	34
3.7 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO.....	34
3.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FtsZe UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA.....	35
3.9 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE (FUSÃO COM GST) UTILIZANDO RESINA GLUTATIONA-SEPHAROSE.....	35
3.9.1 Purificação da proteína recombinante GST-FtsKe.....	35
3.9.2 Purificação das proteínas recombinantes GST-MinC, GST-MinD, GST-MinDK11A e GST-MinDK16A.....	36
3.10 PURIFICAÇÃO DE FtsZ DE <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.11 OBTENÇÃO DE ANTÍSSORO POLICLONAL CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	37
3.12 ENSAIO DE POLIMERIZAÇÃO DE FtsZe.....	38
3.12.1 Método 1.....	38
3.12.2 Método 2.....	38
3.13 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS MinC E MinD EM EXTRATOS PROTÉICOS DE ENDOSIMBIONTE USANDO WESTERN BLOT.....	38
3.14 PROCEDIMENTO DE TRANSFEÇÃO.....	39
3.15 ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO.....	40
3.16 ENSAIO DE ATIVIDADE ATPase DE MinD e FtsK DO ENDOSIMBIONTE.....	41
3.17 IMUNOLocalização por Microscopia Óptica.....	41
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DO GENE <i>zipAe</i> .....	43



4.1.1 Análise de superexpressão de <i>zipAe</i> em <i>Escherichia coli</i> .....	47
4.2 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DO GENE <i>ftsKe</i> .....	50
4.2.1 Ensaio atividade ATPase de FtsKe.....	55
4.3 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DO GENE <i>ftsKe</i> .....	56
4.3.1 Ensaio de Polimerização de FtsZe.....	60
4.3.2 Purificação de FtsZ de <i>Escherichia coli</i> .....	63
4.4 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES <i>minCDE</i> .....	64
4.4.1 Fenótipo da super-expressão dos genes do sistema Min do endossimbionte em <i>E. coli</i> .....	74
4.4.2 Purificação de MinDe solúvel pra teste de atividade ATPásica.....	80
4.4.2.1 Ensaio de atividade ATPase de MinDe, MinDeK11A e MinDeK16A..	82
4.4.3 Ensaios de complementação de <i>minCDE</i> em <i>E. coli</i> .....	84
4.4.4 Ensaios de interação.....	87
4.4.5 Purificação de MinCe, MinDe, MinEe para produção de anti-soro específico.....	92
4.5 LOCALIZAÇÃO DA DINAMINA COM FUSÃO À GFP NO TRIPANOSOMATÍDEO <i>Blastocrithidia culicis</i> .....	99
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	TRIPANOSOMATÍDEO <i>Crithidia desouzai</i> CONTENDO UM ENDOSIMBIONTE OBSERVADO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	2
FIGURA 2 -	ANEL SEPTAL EM <i>Escherichia coli</i> .....	8
FIGURA 3 -	DIVISÃO DOS CROMOSSOMOS EM <i>Escherichia coli</i> .....	9
FIGURA 4 -	INTERDEPENDÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO DIVISOMA EM <i>Escherichia coli</i> .....	10
FIGURA 5 -	AGRUPAMENTO GÊNICO EM DISTINTAS ESPÉCIES BACTERIANAS.....	11
FIGURA 6 -	MODELO DE OSCILAÇÃO DAS PROTEÍNAS Min.....	13
FIGURA 7 -	DIVISÃO CELULAR EM PLASTÍDEO – DINAMINA COMO UM EFETOR DA DIVISÃO.....	14
FIGURA 8 -	ESQUEMA DO PLASMÍDEO pJF119EH.....	23
FIGURA 9 -	ESQUEMA DO AGRUPAMENTO GÊNICO <i>minCDE</i> DO ENDOSIMBIONTE MOSTRANDO A POSIÇÃO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS.....	24
FIGURA 10 -	ESQUEMA DO PLASMÍDEO pGFPXA.....	27
FIGURA 11 -	ESQUEMA DO PLASMÍDEO pGEX-4T.....	27
FIGURA 12 -	ESQUEMA DO PLASMÍDEO pQE30.....	29
FIGURA 13 -	ESQUEMA DO PLASMÍDEO pET-47b.....	31
FIGURA 14 -	ALINHAMENTO DA PROTEÍNA ZIPA DO ENDOSIMBIONTE COM A DO CORRESPONDENTE HOMÓLOGO DE <i>Bordetella papapertussis</i> .....	44
FIGURA 15 -	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO GENE <i>zipA</i> DO ENDOSIMBIONTE DE <i>Crithidia deanei</i> E A CORRESPONDENTE SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA PROTEÍNA.....	45
FIGURA 16 -	ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE <i>zipA</i> NO ENDOSIMBIONTE.....	46
FIGURA 17 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>zipA</i> DO ENDOSIMBIONTE.....	46
FIGURA 18 -	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GFP-ZipAe EM <i>E. COLI</i> POR SDS-PAGE.....	48
FIGURA 19 -	PADRÃO MIGRATÓRIO DE ZipA DE <i>Escherichia coli</i> EM GEL SDS-PAGE.....	49
FIGURA 20 -	SUPEREXPRESSÃO DE GFP-ZipAe EM <i>E. coli</i> (CEPA TOP10F') – ANÁLISE FENOTÍPICA.....	49
FIGURA 21 -	SUPEREXPRESSÃO DE GFP-ZipAe EM <i>E. coli</i> (CEPA TOP10F') – ANÁLISE FENOTÍPICA USANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE E DE FLUORESCÊNCIA.....	50
FIGURA 22 -	SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO GENE <i>ftsK</i> DO ENDOSIMBIONTE DE <i>Crithidia deanei</i> E A CORRESPONDENTE SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA PROTEÍNA.....	52
FIGURA 23 -	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA FtsK DO ENDOSIMBIONTE COM A DO	

	CORRESPONDENTE HOMÓLOGO DE <i>Bordetella</i> <i>sp.</i> .....	53
FIGURA 24 -	ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE <i>ftsk</i> NO ENDOSIMBIONTE.....	54
FIGURA 25 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>ftsK</i> DO ENDOSIMBIONTE.....	54
FIGURA 26 -	PURIFICAÇÃO DE GST-FtsKe MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE POR GLUTATIONA.....	55
FIGURA 27 -	ATIVIDADE ATPÁSICA DE FtsKe.....	56
FIGURA 28 -	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE <i>ftsZ</i> DO ENDOSIMBIONTE DE <i>C. deanei</i> .....	57
FIGURA 29 -	ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS FtsZ DE <i>B.</i> <i>bronchiseptica</i> , DO ENDOSIMBIONTE DE <i>C. deanei</i> E DE <i>E.</i> <i>coli</i> .....	58
FIGURA 30 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>ftsZ</i> DO ENDOSIMBIONTE.....	59
FIGURA 31 -	SOBREEXPRESSIONE DE FtsZe EM <i>E. coli</i> (CEPA BL21) – ANÁLISE FENOTÍPICA.....	60
FIGURA 32 -	ANÁLISE DE POLIMERIZAÇÃO DE FtsZe POR WESTERN BLOT.....	61
FIGURA 33 -	PURIFICAÇÃO DE FtsZe POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL- NTA.....	62
FIGURA 34 -	PURIFICAÇÃO DE FtsZ DE <i>Escherichia coli</i> POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA.....	63
FIGURA 35 -	WESTERN BLOT UTILIZANDO SORO ANTI-FtsZ DE <i>Escherichia coli</i> .....	64
FIGURA 36 -	ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS GENES <i>minCDE</i> NO ENDOSIMBIONTE.....	65
FIGURA 37 -	SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES <i>minCDE</i> DO ENDOSIMBIONTE DE <i>C. deanei</i> E A CORRESPONDENTE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA.....	66
FIGURA 38 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>minC</i> DO ENDOSIMBIONTE.....	67
FIGURA 39 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>minD</i> DO ENDOSIMBIONTE.....	68
FIGURA 40 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>minE</i> DO ENDOSIMBIONTE.....	69
FIGURA 41 -	ALINHAMENTO DA PROTEÍNA MinC DO ENDOSIMBIONTE DEDUZIDO A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS, COM OS CORRESPONDENTES HOMÓLOGOS DE <i>Bordetella spp</i> E <i>Escherichia coli</i> .....	70
FIGURA 42 -	REPRESENTAÇÃO DO DOMÍNIO C-TERMINAL DA PROTEÍNA MinC RICO EM RESÍDUOS DE GLICINA.....	71
FIGURA 43 -	ALINHAMENTO DA PROTEÍNA MinD DO ENDOSIMBIONTE DEDUZIDO A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS, COM OS CORRESPONDENTES ORTÓLOGOS DE <i>Bordetella spp</i> E <i>Escherichia coli</i> .....	72
FIGURA 44 -	ALINHAMENTO DA PROTEÍNA MinE DO ENDOSIMBIONTE DEDUZIDO A PARTIR DAS SEQÜÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS, COM OS CORRESPONDENTES ORTÓLOGOS DE <i>Bordetella spp</i> E <i>Escherichia coli</i> .....	74
FIGURA 45 -	EFEITO DA SUPEREXPRESSIONE DE MinCe E MinCDe EM	

	<i>Escherichia coli</i> .....	76
FIGURA 46 -	EFEITO DA SUPEREXPRESSION DE MinCe EM <i>Escherichia coli</i> .....	77
FIGURA 47 -	EFEITO DA SUPEREXPRESSION DE MinDe EM <i>Escherichia coli</i> .....	77
FIGURA 48 -	EFEITO DA SUPEREXPRESSION DE MinEe EM <i>Escherichia coli</i> UTILIZANDO O PLASMÍDEO pJFminEe.....	79
FIGURA 49 -	EFEITO DA SUPEREXPRESSION DE MinEe EM <i>Escherichia coli</i> UTILIZANDO O PLASMÍDEO pQEminEe.....	80
FIGURA 50 -	PURIFICAÇÃO DE GST-MinDe, GST-MinDeK11A E GST-MinDeK16A MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE.....	81
FIGURA 51 -	WESTERN BLOT USANDO O SORO ANTI-MinDe OBTIDO EM CAMUNDONGOS E REAGIDO CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA GST-MinDe E AS PROTEÍNAS MUTANTES GST-MinDeK11A e GST-MinDeK16A.....	82
FIGURA 52 -	ENSAIO DE ATIVIDADE ATPase DE MinD DO ENDOSIMBIONTE.....	83
FIGURA 53 -	EFEITO DA SUPEREXPRESSION DE GST-MinDe, GST-MinDeK11A e GST-MinDeK16A EM <i>Escherichia coli</i> .....	84
FIGURA 54 -	ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO DE PB114 COM O OPERON <i>minCDE</i> DO ENDOSIMBIONTE CLONADO NO VETOR pJF119EH.....	85
FIGURA 55 -	ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO DE PB114 COM O OPERON <i>minCDE</i> DO ENDOSIMBIONTE CLONADO NO VETOR pJF119EH.....	86
FIGURA 56 -	ENSAIO DE <i>PULL-DOWN</i> REAGIDO COM ANTI-MinCe.....	88
FIGURA 57 -	ENSAIO DE <i>PULL-DOWN</i> REAGIDO COM ANTI-MinDe.....	88
FIGURA 58 -	PURIFICAÇÃO DE MinCe UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA.....	90
FIGURA 59 -	PURIFICAÇÃO DE MinDe UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA.....	90
FIGURA 60 -	ENSAIO DE INTERAÇÃO DE MinCe COM A MAQUINARIA DE DIVISÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	91
FIGURA 61 -	ENSAIO DE INTERAÇÃO DE MinDe COM A MAQUINARIA DE DIVISÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	92
FIGURA 62 -	PURIFICAÇÃO DE GST-MinCe.....	93
FIGURA 63 -	PURIFICAÇÃO DE GST-MinDe.....	94
FIGURA 64 -	PURIFICAÇÃO DE GST-MinDe.....	94
FIGURA 65 -	WESTERN BLOT UTILIZANDO SOROS ANTI-MinCe E ANTI-MinDe.....	95
FIGURA 66 -	IMUNOLOCALIZAÇÃO DE MinCe EM <i>B. culicis</i> .....	96
FIGURA 67 -	IMUNOLOCALIZAÇÃO DE MinCe EM <i>C. deanei</i> .....	97
FIGURA 68 -	IMUNOLOCALIZAÇÃO DE MinDe EM <i>B. culicis</i> .....	98
FIGURA 69 -	AMPLIFICAÇÃO DO GENE DINAMINA DO <i>T. cruzi</i> .....	100
FIGURA 70 -	CO-LOCALIZAÇÃO DE GFP-DINAMINA NO ENDOSIMBIONTE DE <i>B. culicis</i> .....	100

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	LISTA DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> .....	17
TABELA 2 -	LISTA DE PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	20
TABELA 3 -	NÚMERO DE COLÔNIAS OBTIDAS QUANDO SE TRANSFORMAVA PB114 OU PB114 pRARE COM DIFERENTES PLASMÍDEOS.....	78

## RESUMO

Alguns protozoários monoxênicos da família Trypanosomatidae, tais como *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia deanei*, *Crithidia oncopelti*, *Crithidia desouzai* e *Herpetomonas roitmani* apresentam bactérias simbióticas em seu citoplasma. A estreita relação desenvolvida entre a bactéria simbiótica e o tripanosomatídeo hospedeiro faz deste modelo uma excelente fonte para a melhor compreensão da origem simbiótica de organelas como a mitocôndria e o cloroplasto. É interessante destacar que no caso de tripanosomatídeos existe apenas uma bactéria simbiótica por célula, fato que implica a existência de um perfeito controle temporal da divisão celular destes microrganismos. Os fatores que realizam e controlam este processo, e a maneira como eles agem, são até agora desconhecidos. Caracterizamos, portanto, algumas proteínas-chave no processo de formação e de regulação do anel de divisão Z, o qual é importante para a formação do septo na região central da célula em divisão. Entre estas proteínas estão a FtsZ, a FtsK, a ZipA e o complexo proteico MinCDE. Os genes que codificam essas proteínas foram identificados a partir do sequenciamento do genoma do endosimbionte de *C. deanei*, que está sendo realizado no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP). Todos os genes estudados foram amplificados por PCR a partir do DNA do endosimbionte purificado de *C. deanei*. A análise das sequências de aminoácidos derivadas dos genes em questão mostra que elas compartilham maior similaridade com os ortólogos de bactérias do gênero *Bordetella* (subdivisão  $\beta$  das proteobactérias). A expressão dos genes *ftsZe*, *zipAe* e *minDe* em *E. coli* induz a formação de filamentos, indicando que as proteínas recombinantes produzidas são funcionais e conseguem desestabilizar a maquinaria de divisão da *E. coli*. A expressão de todo o locus *minCDE* do endosimbionte não foi capaz de complementar cepa de *E. coli* PB114, que possui a deleção de todo o locus *minCDE* ( $\Delta$ *minCDE*). A funcionalidade das proteínas FtsKe e MinDe foi também demonstrada pela sua capacidade de hidrolisar ATP. Quanto à proteína FtsZe, esta foi capaz de se polimerizar, característica importante para a formação do anel Z. Esses dados sugerem que proteínas do divisoma do endosimbionte se mantiveram funcionais durante a evolução dessa relação simbiótica.

A análise, por microscopia de fluorescência, da expressão do gene da dinamina de *Trypanosoma cruzi*, fusionado ao gene GFP, em *C. deanei*, mostra que a proteína recombinante dinamina-GFP está associada com o endosimbionte. Esse resultado sugere o envolvimento da dinamina no processo de divisão do endosimbionte, como acontece na divisão de cloroplastos e mitocôndrias, e que este possa ser um dos mecanismos que o tripanosomatídeo hospedeiro utiliza para controlar a divisão do endosimbionte.

## ABSTRACT

Some monoxenous protozoa of the *Trypanosomatidae* family such as *Blastocrithidia culicis*, *Crithidia deanei*, *Crithidia oncopelti*, *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas roitmani* harbor endosymbiotic bacteria in their cytoplasm. The relationship between the endosymbiont and the trypanosomatid provides an interesting model to understanding the emergence of eukaryotic organelles mitochondria and chloroplasts. It is noteworthy to note that in the case of trypanosomatids there is only one symbiotic bacterium per cell, which implies the existence of a perfect control of the endosymbiont division. The factors that perform and control this process as well as their mechanisms remain unknown. In this regard, we characterized some key proteins involved in the processes of assembling and regulation of the Z ring, which are important steps in the division site formation in the mid-cell. Among these proteins, there are FtsZ, FtsK, ZipA and the complex MinCDE. The genes encoding these proteins were identified in the genome of the endosymbiont of *C. deanei* that has been sequenced in the Institute of Molecular Biology of Paraná (IBMP). All the studied genes were amplified by PCR from the genomic DNA of the endosymbiont purified from *C. deanei*. The analysis of the deduced amino acid sequences from these genes show that they share greater similarity with the orthologues from the *Bordetella* genus (subdivision of  $\beta$  Proteobacteria). We showed that the expression of the genes *ftsZe*, *zipAe* and *minDe* in *E. coli* induce filamentation, indicating that these recombinant proteins were functional and could destabilize the division machinery in *E. coli*. The functionality of the proteins FtsKe and MinDe was also showed by their ability to hydrolyse ATP. Regarding the FtsZe, we show that it was able to self-polymerize, an important feature for the Z ring assembly. Taken together, these data suggest that proteins of the endosymbiont division have maintained their functionality during the evolution of the symbiotic relationship.

Immunofluorescence microscopy analysis showed that the fusion protein GFP-dynamin from *T. cruzi* expressed in *C. deanei* was associated with the endosymbiont. This result suggests the involvement of the dynamin in the endosymbiont division process as observed for the division of mitochondria and chloroplasts. Furthermore, dynamin may be one of the mechanisms used by the trypanosomatid to control the endosymbiont division.

## 1 INTRODUÇÃO

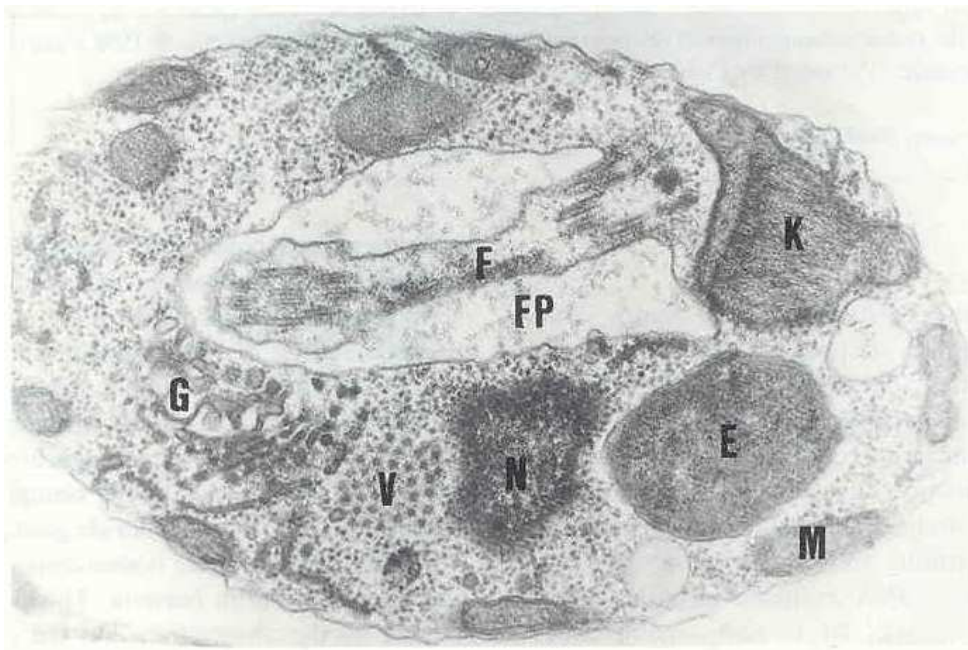
Os protozoários tripanosomatídeos (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida) vêm sendo alvo de constantes estudos em diferentes áreas da biologia celular, biologia molecular, genética e imunologia. Tamanho interesse está relacionado ao fato de diversos protozoários patogênicos participarem desta família. Dentre estes parasitas, os mais conhecidos pertencem aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Existem ainda nesta família protozoários não-patogênicos monoxênicos, ou seja, que apresentam durante todo o ciclo de vida um único hospedeiro invertebrado. Neste último caso estão presentes alguns gêneros como *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas*.

Os protozoários da família Trypanosomatidae caracterizam-se pela presença de um flagelo único associado a uma bolsa flagelar e contendo estrutura paraflagelar, uma mitocôndria única e ramificada, além de acidocalcisomos e glicosomos em número e forma variados. Aproximadamente 30% do DNA dos tripanosomatídeos se encontra em uma região específica da mitocôndria, o cinetoplasto (revisto por SHLOMAI, 1994).

Alguns protozoários monoxênicos da família Trypanosomatidae apresentam bactérias simbióticas em seu citoplasma (figura 1). Dentre estes podemos citar as espécies *Blastocrithidia culicis* (BRUESKE, 1967), *Crithidia deanei* (MUNDIM et al., 1974), *Crithidia oncopelti* (GILL & VOGEL, 1963), *Crithidia desouzai* e *Herpetomonas roitmani* (FIORINI et al., 1989). Quando observados por microscopia eletrônica de transmissão, os simbiossomas apresentam-se envoltos por duas unidades de membrana; uma mais externa, que fica em contato com o citoplasma da célula hospedeira e outra que delimita a matriz do endosimbionte. A matriz do endosimbionte por sua vez apresenta duas regiões distintas: uma mais clara que contém fibrilas de DNA e outra mais escura que é rica em ribossomos (CHANG, 1974; MOTTA et al., 2003; SOARES & DE SOUZA, 1988).



FIGURA 1 - TRIPANOSOMATÍDEO *Crithidia desouzai* CONTENDO UM ENDOSIMBIONTE OBSERVADO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.



Corte ultra-fino mostrando o aspecto geral do protozoário. (N) núcleo, (E) Endosimbionte, (K) Cinetoplasto, (M) Mitocôndria, (V) partículas semelhantes a vírus, (G) Complexo de Golgi, (F) Flagelo e (FP) Bolsa flagelar. FONTE: SOARES *et al.*, 1989

O processo simbiótico, envolvendo o endosimbionte e sua célula hospedeira, implica uma relação muito estreita, com o surgimento de alterações ultra-estruturais em ambos os seres e o estabelecimento de uma troca recíproca de produtos metabólicos. Como sugerido por Margulis (1976), nos casos mais íntimos de associação simbiótica podem ocorrer alterações morfológicas, assim como a formação de novas estruturas ou a perda parcial ou completa de outras. No caso específico da endossimbiose nos tripansomatídeos, observa-se a perda parcial da estrutura paraflagelar (GADELHA *et al.*, 2005), modificações morfológicas no citoesqueleto de microtúbulos e na rede de DNA mitocondrial do protozoário, assim como a redução da parede celular da bactéria simbiótica. Apesar de não apresentar uma parede celular típica, os endosimbiontes de tripansomatídeos são sensíveis à ação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos cujo alvo são as *Penicillin Binding Proteins* (PBPs), enzimas encarregadas de sintetizar o peptidoglicano da parede celular bacteriana (FREYMULLER & CAMARGO, 1981; MOTTA *et al.*, 1997a). Estes dados sugerem a existência de uma parede remanescente ou degenerada nestes simbiontes, desempenhando importantes papéis na divisão celular e na manutenção da forma. A

presença do endosimbionte promove ainda modificações físico-químicas no protozoário hospedeiro, alterando a composição de açúcares e a carga de superfície (DWYER & CHANG, 1976; ESTEVES et al., 1982; ODA et al., 1984). Tal como ocorre em outras associações simbióticas, existe uma intensa troca de nutrientes e outros metabólitos entre os seres envolvidos: o endosimbionte fornece aminoácidos, hemina e vitaminas ao protozoário, mas por outro lado é capaz de beneficiar-se da produção de ATP da célula hospedeira (revisto por DE SOUZA & MOTTA, 1999; PALMIÉ-PEIXOTO et al, 2006; FROSSARD et al., 2006). Cumpre ressaltar que todas as tentativas de manter o endosimbionte de tripanosomatídeos em cultivo fora da célula hospedeira foram infrutíferas, o que sugere que durante o processo de evolução conjunta o simbiote deve ter perdido funções essenciais que atualmente são fornecidas pelo hospedeiro. Cepas de protozoários livres de endosimbionte (aposimbióticas) podem ser obtidas por tratamento com cloranfenicol (CHANG, 1975), mas seu cultivo requer a adição de nutrientes, tais como hemina, e seu crescimento é muito mais lento quando comparado com cepas simbióticas.

Além de alterações morfológicas e ultra-estruturais, a endosimbiose pode também acarretar a perda de genes do endosimbionte não mais necessários no ambiente intracelular, ou a transferência de genes de um ser para o outro, sendo que em alguns casos estes se tornam uma unidade co-evolutiva bipartite (ANDERSSON & KURLAND, 1998; revisto por HOFFMEISTER & MARTIN, 2003). Os exemplos mais extremos da evolução redutiva de genomas residentes intracelularmente são aqueles das organelas celulares, como as mitocôndrias e cloroplastos das células eucarióticas. O estudo da relação simbiótica de bactérias ou algas com protozoários hospedeiros tem ajudado na compreensão da origem simbiótica destas organelas. Hoje em dia a teoria simbiótica é aceita pela maioria dos pesquisadores para explicar o aparecimento destas organelas. Parece que ao longo do processo evolutivo genes sofreram transferência da bactéria ou alga simbiótica para o núcleo da célula hospedeira, até um ponto em que a “protomitocôndria” ou o “protocloroplasto” perdeu autonomia replicativa. Em mitocôndrias, o tamanho do genoma é bastante variado nas diferentes células eucarióticas. De um modo geral estes genes estão relacionados à produção de ribossomos mitocondriais e de subunidades de proteínas que compõem a membrana interna, mais especificamente as que participam da cadeia respiratória. O fato dos genes que codificam tais proteínas não terem sido transferidos pode significar que

uma transferência errada destes genes acarretaria o não-funcionamento de proteínas essenciais à manutenção do metabolismo de fosforilação oxidativa que caracteriza a mitocôndria (GRAY et al., 1999; MARGULIS, 1976).

Em relação à origem dos endosimbiontes de *Crithidia deanei* e *Blastocrithidia culicis*, a análise do gene que codifica o RNA ribossomal 16S mostrou que esse gene é idêntico nos dois tipos de endosimbiontes e muito similar ao da bactéria *Bordetella bronchiseptica*, da subdivisão  $\beta$  das Proteobactérias (DU et al., 1994a), sendo então os endosimbiontes classificados nesta subdivisão. Os endosimbiontes destas espécies de tripanosomatídeos passaram a ser denominados respectivamente *Kinetoplastibacterium crithidii* e *Kinetoplastibacterium blastocrithidii*. Cabe ainda mencionar que estes dois tripanosomatídeos encontraram-se relacionados filogeneticamente entre si quando foram feitas análises de sequências gênicas do SSU rRNA (DU et al., 1994b) e também quando características isoenzimáticas foram analisadas (MOTTA et al., 1991).

Outros fatores comprovam a natureza bacteriana dos simbiontes de tripanosomatídeos, tais como a organização e densidade do DNA (SPENCER & CROSS, 1975) e a presença de enzimas típicas de procariontes, como as da via biossintética da lisina (GILL & VOGEL, 1962, 1963). Alguns estudos (MOTTA et al., 1991; FARIA E SILVA et al., 1991; DU et al., 1994-b) sugerem que o processo simbiótico bactéria/protozoário hospedeiro hoje conhecido em tripanosomatídeos originou-se a partir de um único evento evolutivo, envolvendo a aquisição de uma proteobactéria da divisão  $\beta$  por um protozoário ancestral dos tripanosomatídeos.

Conclui-se a partir desta introdução que tripanosomatídeos que apresentam em seu citoplasma bactérias simbióticas constituem um excelente modelo experimental, já que: são facilmente cultiváveis, não apresentam perigo de manipulação por serem não-patogênicos, podem ser utilizados em estudos comparativos a fim de esclarecer novos aspectos sobre o carácter evolutivo desta família e possibilitam um melhor entendimento da origem das organelas citoplasmáticas a partir da relação entre o simbionte e a célula hospedeira.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Embora muito se conheça sobre a organização ultra-estrutural dos endosimbiontes dos tripanosomatídeos e dos aspectos bioquímicos da relação simbiótica, muito pouco se conhece sobre seus genomas e sobre possíveis

transferências gênicas envolvendo a bactéria simbiótica e seu protozoário hospedeiro. Estas são questões que uma vez respondidas nos ajudam a compreender a origem do microrganismo endosimbionte e em que momento do processo evolutivo a endosimbiose ocorreu nesta importante família de protozoários. Além disso, a estreita relação desenvolvida entre a bactéria simbiótica e o tripanosomatídeo hospedeiro faz deste modelo uma excelente fonte para a melhor compreensão da origem simbiótica de organelas como a mitocôndria e o cloroplasto.

Os endosimbiontes de tripanosomatídeos, além de fornecer um material importante para a compreensão do aparecimento de organelas, são por si próprios um sistema extremamente interessante do ponto de vista da biologia molecular. Ao longo do processo evolutivo a bactéria endosimbiótica teve que ajustar seu metabolismo e certamente seu repertório gênico em função do novo habitat em que se encontrava, ou seja, o citoplasma do tripanosomatídeo hospedeiro. Não apenas o genoma bacteriano pode ter se modificado, como também os mecanismos de regulação gênica, incluindo aí a transferência de funções importantes, como controle da divisão celular para a célula hospedeira, já que nesse caso específico o número dessas bactérias simbióticas é limitado a uma por protozoário. Essa característica é identificada em outros sistemas, onde a aquisição de um estilo de vida com associação obrigatória ao hospedeiro geralmente leva à diminuição do tamanho da população, devido ao habitat restrito (revisto por ANDERSON & KURLAND, 1998). Essa derivação genética pode levar à fixação de mutações que inativam genes que não são mais necessários naquele novo nicho ou mesmo de genes benéficos.

É interessante notar que os dados de genômica estrutural para várias espécies de bactérias intracelulares obrigatórias sugerem uma correlação entre a patogenicidade e a redução do genoma, incluindo rápida evolução das seqüências polipeptídicas e um baixo conteúdo G+C. Um dado típico é aquele que mostra que enquanto *Escherichia coli* e espécies de *Salmonella* ou *Bacillus* codificam de 1500 a 6000 proteínas, bactérias patogênicas intracelulares obrigatórias geralmente codificam apenas 500 a 1000 proteínas. Outro dado interessante mostra que cada linhagem bacteriana segue diferentes rotas evolutivas para compor o minimalismo do genoma. Portanto, não há um repertório mínimo de genes conservados para os processos celulares universais, tais como crescimento e replicação (MORAN, 2002).

É plausível supor que devido à sua associação estreita com o protozoário, o endosimbionte possa ter perdido, substituído ou transferido genes para o núcleo da

célula hospedeira, provavelmente para tornar o seu metabolismo mais eficiente (CAVALIER-SMITH, 1987). Isso provavelmente aconteceu com os endosimbiontes que originaram as mitocôndrias e cloroplastos (MARTIN, 2003). Contudo, como Moran (2002) salienta, a perda de função gênica não leva necessariamente ao minimalismo do genoma com a eliminação de DNA, como revelam estudos recentes com alguns tipos de bactérias endosimbióticas. Um exemplo é a espécie *Buchnera aphidicola*, da subdivisão de  $\gamma$ -proteobactérias, onde estudos mostram que tais procariotos retêm DNA não-funcional na forma de pseudogenes. Essas bactérias possuem ainda uma grande estabilidade no genoma, estando esta associada com uma quase completa ausência de rearranjos cromossômicos e de eventos de transferência gênica horizontal durante os últimos 150 milhões de anos, possivelmente devido à perda de genes envolvidos com a recombinação de DNA nos estágios iniciais da endosimbiose (SILVA et al., 2003).

É interessante destacar que no caso de tripanosomatídeos existe apenas uma bactéria simbiótica por célula, fato que implica a existência de um perfeito controle temporal da divisão celular destes organismos. Os fatores que realizam e controlam este processo, e a maneira como eles agem, são até agora desconhecidos, e o seu estudo forma parte dos objetivos deste trabalho.

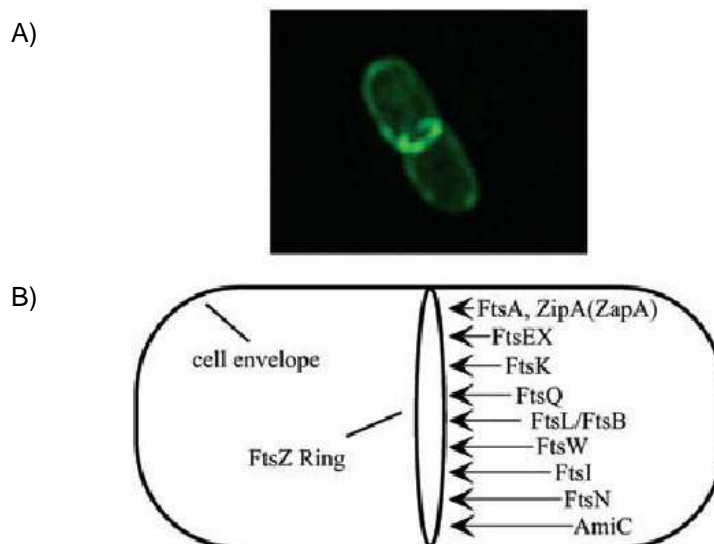
## 1.2 DIVISÃO CELULAR EM BACTÉRIAS

A maioria das bactérias cresce e se divide por um processo chamado de fissão binária, dando origem a duas células filhas – cada uma com um material genético. Para que isso ocorra, esse processo deve ser acompanhado por uma correta replicação e segregação do cromossomo único durante a divisão da célula-mãe (LUTKENHAUS, 2007). Uma análise mais fina da divisão bacteriana, utilizando-se microscopia eletrônica, revelou a formação de um septo no meio da célula.

Em bactérias, para que a divisão celular aconteça é preciso que o aparelho de divisão (dito septo ou divisoma) se forme no sítio da futura constrição do citoplasma e posteriormente dirija a invaginação orquestrada da membrana e da parede celular. Mensuração da posição do septo em bacilos revelou que este se posiciona precisamente na região central da bactéria (revisado por LUTKENHAUS, 2007). Então vem a grande pergunta: como essa especificidade topológica é conseguida? Quais são os fatores que a regulam?

O estudo da divisão celular em *Escherichia coli* utilizando-se técnicas de biologia molecular levou à identificação de genes essenciais neste processo. A maioria desses genes têm a designação de *fts* (*filamentation temperature-sensitive*), devido à filamentação causada em mutantes sensíveis à temperatura ao gene correspondente (LUTKENHAUS, 2007).

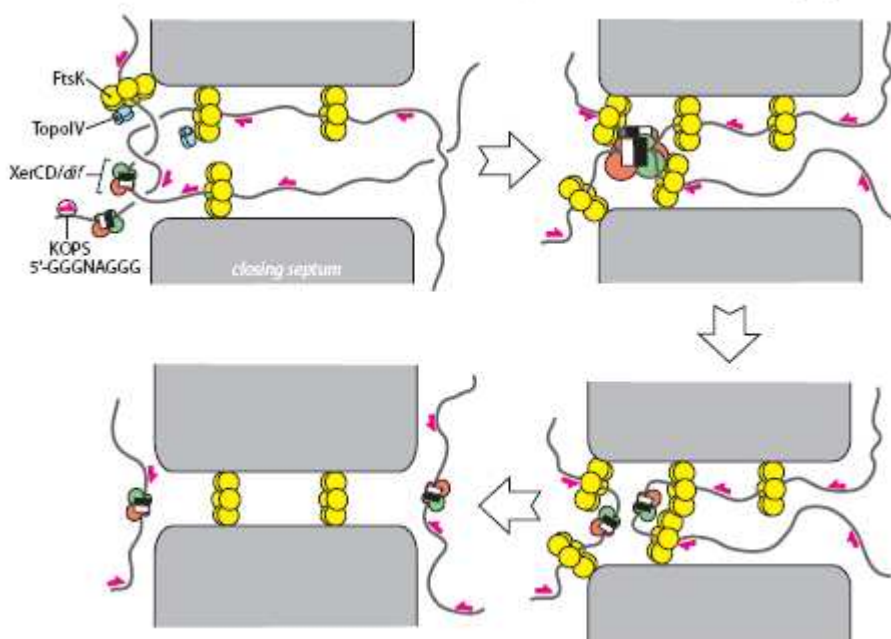
A proteína FtsZ, um homólogo estrutural da tubulina eucariótica (NOGALES et al., 1998), tem um papel chave na divisão, dado que é a primeira proteína que polimeriza associada à face interna da membrana citoplasmática, formando uma estrutura anular no centro da célula (anel Z). O interessante é que esta proteína está presente em virtualmente todas as eubactérias, assim como também em Archaeas e algumas organelas eucarióticas, tais como cloroplastos das plantas e algas verdes, e mitocôndrias de eucariotos primitivos (OSTERYOUNG & NUNNARI, 2003). O anel Z, por sua vez, atua como arcabouço para outros componentes do divisoma, que vão se ligando de forma seqüencial e dirigem a constrição do citoplasma, até gerar duas células filhas equivalentes (revisto por ERRINGTON et al., 2003; LUTKENHAUS, 2007). Assim, além de FtsZ, foram identificadas pelo menos treze proteínas que formam o divisoma em *E. coli*: FtsA, ZipA, ZapA, FtsE, FtsX, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, PBP3 (FtsI), FtsN e AmiC, todas as quais foram visualizadas mediante microscopia de fluorescência formando um anel na posição central da célula (figura 2).

FIGURA 2 – ANEL SEPTAL EM *Escherichia coli*

A) GFP-FtsL visualizada por microscopia de deconvolução. B) Modelo para a montagem seqüencial das proteínas no anel septal em *E. coli*. FONTE: Weiss (2004).

FtsA e ZipA (de *Z-interacting protein A*) interagem diretamente com FtsZ somente após a deposição desta última na região central da célula onde se formará o divisoma. FtsA e ZipA são majoritariamente citosólicas, embora ZipA apresente um domínio transmembrana N-terminal e FtsA se associe de forma periférica à membrana. Ambas estão envolvidas na estabilização e na ancoragem do anel Z à membrana. O restante das proteínas do divisoma se liga mais tarde no anel (figura 4), possui localização na membrana e/ou no periplasma e, com exceção de FtsE (de função desconhecida) e FtsK (envolvida na segregação do cromossomo, ver mais abaixo), todas participam na síntese do peptidoglicano septal.

FtsK está envolvida na partição do cromossomo durante as últimas etapas da segregação do DNA, e é altamente conservada entre as eubacterias. Trata-se de uma proteína com massa molecular elevada, com um domínio transmembrana N-terminal essencial para a formação do septo e um domínio citosólico C-terminal que possui atividade DNA translocase dependente de ATP (BIGOT et al., 2004). Outras proteínas tais como XerC, XerD, Topo IV participam do processo de segregação cromossomal (Figura 3).

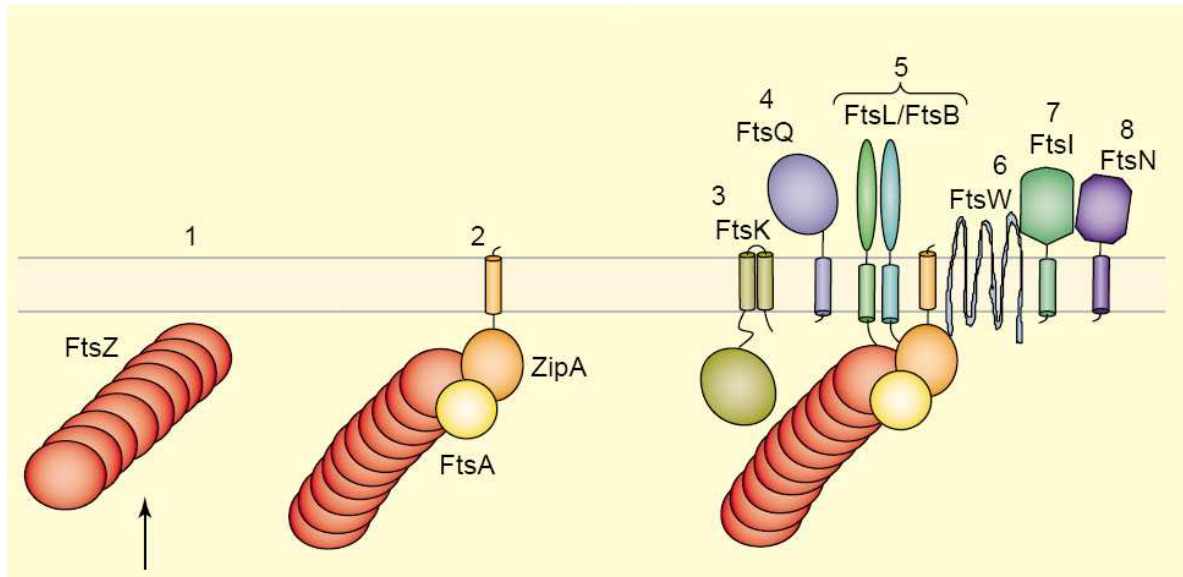
FIGURA 3 – DIVISÃO DOS CROMOSSOMOS EM *Escherichia coli*

FONTE: Bigot et al (2007)

Da mesma forma que a tubulina, a proteína FtsZ liga e hidrolisa GTP (MUKHERJEE et al., 1993; DE BOER et al., 1992a; RAYCHAUDHURI & PARK, 1992). A ligação do GTP induz uma polimerização reversível da proteína que resulta na formação de protofilamentos (MUKHERJEE & LUTKENHAUS, 1994). Por sua vez, a auto-associação de FtsZ é essencial para a hidrólise do GTP, dado que o sítio catalítico é formado pela interação de dois monômeros. Recentemente foi descrito que o anel Z é extremamente dinâmico *in vivo*. Embora o mecanismo molecular através do qual FtsZ dirige a citocinese seja ainda desconhecido, existem evidências que sugerem que o passo limitante na dinâmica do anel Z é a hidrólise do GTP (STRICKER et al., 2002; ANDERSON et al., 2004).



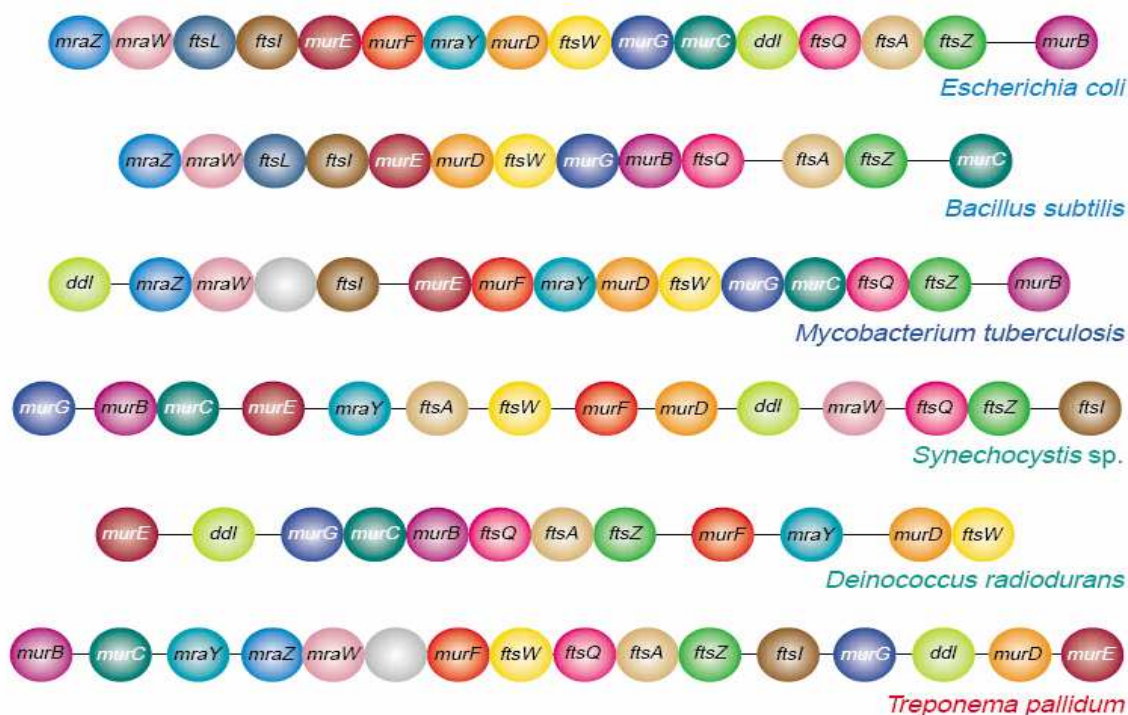
FIGURA 4 – INTERDEPENDÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO DIVISOMA EM *Escherichia coli*



A flecha indica o momento de seleção do sítio de divisão e os números a ordem temporal na qual as distintas proteínas vão se adicionando ao divisoma. FONTE: Carballido-López & Errington (2003)

A maioria dos genes implicados no processo de divisão celular e síntese da parede encontra-se localizada no mesmo cluster cromossômico, chamado do *dcw* cluster (**d**ivision and **c**ell **w**all) (figura 5). Esse agrupamento gênico encontra-se conservado mesmo em bactérias filogeneticamente distantes, tanto ao nível da identidade como da ordem dos genes, o que poderia facilitar a formação dos complexos protéicos específicos (MINGORANCE et al., 2004). Existem, porém, algumas espécies bacterianas nas quais estão ausentes alguns dos genes deste agrupamento, sendo casos extremos aquelas bactérias de vida intracelular obrigatória, tais como aquelas patogênicas do gênero *Mycoplasma*, que só possuem os genes do início (*mraZ-mraW*) e do final (*ftsZ*) do agrupamento (HIMMELREICH et al., 1996). O mesmo é encontrado no endossimbionte de afídeos, *Buchnera aphidicola*, que possui a seqüência *ftsL-ftsI-murE-murF-mraY-murD-ftsW-murG-murC-ddIB-ftsA-ftsZ* (BAUMANN & BAUMANN, 1998). Os genes desinados por *mur* codificam proteínas que participam da síntese de peptidoglicanos.

FIGURA 5 – AGRUPAMENTO GÊNICO EM DISTINTAS ESPÉCIES BACTERIANAS



FONTE: Tamames et al. (2001)

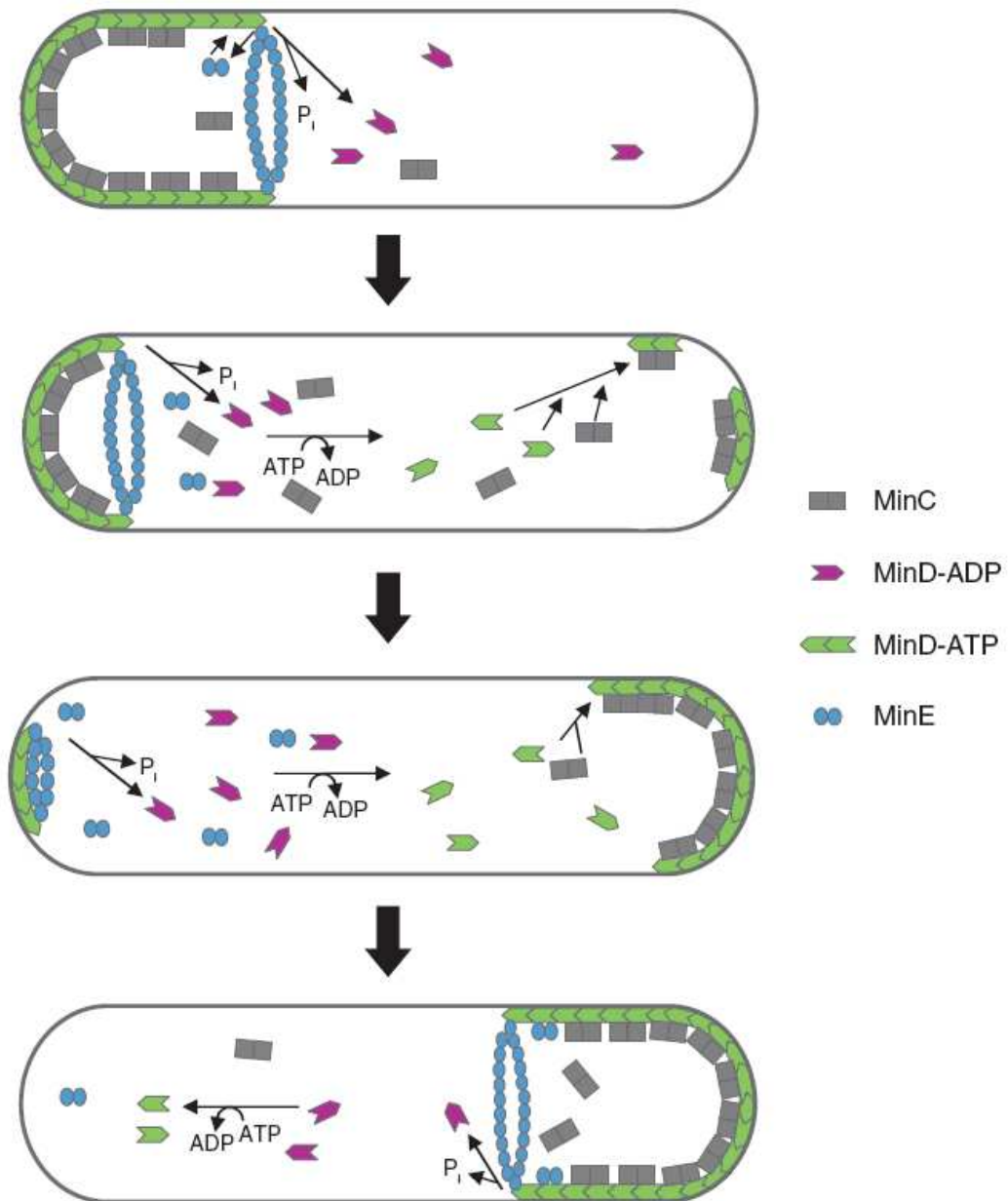
### 1.2.1 Sistema Min

Uma vez que a divisão celular é um processo espacial e temporalmente regulado, há a necessidade da presença de proteínas cuja atividade se contraponha à daquela das proteínas de divisão, a fim de evitar a formação do septo em posições incorretas na célula. Essas proteínas são conhecidas como proteínas desestabilizadoras, como as que compõem o complexo MinCD (revisto por HOWARD, 2004). O prefixo Min é devido ao fato de mutações nesses genes levarem a célula a se dividir nos pólos, gerando mini-células sem material genético. MinC e MinD formam um complexo que interage com FtsZ e com a membrana celular e inibe a polimerização de FtsZ. Esse complexo é um inibidor não específico do septo, sendo capaz de bloquear todos os sítios potenciais de divisão bacteriana. A proteína responsável pela especificidade topológica do complexo MinCD é a proteína MinE, cuja localização oscilatória em torno à região central da célula suprime a atividade inibitória de MinCD exclusivamente nessa região, permitindo assim a polimerização da FtsZ na posição correta (HU & LUTKENHAUS, 1999). Mediante análises de microscopia de fluorescência com células vivas da bactéria *Escherichia coli* foi evidenciada a localização oscilatória do complexo MinCD entre

os pólos celulares, enquanto que a localização de MinE, sendo também oscilatória, se limita exclusivamente à região central da célula. Homólogos de MinD e MinE foram encontrados em cloroplastos das plantas e algas verdes, indicando que o mecanismo de determinação topológica da divisão se conservou ao longo da evolução (OSTERYOUNG & NUNNARI, 2003)

A figura 6 mostra um modelo de como esse sistema funciona.

FIGURA 6 – MODELO DE OSCILAÇÃO DAS PROTEÍNAS Min



MinD-ATP se liga à membrana e recruta MinC. MinE desloca MinC e estimula a atividade ATPásica de MinD, ocorrendo, então, a liberação dessas proteínas da membrana. Quando acontece a liberação de MinE, esta pode imediatamente se ligar à MinD que está na membrana. MinD liberada sofre então troca de nucleotídeo gerando MinD-ATP. A concentração de MinD-ATP nas imediações do antigo pólo é diminuída pelo fato de se ligar cooperativamente à membrana já contendo MinD. Em contrapartida, a concentração de MinD-ATP aumenta no outro pólo, que carece de MinD ligado à membrana. À medida que a concentração aumenta, MinD acaba se ligando, formando uma nova zona polar. Como MinE é liberada do antigo pólo, a proteína se liga na extremidade da zona polar de MinD.

FONTE: LUTKENHAUS, 2007

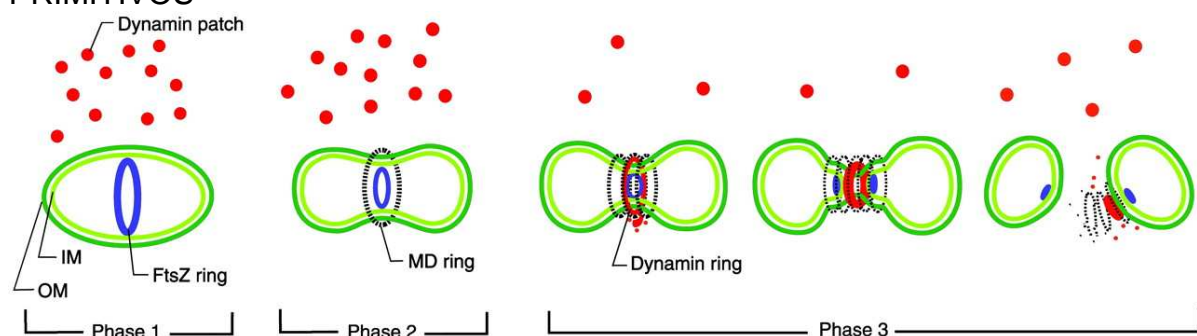
MinD-ATP se liga à membrana e recruta MinC. MinE desloca MinC e estimula MinD ATPase, causando sua liberação da membrana. MinD rapidamente torna-se MinD-ATP formando o complexo MinCD ligado à membrana no pólo oposto. A oscilação de um pólo a outro leva em torno de 40-50 segundos. Inúmeros trabalhos

têm mostrado que MinD ocupa o papel central do sistema, interagindo com MinC e MinE.

### 1.3 DIVISÃO CELULAR EM ORGANELAS DE ORIGEM ENDOSIMBIÓTICA

O papel das proteínas de divisão tem também merecido destaque em relação às organelas de origem endossimbiótica, como os cloroplastos e mitocôndrias (OSTERYOUNG & NUNNARI, 2003). Os cloroplastos presentes em eucariotos fotosintéticos superiores ainda se dividem usando componentes derivados daqueles usados para divisão celular dos ancestrais procariotos, onde a proteína FtsZ tem um papel chave. Dado o envolvimento quase universal da FtsZ na divisão de procariotos, é surpreendente a ausência de genes *ftsZ* nos genomas nuclear e mitocondrial de *S. cerevisiae* e *C. elegans*. Esse fato indica que um mecanismo diferente para a divisão mitocondrial evoluiu em fungos e animais, não sendo este mais baseado na FtsZ (OSTERYOUNG, 2000) levando à descoberta de um segundo grupo de GTPases, conhecidas como proteínas relacionadas à dinamina (DRPs, **d**ynam**i**n-related **p**roteins). Dinaminas atuam em vários processos celulares envolvendo tráfego de vesículas (HINSHAW, 2000). DRPs denominadas de Dnm1 em levedura e Drp1 em animais estão diretamente associadas com os sítios de constrição e fissão mitocondrial (BLEAZARD et al., 1999, LABROUSSE et al., 1999). A figura 7 mostra um modelo de divisão mitocon

FIGURA 7 – MODELO DE DIVISÃO MITOCONDRIAL EM EUCARIOTOS PRIMITIVOS



A membrana externa (OM) e a membrana interna (IM) da mitocôndria estão representadas por verde escuro e verde claro, respectivamente. A localização mitocondrial de FtsZ e da dinamina estão indicados em azul e vermelho, respectivamente. Primeiramente ocorre a formação do anel Z no lado da matriz mitocondrial, determinando, então, o sítio de divisão. Em seguida, ocorre a formação do anel MD. Esses dois anéis (anel Z e MD) começam a fazer a constrição da mitocôndria. Quando tiver ocorrido suficiente constrição tornando tubular o sítio de constrição, dinamina é recrutada, se localizando no lado citoplasmático da membrana externa, formando um anel ou espiral, terminando a constrição e formando duas organelas filhas. FONTE: Nishida, 2004

A existência de um sistema de divisão mitocondrial independente de FtsZ, leva à possibilidade de haver, mesmo apesar da presença da proteína FtsZ, um processo de divisão no endosimbionte que possa ser executado por uma maquinaria diferente daquela de origem procariótica baseado em proteínas da célula hospedeira, como dinaminas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o estudo e identificação dos genes que codificam as proteínas envolvidas na divisão celular do endosimbionte do tripanosomatídeo *Crithidia deanei*. Este trabalho faz parte de um projeto mais ambicioso, que trata do seqüenciamento total do genoma do endosimbionte, produzindo informação detalhada sobre sua origem evolutiva e inferências sobre os fatores que levam a uma associação mutualística dessa bactéria com os tripanosomatídeos hospedeiros.

### 2.2 METAS

- 1) Caracterizar os genes *ftsK*, *ftsZ*, *zipA*, *minC*, *minD* e *minE* do endosimbionte, bem como estudar o envolvimento desses genes no processo de divisão da bactéria simbiótica presente em tripanosomatídeos.
- 2) Realizar estudos de complementação de um mutante  $\Delta$ minCDE de *E. coli* (PB114).
- 3) Produzir antisoros policlonais específicos contra as proteínas do sistema Min (MinCDE) e realizar estudos de imuno-localização usando microscopia de fluorescência.
- 4) Avaliar a atividade bioquímica e as interações entre essas proteínas.
- 5) Estudar o envolvimento de proteínas relacionadas às dinaminas no processo de divisão do endosimbionte.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2 CULTIVO DOS MICRORGANISMOS

##### 3.1.1 Cultivo dos tripanosomatídeos

*Crithidia deanei* e *Blastocrithidia culicis* contendo endosimbionte foram cultivadas em meio Warren (WARREN, 1960) contendo 10% de soro fetal bovino, a 28 °C com passagens a cada 24 h. No caso das cepas curadas (aposimbióticas), o meio de cultivo foi o mesmo, mas a concentração de soro fetal bovino foi aumentada para 20%. Após cultivo nestas condições, as culturas se encontravam em fase exponencial de crescimento.

##### 3.1.2 Cultivo de bactérias

As cepas de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1. As cepas XL1-blue e Top10F' foram usadas como hospedeiras para as clonagens moleculares. A cepa BL21 contendo o plasmídeo pLysS foi utilizada para indução de genes clonados no vetor pET47b. A cepa Rosetta (DE3) contendo pRARE foi usada para aumentar a expressão de proteínas para posterior purificação. A cepa PB114 foi usada para o estudo de complementação com os genes *minCDE* do simbiote. Os meios de cultura LB (Luria-Bertani broth) e LB ágar, suplementados com antibióticos quando requeridos (100 µg/ml ampicilina, 80 µg/ml kanamicina, 34 µg/ml cloranfenicol, 12,5 µg/ml tetraciclina), foram usados para manter *E. coli* a 37 °C.

TABELA 1- LISTA DE CEPAS DE *Escherichia coli*

Nome da cepa	Genótipo	Referencia
BL21		
PB114	<i>dadR1, trpE61, trpA62, tna-5, ΔminCDE::kan</i>	de Boer et al, 1989
Rosetta (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT, hsdS<sub>B</sub>, (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm, lacY1</i> , (DE3), pRARE (Cm <sup>R</sup> )	Novagen
Top10F'	F' <i>{lacIq Tn10 (TetR)}</i> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Invitrogen
XL1blue	<i>endA1, gyrA96, hsdR17, lac.sup.-, recA1</i>	Stratagene



## 3.2 ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO DO ENDOSIMBIONTE DE *Crithidia deanei*

### 3.2.1 Fracionamento celular: Isolamento do endosimbionte

*C. deanei* foi cultivada em 800 ml de meio Warren por 24 h a 28 °C até a concentração de aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/ml. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a  $4.000 \times g$  por 10 min e lavadas duas vezes com PBS. O sedimento celular foi então resuspenso em água bidestilada gelada e mantido por 45 min no gelo. A suspensão celular foi então submetida a centrifugação nas mesmas condições descritas acima. As células foram resuspensas em 12 ml de sacarose a 0,25 M em Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 e foram lisadas por ultra-som com três pulsos de 15 s na potência 2 do aparelho Ultrasonic Homogenizer, modelo 4710 (Cole-Parmer Instrument Co.). O volume do lisado foi então ajustado para 20 ml com tampão contendo sacarose 0,25 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,6),  $\text{CaCl}_2$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM e DNase tipo I (Sigma) 25  $\mu\text{g/ml}$ . O homogenato foi então incubado a 25 °C por 30 min. Decorrido esse tempo, o volume foi aumentado para 30 ml com sacarose 0,25 M, Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) e centrifugado a  $5.000 \times g$  por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi resuspenso em sacarose 0,25 M em Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) e EDTA 2 mM. Pronase (protease tipo XIV de *Streptomyces griseus*) foi adicionada para a concentração final de 0,5 mg/ml. O homogenato foi imediatamente centrifugado a  $4.000 \times g$  por 20 min. O sedimento foi resuspenso em 10 ml de Tris-HCl 20 mM (pH 7,6) contendo sacarose 0,25 M. Alíquotas de 2,5 ml dessa solução foram colocadas sobre 2,5 ml de sacarose a 0,5 M contidos em tubos de centrífuga de vidro com capacidade para 15 ml (tubos Corex<sup>®</sup>). O material foi centrifugado a  $550 \times g$  por 10 min, a camada acima do colchão de sacarose 0,5 M foi coletada e o sedimento, consistindo principalmente de células não lisadas pelo ultra-som, foi descartado. A camada superior foi centrifugada a  $4.000 \times g$  por 10 min e o sedimento foi resuspenso em 6 ml de sacarose 0,25 M em Tris-HCl 20 mM, pH 7,6. O material (1 ml por tubo) foi cuidadosamente colocado sobre 3 ml de gradiente descontínuo de sacarose (2 ml de sacarose 0,44 M e 1 ml de sacarose 0,88 M). Após a centrifugação a  $1.740 \times g$  por 30 min, o sedimento enriquecido em endosimbiontes foi coletado.

### 3.2.2 Purificação do DNA endossimbionte

O DNA da fração de endossimbiontes obtida por fracionamento celular de *C. deanei* foi isolado como descrito por Ausubel et al. (1988). O protocolo consiste basicamente na suspensão da fração de endossimbiontes em TE (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0), seguida da adição de tampão de lise contendo EDTA 5 mM, NaCl 10 mM, SDS 0,5% e proteinase K 2 mg/ml diluídos em Tris-HCl 10 mM, pH 8. O material foi incubado por 1 h a 55 °C e o DNA foi purificado por extração com fenol/clorofórmio e precipitado com etanol na presença de acetato de sódio 0,3 M, pH 6,0 por 30 min em gelo seco. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000 x g e lavado com etanol 70 %. Após secar a temperatura ambiente, o DNA foi diluído em TE e quantificado por espectrofotometria UV a 260 nm.

### 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *Escherichia coli*

O protocolo utilizado foi tomado de Syn & Swarup (2002). Cerca de 3 ml de uma cultura de *Escherichia coli* com densidade óptica de 1,2 (A600) foram centrifugados por 5 minutos a 4000g e o sedimento celular foi lavado com 0,75 ml de NaCl a 1% e resuspenso em 0,75 ml de TES (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8, 2% SDS). A ressuspensão foi incubada por 5 min a 75 °C. O DNA foi extraído pela adição de fenol:clorofórmio (3:1, v/v), seguida por extração com clorofórmio. O DNA foi precipitado com acetato de sódio e isopropanol a temperatura ambiente e centrifugado imediatamente em uma microcentrífuga. O pellet foi lavado com etanol 70% e resuspenso em 150 µl de TE contendo RNase (50 µg/ml). O DNA foi quantificado no espectrofotômetro e 100 ng foram usados para cada amplificação por PCR.

### 3.4 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E MANIPULAÇÃO DO DNA

Os plasmídeos e oligonucleotídeos (primers) utilizados neste trabalho estão listados na tabela 2. Vale ressaltar que todas as amplificações foram realizadas utilizando a Triple Master DNA Polimerase (Eppendorf), a fim de garantir a fidelidade da seqüência de nucleotídeos dos fragmentos de interesse.

Todas as construções foram verificadas por análise de restrição e posterior seqüenciamento do DNA.

TABELA 2- LISTA DE PLASMÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS

Plasmídeos		
Nome	Características	Referencia
pBAD22	Vetor de expressão de genes sob controle de P <sub>BAD</sub> e <i>araC</i>	Guzman et al., 1995
pBADminCDEe	Derivado de pBAD22, contendo <i>minCDEe</i> sob controle de P <sub>BAD</sub> e <i>araC</i>	Este trabalho
pBADminCDEEc	Derivado de pBAD22, contendo <i>minCDE</i> de <i>Escherichia coli</i> sob controle de P <sub>BAD</sub> e <i>araC</i>	Este trabalho
pETftsZEc	Derivado de pET28a, contendo <i>ftsZ</i> de <i>Escherichia coli</i> sob controle de P <sub>T7</sub> (Ap <sup>R</sup> )	Lucia Yim
pETftsZe	Derivado de pET47b, contendo <i>ftsZe</i> sob controle de P <sub>T7</sub> (Kan <sup>R</sup> )	Este trabalho
pGEX-4T	Vetor de clonagem para fusões a GST, com sítio de corte por Trombina (Ap <sup>R</sup> )	Pharmacia Biosciences
pGEXminCe	Derivado de pGEX-4T contendo a fusão GST-MinCe sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pGEXminDe	Derivado de pGEX-4T contendo a fusão GST-MinDe sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pGEXminDeK11A	Derivado de pGEX-4T contendo a fusão GST-MinDe sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> ), no entanto o resíduo de lisina na posição 11 foi substituído pelo resíduo de alanina	Este trabalho
pGEXminDeK16A	Derivado de pGEX-4T contendo a fusão GST-MinDe sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> ), no entanto o resíduo de lisina na posição 16 foi substituído pelo resíduo de alanina	Este trabalho
pGEXminEe	Derivado de pGEX-4T contendo a fusão GST-FtsZe sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pGEXftsKe	Derivado de pGEX-4T contendo a fusão GST-FtsKe sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pGFPXa	Vetor de clonagem para fusões a GFP, expressada sob controle de P <sub>T5</sub> , com cauda de 6xHis no extremo Nt e sítio de corte por Fator $\kappa$ á no extremo Ct da GFP (Ap <sup>R</sup> )	Morking et al., 2004, BBRC
pGFPZipAe	Derivado de pGFPXa contendo a fusão GFP-ZipAe sob controle do promotor P <sub>T5</sub> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pGroESL	Genes <i>groES</i> e <i>groEL</i> de <i>E. coli</i> clonados sob controle do P <sub>Tac</sub> num vetor com origem de replicação p15A (compatível com colE1) (Cm <sup>R</sup> )	Goloubinoff et al., 1989
pJF119EH	Vetor de expressão de genes sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Furste et al., 1986
pJFminCe	Derivado de pJF119EH, portando <i>minCe</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pJFminCRBS	Derivado de pJF119EH, portando <i>minCe</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pJFminCDRBS	Derivado de pJF119EH, portando <i>minCDe</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pJFminCDEe	Derivado de pJF119EH, portando <i>minCDEe</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pJFminCDEEc	Derivado de pJF119EH, portando <i>minCDEEc</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pJFminEe	Derivado de pJF119EH, portando <i>minEe</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho

pJFzipAe	Derivado de pJF119EH, portando <i>zipAe</i> sob controle de P <sub>Tac</sub> e <i>lacI<sup>f</sup></i> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pNUSMYC	Derivado de pNUSHcN (vetor de expressão de tripanosomatídeos), portando três seqüências MYC	Este trabalho
pNUSMYCDnmTc	Derivado de pNUSMYC, portando o gene <i>Dnm</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Este trabalho
pQEminCe	Derivado de pQE30, portando <i>minCe</i> sob controle do promotor P <sub>T5</sub> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pQEminDe	Derivado de pQE30, portando <i>minDe</i> sob controle do promotor P <sub>T5</sub> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pQEminEe	Derivado de pQE30, portando <i>minEe</i> sob controle do promotor P <sub>T5</sub> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pQEzipAe	Derivado de pQE30, portando <i>zipAe</i> sob controle do promotor P <sub>T5</sub> (Ap <sup>R</sup> )	Este trabalho
pRARE	Plasmídeo portador dos genes para os tRNAs dos codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, com origem de replicação compatível com Col-E1 (Cm <sup>R</sup> )	Novagen
pREP4	Plasmídeo portador do gene <i>lacI</i> , com origem de replicação p15A (compatível com colE1) (Km <sup>R</sup> )	Qiagen
pTEXGFP2	Vetor de expressão de tripanosomatídeos	Gisele Picchi
pTEXGFPDnmTc	Derivado do pTEXGFP2 portando o gene <i>Dnm</i> de <i>Trypanosoma cruzi</i>	Este trabalho
<b>OLIGONUCLEOTÍDEOS</b>		
<b>Nome</b>	<b>Seqüência</b>	<b>Sítio de restrição</b>
minC1	5'-ATGAATTCATGATGAATAAATCCTTAATTGAATTTA-3'	<i>EcoRI</i>
minC2	5'-CTTCTAGAGAGTTATATGGCAATTATTGTTAGTT-3'	<i>XbaI</i>
minC3	5'-ATGGTACCAGGAGGTTAAAATGATGAATAAATCCTTAATTG-3'	<i>KpnI</i>
QECF	5'CATGGATCCATGATGAATAAATCCTTAATTGAATTTA3'	<i>BamHI</i>
QECR	5'ACTAAGCTTGGAGTTATATGGCAATTATTGTTAGTT3'	<i>HindIII</i>
minD2	5'-GATCTAGATTATCTACCTCCAAAAAGTCG-3'	<i>XbaI</i>
minD3	5'-CAGGTCGACTCGTGCGCGAGTTGTTGTAGTAACT -3'	<i>Sall</i>
minD4	5'-GAGCGGCCGCTTATCTACCTCCAAAAAGTCGTTTGATA-3'	<i>NotI</i>
K11A	5'CAGGTCGACTCGTGCGCGAGTTGTTGTAGTAACTTCTGGT <b>GCA</b> GGAGGCGTGG 3'	<i>Sall</i>
K16A	5'CAGGTCGACTCGTGCGCGAGTTGTTGTAGTAACTTCTGGTAAAG GAGGCGTGGGT <b>GC</b> AACCACTAGCA3'	<i>Sall</i>
QEDF	5'CAGGGATCCGTGGCGCGAGTTGTTGTAGTAACT3'	<i>BamHI</i>
QEDR	5'AGAAAGCTTTTATCTACCTCCAAAAAGTCGTTTGATA3'	<i>HindIII</i>
minE1	5'- TGAATTC AACATGTCATTTCTGTCGTTT-3'	<i>EcoRI</i>
minE2	5'-GATCTAGATTAAAGTTTTTGTTCATCTCTAT-3'	<i>XbaI</i>

minEgfpR	5' CGAGCTAGC <b>TTA</b> AGTTTTTTGTTGCATCTCTAT 3'	<i>NheI</i>
minEgstR	5' GATAAGTTTTGCGGCCGC <b>TTA</b> AGTTTTTTGTTGCATCTCTAT 3'	<i>NotI</i>
QEEF	5'CTTGGATCCATGTCATTTCTGTCGTTT3'	<i>BamHI</i>
QEER	5'CGAAAGCTTTTAAGTTTTTTGTTGCATCTCTAT3'	<i>HindIII</i>
minCEc1	5'-GTGAATTCGGGAT <b>GT</b> TCAAACACGCCAATCG-3'	<i>EcoRI</i>
minEEc1	5'- CAGGATCC <b>TTA</b> TTTCAGCTCTTCTGCTTCCGG-3'	<i>BamHI</i>
zipA3	5' TTAGGTACCAGGAGGACTA <b>ATG</b> ACTAATGTAAATAATTC 3'	<i>KpnI</i>
zipA4	5' TATCTAGATTAGCTAGC <b>TTT</b> AAAAACTCTTCTTGCACG-3'	<i>XbaI</i> e <i>NheI</i>
zipA2	5'-TAAAGCTTTTAAGATC <b>TTT</b> AAAAACTCTTCTTGCACG-3'	<i>HindIII</i> e <i>BglII</i>
zipA5	5' TTAAAGCTTATGACTAATGTAAATAATTCAAAG 3'	<i>HindIII</i>
QEAF	5' TTAGGATCCATGACTAATGTAAATAATTCAA3'	<i>BamHI</i>
QEAR	5' CTAAGCTTTTAAAAACTCTTCTTGCACGATAGC3'	<i>HindIII</i>
ftsK1	5'ATGAATTC <b>CC</b> CAGATCTTAGTTTATTAGATATGCCA 3'	<i>EcoRI</i>
ftsK2	5'ATCATGATGCGGCCGC <b>TTA</b> TCACTCATCCTTACCATCTGTAG 3'	<i>NotI</i>
dinGFP1	5' CTAGATCTC <b>ATG</b> AATCAGCTTATCGCTGT 3'	<i>BglII</i>
dinGFP2	5' TAATCGAT <b>TTA</b> TAAATGTAAATTCACGCACAC 3'	<i>Clal</i>
pETZeF	5'AAG <b>AAT</b> TCGATGAGGTTTGAGATTC3'	<i>EcoRI</i>
pETZeR	5'AATG <b>TGC</b> GACATAATCAACTCTCTTTC3'	<i>Sall</i>

Os sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição adicionados aos primers estão sublinhados e os códons de início ou final da tradução estão em negrito. Destaque em vermelho: mutação inserida na sequência.

### 3.4.1 Amplificação por PCR (Reação em cadeia da polimerase) de genes para clonagem

Os oligonucleotídeos foram construídos com base nas seqüências dos genes do endosimbionte de *C. deanei*, cujo genoma está sendo seqüenciado no IBMP. Para amplificar minCDE de *E. coli* utilizamos a seqüência dos genes disponível no Genbank ([www.genbank.org](http://www.genbank.org)). Para amplificar a dinamina utilizamos a seqüência do gene do *Trypanosoma cruzi*, já que o gene de *C. deanei* não foi caracterizado.

As amplificações por PCR foram realizadas com uma mistura de Taq DNA polimerase e uma outra polimerase de alta fidelidade (Triplmaster PCR system - Eppendorf), para minimizar a possibilidade de incorporação de mutações na seqüência a clonar. As reações continham, em um volume de 50 µl, 100 ng de DNA

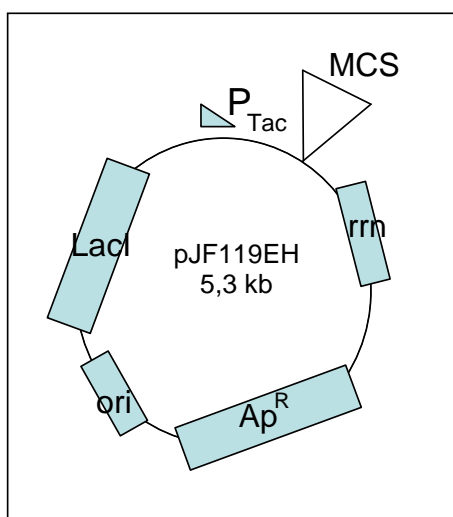
isolado do endosimbionte, 175  $\mu$ M de cada dNTP, 10 pmoles de cada primer e 2 unidades de DNA polimerase com tampão apropriado fornecido pelo fabricante. A mistura foi previamente incubada a 94 °C por 2 minutos e logo após foi submetida a 35 ciclos de amplificação, cada um consistindo de incubações a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1,5 minutos (a temperatura de anelamento e o tempo de extensão dependeram de cada oligonucleotídeo e do tamanho do fragmento a amplificar). Em seguida a amostra permaneceu por mais 5 minutos a 72 °C. As reações foram realizadas em termociclador Perkin-Elmer 9700 ou MWG de Biotech.

### 3.4.2 Clonagens

#### 3.4.2.1 Clonagem do gene *minC* do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH

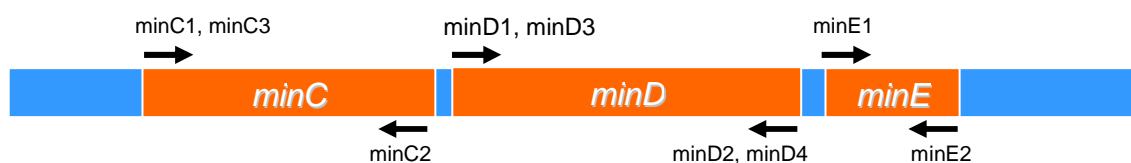
Para a clonagem do gene *minC* do endosimbionte de *C. deanei* (*minCe*) no pJF119EH (figura 6, FURSTE et al., 1986), este foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico purificado do simbiote usando os primers minC1/minC2 (tabela 2 e figura 9).

FIGURA 8 – ESQUEMA DO PLASMÍDEO pJF119EH



MCS - sítio múltiplo de clonagem

FIGURA 9 – ESQUEMA DO AGRUPAMENTO GÊNICO *minCDE* DO ENDOSIMBIONTE MOSTRANDO A POSIÇÃO OS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS



O fragmento obtido, de 720 pb, foi digerido com *EcoRI* e *XbaI* e inserido no vetor pJF119EH previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, pJFminCe, expressa o *minCe* em sua forma nativa a partir do promotor P<sub>Tac</sub>, mediante indução com IPTG (isopropil-tio-galactopiranosídeo). A presença no plasmídeo do gene *lacI<sup>q</sup>*, que codifica para o repressor do P<sub>Tac</sub>, ajuda a diminuir o escape basal da transcrição.

O clone bacteriano contendo o plasmídeo pJFminCe quando incubado na presença de IPTG produziu uma proteína de massa molecular esperada (24,7 kDa), mas a indução foi muito reduzida, e não apresentava alteração do fenótipo de *E. coli*. Acreditamos que, nessas condições, a indução não foi suficiente para aumentar os níveis de MinCe significativamente. Assim, foi desenhado outro primer (minC3) introduzindo a seqüência AGGAGG, consenso para o sítio para ligação do ribossomo (Ribosome Binding Site, RBS), 5 pb a montante do ATG do gene para aumentar a sua expressão. Este primer introduzia no fragmento o sítio para *KpnI*. O gene *minCe* foi então amplificado com os primers minC3/minC2, digerido com *KpnI* e *XbaI* e ligado ao pJF119EH previamente digerido com as mesmas enzimas. Assim, foi possível aumentar os níveis de expressão de *minCe* em *E. coli*.

#### 3.4.2.2 Clonagem dos genes *minCD* do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH

A estratégia utilizada para superexpressar *minCe* e *minDe* simultaneamente em *E. coli* foi a mesma já descrita para o gene *minCe*, ou seja clonagem no vetor pJF119EH. Os genes *minCDe* foram amplificados usando os primers minC3/minD2 (tabela 2 e figura 7). O fragmento obtido, de 1670 pb, foi digerido com *KpnI* e *XbaI* e clonado no pJF119EH/*KpnI/XbaI*. O plasmídeo resultante chamou-se pJFminCDRBS.

#### 3.4.2.3 Clonagem do gene *minE* do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH

Para a clonagem do gene *minE* do endosimbionte de *C. deanei* (*minEe*) no pJF119EH, este foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico purificado do simbionte usando os primers minE1/minE2 (ver tabela 2 e figura 7). O fragmento obtido, de 255 pb, foi digerido com *EcoRI* e *XbaI* e inserido no vetor pJF119EH previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante se denominou pJFminEe.

#### 3.4.2.4 Clonagem dos genes *minCDE* do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH

O agrupamento gênico *minCDE* do endosimbionte (*minCDEe*) foi amplificado com os primers minC3/minE2 (tabela 2 e figura 7), o fragmento resultante, de 1930 pb, foi digerido com *KpnI* e *XbaI* e inserido no pJF119EH/*KpnI/XbaI*. O plasmídeo resultante chamou-se pJFminCDEe.

#### 3.4.2.5 Clonagem dos genes *minCDE* de *Escherichia coli* no vetor de expressão pJF119EH

Para obter um vetor que expressasse os genes *minCDE* de *E. coli* (*minCDEEc*) para ser usado como controle positivo nos ensaios de complementação, amplificamos os genes a partir do DNA genômico purificado da cepa XL1blue utilizando os oligos minCEc1 e minEEc1 (que contém os sítios de corte para as enzimas *EcoRI* e *BamHI*, respectivamente). O fragmento resultante, de 1900 pb, foi digerido com *EcoRI* e *BamHI* e clonado no vetor pJF119EH previamente digerido com *EcoRI* e *BamHI*. O plasmídeo assim obtido se denominou pJFminCDEEc.

#### 3.4.2.6 Clonagem dos genes *minCDE* do endosimbionte no vetor de expressão pBAD22

O agrupamento gênico *minCDE* do endosimbionte (*minCDEe*) foi amplificado com os primers minC1/minE2 (ver tabela 2 e figura 7), o fragmento resultante, de 1930 pb, foi tratado com o fragmento Klenow da DNA pol I e digerido com *XbaI*, e depois inserido no pBAD22/*Small/XbaI*. O plasmídeo resultante chamou-se pBADminCDEe.



#### 3.4.2.7 Clonagem dos genes *minCDE* de *Escherichia coli* no vetor de expressão pBAD22

Para obter um vetor que expressasse os genes *minCDE* de *E. coli* (*minCDEEc*) para ser usado como controle positivo nos ensaios de complementação, amplificamos os genes a partir do DNA genômico purificado da cepa XL1blue utilizando os oligos minCEc1 e minEEc1. O fragmento resultante, de 1900 pb, foi tratado com Klenow e digerido com *EcoRI*. Em seguida foi clonado no vetor pBAD22 previamente digerido com *EcoRI* e *SmaI*. O plasmídeo assim obtido se denominou pBADminCDEEc.

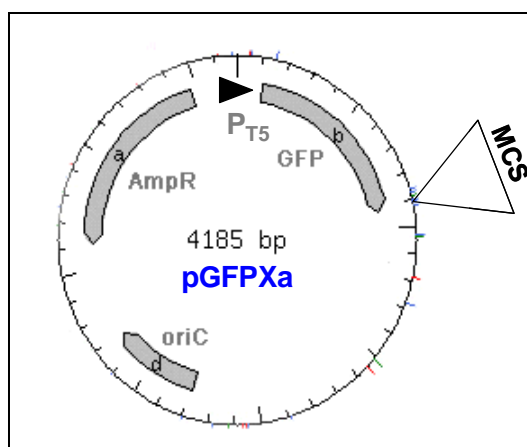
#### 3.4.2.8 Clonagem do gene *zipA* do endosimbionte no vetor de expressão pJF119EH

Para a clonagem do gene *zipA* do endosimbionte de *C. deanei* (*zipAe*) no pJF119EH, este foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico purificado do endosimbionte usando os primers zipA3/zipA4 (ver tabela 2). O fragmento obtido, de 944 pb, foi digerido com *KpnI* e *XbaI* e inserido no vetor pJF119EH previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante denominou-se pJFzipAe.

#### 3.4.2.9 Clonagem do gene *zipA* do endosimbionte no vetor de expressão pGFPXa

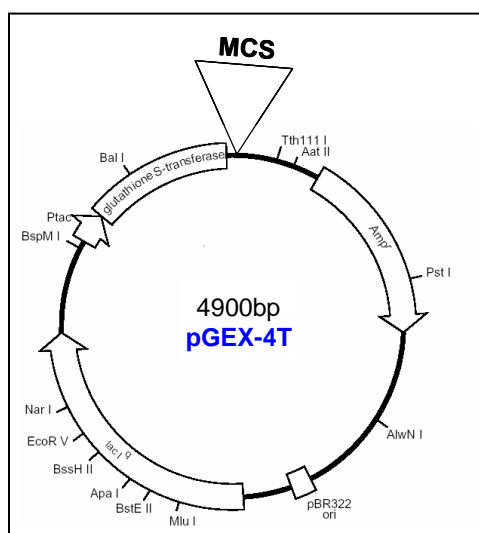
O gene *zipAe* foi amplificado com os oligos zipA2 e zipA5, o fragmento de 944 pb foi digerido com *HindIII* e *BglII* e então clonado no vetor pGFPXa (figura 10), previamente cortado com *HindIII* e *BglII*. Como resultado, obteve-se um plasmídeo, pGFPzipAe, que expressava a proteína quimérica GFP-ZipAe contendo uma cauda de 6xHis na porção amino-terminal, sob controle do P<sub>T5</sub>. Para limitar o escape basal da transcrição, o plasmídeo pGFPminCe foi co-transformado na mesma cepa com o pREP4, portador do gene *lac<sup>q</sup>*.

FIGURA 10 - ESQUEMA DO PLASMÍDEO pGFPXA

3.4.2.10 Clonagem do gene *minC* do endossimbionte no vetor de expressão pGEX-4T

O gene *minCe* foi amplificado com os primers minC1/minC2, tratado com Klenow e digerido com *EcoRI*. O fragmento então foi ligado ao pGEX-4T (figura 11), previamente digerido com *EcoRI* e *SmaI*. O plasmídeo resultante, pGEXminCe, codifica uma proteína de fusão composta pela GST (Glutathione-S-Transferase) e a MinC do endossimbionte (GST-MinCe) sob controle do P<sub>Tac</sub> e *lacI<sup>q</sup>*. Na união entre ambas existe um sítio de reconhecimento para a trombina.

FIGURA 11 - ESQUEMA DO PLASMÍDEO pGEX-4T



O pGEX4T possui os sítios de restrição para *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I, *Sal*I, *Xho*I e *Not*I. Entre a seqüência codificadora da GST e o MCS existe um sítio de corte para a trombina.

<http://www1.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/Products?OpenDocument&parentid=27458001&moduleid=38859>

#### 3.4.2.11 Clonagem do gene *minD* do endosimbionte no vetor de expressão pGEX-4T

O gene *minDe* foi amplificado com os primers minD3/minD4 (ver tabela 2 e figura 7), digerido com *Sall* e *NotI* e ligado ao pGEX-4T (figura 9), previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, pGEXminDe, expressava uma proteína de fusão composta pela GST (Glutathiona-S-Transferase) e a MinD do endosimbionte (GST-MinDe) sob controle do  $P_{Tac}$  e *lacI<sup>q</sup>*.

#### 3.4.2.12 Clonagem do gene *minE* do endosimbionte no vetor de expressão pGEX-4T

O gene *minEe* foi amplificado com os primers minE1/minEgstR (ver tabela 2 e figura 7), digerido com *EcoRI* e *NotI* e ligado ao pGEX-4T, previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, pGEXminEe, codifica uma proteína de fusão composta pela GST (Glutathiona-S-Transferase) e a MinD do endosimbionte (GST-MinEe) sob controle do  $P_{Tac}$  e *lacI<sup>q</sup>*.

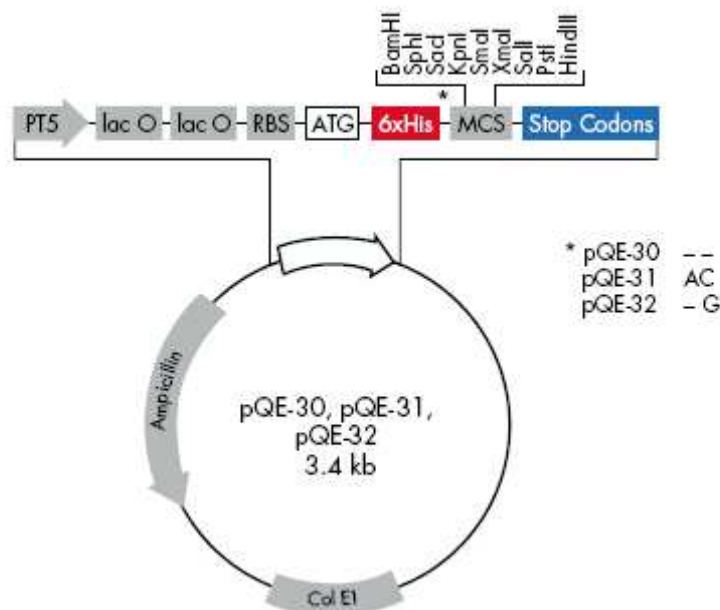
#### 3.4.2.13 Clonagem do gene *ftsK* do endosimbionte no vetor de expressão pGEX-4T

O fragmento de 1480 pb do gene *ftsKe* (codifica a porção C-terminal da FtsK) foi amplificado com os primers ftsK1/ftsK2, digerido com *EcoRI* e *NotI* e ligado ao pGEX-4T, previamente digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo resultante, pGEXftsKe, expressa uma proteína de fusão composta pela GST (Glutathiona-S-Transferase) e a região C-terminal da proteína FtsK do endosimbionte (GST-CtFtsKe) sob controle do  $P_{Tac}$  e *lacI<sup>q</sup>*.

#### 3.4.2.14 Clonagem do gene *minC* do endosimbionte no vetor de expressão pQE30

O gene *minCe* foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores QECF e QECR, o fragmento de 720 pb digerido com *BamHI* e *HindIII*, e clonado no vetor pQE30 (figura 12), previamente digerido com *BamHI* e *HindIII*. Como resultado, obteve-se o plasmídeo, pQEminCe, que expressava a proteína MinCe contendo uma cauda de 6xHis na região amino-terminal, sob controle do  $P_{T5}$ . Para limitar o escape basal da transcrição, o plasmídeo pQEminCe foi co-transformado na mesma cepa com o pREP4, portador do gene *lacI<sup>q</sup>*.

FIGURA 12 - ESQUEMA DO PLASMÍDEO pQE30



[http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Protocols/pQE-30\\_UA.pdf](http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/Protocols/pQE-30_UA.pdf)

#### 3.4.2.15 Clonagem do gene *minD* do endosimbionte no vetor de expressão pQE30

O gene *minDe* foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores QEDF e QEDR, o fragmento de 880 pb foi digerido com *Bam*HI e *Hind*III, e clonado no vetor pQE30, previamente digerido com *Bam*HI e *Hind*III. Como resultado, obteve-se o plasmídeo, pQE<sub>minDe</sub>, que codifica a proteína MinDe contendo uma cauda de 6xHis na região amino-terminal, sob controle do P<sub>T5</sub>. Para limitar o escape basal da transcrição, o plasmídeo pQE<sub>minDe</sub> foi co-transformado na mesma cepa com o pREP4, portador do gene *lacI<sup>q</sup>*.

#### 3.4.2.16 Clonagem do gene *minE* do endosimbionte no vetor de expressão pQE30

O gene *minEe* foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores QEEF e QEER, o fragmento de 255 pb foi digerido com *Bam*HI e *Hind*III, e clonado no vetor pQE30, previamente digerido com *Bam*HI e *Hind*III. Como resultado, obteve-se o plasmídeo, pQE<sub>minEe</sub>, que codifica a proteína MinEe contendo uma cauda de 6xHis na região amino-terminal, sob controle do P<sub>T5</sub>. Para limitar o escape basal da transcrição, o plasmídeo pQE<sub>minEe</sub> foi co-transformado na mesma cepa com o pREP4, portador do gene *lacI<sup>q</sup>*.

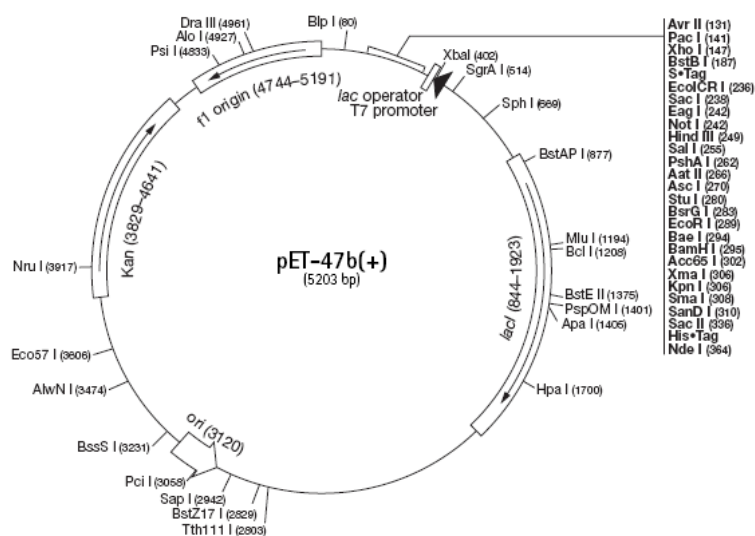
#### 3.4.2.17 Clonagem do gene *zipA* do endosimbionte no vetor de expressão pQE30

O gene *zipAe* foi amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores QEEF e QEER, o fragmento de 944 pb foi digerido com *Bam*HI e *Hind*III, e clonado no vetor pQE30, previamente digerido com *Bam*HI e *Hind*III. Como resultado, obteve-se o plasmídeo, pQEminEe, que codifica a proteína MinEe contendo uma cauda de 6xHis na região amino-terminal, sob controle do P<sub>T5</sub>. Para limitar o escape basal da transcrição, o plasmídeo pQEminEe foi co-transformado na mesma cepa com o pREP4, portador do gene *lacI<sup>q</sup>*.

#### 3.4.2.18 Clonagem do gene *ftsZ* do endosimbionte no vetor de expressão pET47b

O gene *ftsZ* do endosimbionte de *C. deanei* (*ftsZe*) foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico obtido de frações purificadas de simbionte, usando os primers pETZeF e pETZeR. Esses oligonucleotídeos iniciadores contém sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição *Eco*RI e *Sal*I, respectivamente. O fragmento resultante, de 1.160 pb, foi digerido com *Eco*RI e *Sal*I e clonado no vetor pET47b (figura 13), previamente digerido com *Eco*RI e *Sal*I. O plasmídeo resultante, pETftsZe, expressava o *ftsZe* com uma cauda de 6xHis a partir do promotor P<sub>T7</sub>, mediante indução com IPTG (isopropil-tio-galactopiranósido).

FIGURA 13 - ESQUEMA DO PLASMÍDEO pET-47b



<http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB415.pdf>

3.4.2.19 Clonagem do gene da dinamina de *Trypanosoma cruzi* (*Tcdnm*) no vetor de expressão pTEXGFP2.

O gene que codifica a dinamina de *T. cruzi* foi amplificado com os primers dinGFP1/dinGFP2. O fragmento obtido de 1700 pb foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*I e *Cl*I e clonado no vetor pTEXGFP2 digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo pTEXGFP2 foi construído no IBMP a partir do plasmídeo pTEX (KELLY et al., 1992)

O plasmídeo resultante, pTEXGFPTcDnm, codifica uma proteína de fusão composta pela GFP e a dinamina do *T. cruzi*.

### 3.4.3 Ligação dos genes nos vetores de expressão

Os genes foram ligados aos vetores, ambos previamente digeridos com as enzimas de restrição adequadas na relação molar de 3:1 (inserto:plasmídeo) em volume de reação de 10 µl, contendo tampão da enzima T4 DNA ligase e uma unidade da enzima T4 DNA ligase (USB). A reação foi incubada a 16 °C por 18 h. As ligações entre os genes e o vetor foram usadas para transformar a cepa XL-1Blue ou TOP10F' de *E. coli*

#### 3.4.4 Preparação de células cálcio-competentes

Foi utilizado o método do cloreto de cálcio descrito em Sambrook et al. (1989). Assim, uma colônia da cepa XL1blue ou TOP10F' de *E. coli* foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo 12,5 µg/ml de tetraciclina. A cultura foi incubada por 16 horas a 37 °C sob agitação constante. Um ml desta cultura foi transferido para 100 ml de meio LB (inóculo de 1:100) pré-aquecido a 37 °C. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (densidade óptica<sub>600</sub> = 0,5). A cultura foi então centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4 °C e o pellet obtido foi resuspenso em 50 ml (metade do volume original) de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frio e mantido no gelo por 10 minutos. A suspensão foi submetida a uma nova centrifugação de 5.000 x g e as células foram resuspensas em 2,0 ml (1/50 do volume da cultura original) de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frio e mantidas no gelo até a transformação, ou congeladas a -80 °C após adicionar glicerol 20%.

#### 3.4.5 Transformação e seleção dos clones recombinantes

As reações de ligação foram incubadas no gelo por 30 min com 200 µl de bactérias competentes. Após este tempo, a mistura foi incubada a 42 °C durante 2 min (choque térmico) e colocada de novo no gelo. Em seguida, 1 ml de meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram cultivadas a 37 °C por 1 hora antes do plaqueamento. Volumes de 100 e 200 µl da cultura de bactérias transformadas foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB, agar 15%, e antibiótico dependendo do plasmídeo). As placas foram incubadas por 18 horas a 37 °C. Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados mediante a técnica de palitagem ou por PCR de colônia.

#### 3.4.6 Seleção dos clones recombinantes através da técnica da palitagem (toothpick)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de microcentrifuga e para a superfície do meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas (placa-mãe). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µl do tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras

foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, usando o plasmídeo original como controle. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 min e lavado com água ultrapura e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

#### 3.4.7 Preparação dos plasmídeos contendo os produtos de PCR (miniprep)

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 ml de meio LB contendo o antibiótico de resistência e cultivadas por 18 h a 37 °C sob constante agitação. As células obtidas foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do sistema “QIAprep spin miniprep kit” (QIAGEN). Nestas condições, cerca de 5 a 10 µg de DNA dos diferentes plasmídeos foram recuperados para serem utilizados em testes de expressão e complementação.

### 3.5 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Colônias recombinantes foram inoculadas em 2 ml de meio LB com o antibiótico de resistência do plasmídeo e cultivadas durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). Uma alíquota de 200 µl de cada pré-inóculo foi inoculada em 2 tubos contendo 2 ml de meio LB e antibiótico. As culturas foram incubadas por uma hora a 37 °C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 2 mM a uma das culturas (cultura induzida). A cultura sem adição de IPTG (não induzida) serviu de controle negativo da expressão. Ambas as culturas foram incubadas a 37 °C por mais três horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000 x g por 2 min e resuspensas em 500 µl de PBS. A suspensão bacteriana foi lisada por ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co.) por 2 pulsos de 5 segundos em potência 3. Vinte microlitros desses extratos das culturas bacterianas (induzida e não induzida) foram adicionados a 5 µl de Tampão de amostra 4x, sendo em seguida incubados por 5 min a 100 °C. Cada amostra foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida, com SDS (SDS-PAGE), a 28 mA, como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese as proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue R-250 a 65 °C por 30 min



e descoradas com trocas sucessivas de solução de descoloração para géis de proteína, na mesma temperatura.

### 3.6 TESTE DE SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para testar a solubilidade das proteínas recombinantes, as culturas bacterianas foram induzidas como descrito no item 3.4. Após a indução, as bactérias foram coletadas por centrifugação a 7.000 x g por 10 min a 4 °C. Os sedimentos bacterianos foram resuspenso em 3 ml de solução de sonicação contendo 100 µg/µl de lisozima e incubados por 30 min a 4 °C. Foi adicionado PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil) à solução para uma concentração final de 1 mM. A suspensão bacteriana foi lisada por ultrasom, com 3 pulsos de 15 seg (potência 7). Após a lise, o sobrenadante e o sedimento de cada clone testado foram analisados em SDS-PAGE para analisar a solubilidade das proteínas recombinantes.

### 3.7 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE A PARTIR DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO

Esta técnica é utilizada pra proteínas recombinantes insolúveis. Para a purificação de corpúsculos de inclusão, uma colônia recombinante foi inoculada em 3 ml de meio LB + antibiótico de resistência do plasmídeo e cultivada durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). Foram inoculados 2 ml do pré-inóculo em 200 ml de meio LB/antibiótico e as culturas foram incubadas por três horas a 37 °C. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM à cultura. Após a indução, a cultura foi centrifugada a 7.000 x g por 10 min a 4 °C. Os sedimentos bacterianos foram resuspenso em 10 ml de PBS e a lise foi realizada como descrito no item anterior, mas antes se adicionou à suspensão bacteriana lisozima para uma concentração final de 0,5 mg/ml, por 20 min a temperatura ambiente. O lisado foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (*pellet*), contendo as proteínas recombinantes insolúveis na forma de corpúsculos de inclusão, foi resuspenso em 5 ml de uma solução de suspensão de corpúsculo (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M e Triton X-100 2%) para cada 100 ml da cultura original. A solução foi centrifugada por 10 min a 12.000 x g a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se essa lavagem por mais 2 vezes. O material então foi lavado com 10 ml de solução de PBS (retirar o Triton X-100) e centrifugado por 10 min a 12.000 x g a 4 °C. O sedimento formado foi resuspenso em 2 ml de

PBS e adicionou-se PMSF para uma concentração final de 1 mM. A esse material foi adicionado 1 ml de tampão de amostra 4X e purificou-se por eletroforese em gel preparativo de poliacrilamida a 8%, com 15 cm de largura por 10 cm de altura. O gel foi submetido à eletroforese por 16 h a 20 mA. O gel foi corado com solução de KCl 100mM, a banda correspondente foi cortada e eletroeluída por 2 horas a 60V em tampão de SDS-PAGE.

### 3.8 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA FtsZe UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA

A cepa BL21 pLysS foi transformada com o plasmídeo pETftsZe e a produção da proteína recombinante 6xHisFtsZ foi induzida mediante crescimento em LB com Amp, Kana e IPTG 0,5 mM a 30 °C. A proteína recombinante se mostrou solúvel nestas condições, obtendo-se uma quantidade suficiente para a sua purificação por cromatografia de afinidade em resina de níquel-NTA, conforme descrição do fabricante (Qiagen). Brevemente, o extrato induzido foi resuspenso em tampão de ligação (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, Imidazol 5 mM), sonificado e as células não lisadas foram descartadas por centrifugação. O sobrenadante foi incubado com a resina Ni-NTA durante 2h a 4 °C com agitação suave. A fração não retida foi separada da resina por gravidade em coluna. Em seguida a resina foi lavada uma vez com o tampão de ligação e uma vez com o tampão de lavagem (tampão de ligação, contendo imidazol 20 mM). A proteína recombinante foi eluída com tampão de eluição (tampão de ligação, contendo imidazol 100 mM). As alíquotas das frações obtidas foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 13%.

### 3.9 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE (FUSÃO COM GST) UTILIZANDO RESINA GLUTATIONA-SEPHAROSE

#### 3.9.1 Purificação da proteína recombinante GST-FtsKe

A cepa Top10F' pRARE foi transformada com o plasmídeo pGEXFtsKe e a produção da proteína GST-FtsKe foi induzida com IPTG. Um clone recombinante foi cultivado durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). O pré-inóculo foi diluído 1:100 em 200 ml de LB contendo ampicilina e cloranfenicol e incubado a 37 °C com agitação. Ao atingir a absorbância  $A_{600} \sim 0,5$ , IPTG foi adicionado para uma concentração final de 0,5 mM. Após 3 h de indução as células foram recolhidas por centrifugação e resuspenso em 5 ml de PBS 1x contendo PMSF 0,15 mM (inibidor de protease) e lisozima 0,1 mg/ml. A ressuspensão celular foi sonificada mediante 6 pulsos de 5

segundos cada um, com intervalos de 1 minuto, durante o qual as células foram mantidas em gelo. A ruptura das células bacterianas foi verificada por observação em microscópio de contraste de fase. Para eliminar restos celulares e células não lisadas, a suspensão foi centrifugada a 4 °C durante 30 min a 10.000 rpm em microcentrifuga Eppendorf. Ao sobrenadante, contendo a proteína GSTFtsKe a purificar, foi acrescentado Triton X-100 a uma concentração final de 0,2% e 400 µl de resina Glutathione-Sepharose 4B fast flow (Pharmacia), previamente equilibrada em PBS 1x. A mistura foi incubada a 4°C durante 16 h com agitação suave, e a fração não retida foi separada da resina por gravidade em coluna. A resina foi lavada 3 vezes com 10 ml de PBS contendo Triton X-100 a 0,2%, e 3 vezes com 10 ml de PBS. A proteína GST-FtsKe foi eluída em vários passos com um tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e glutatona reduzida 10 mM (tampão Glutationa).

### 3.9.2 Purificação das proteínas recombinantes GST-MinC, GST-MinD, GST-MinDK11A e GST-MinDK16A

O plasmídeos pGECminCe, pGEXminDe, pGEXminDeK11A e pGEXminDeK16A foram usados para transformar a cepa Top10F'. As colônias recombinantes foram inoculadas em 3 ml de meio LB com o antibiótico ampicilina e cultivadas durante 16 h a 37 °C (pré-inóculo). No dia seguinte os pré-inóculos foram diluídos 1:100 em 300 ml de meio LB contendo ampicilina e as culturas foram cultivadas a 30 °C com agitação. Ao atingir a absorbância  $A_{600} \sim 0,4$  foi adicionado IPTG a uma concentração final de 0,5 mM. Em seguida a temperatura do agitador foi diminuída para 25 °C. Após indução por 16 h, as células foram recolhidas por centrifugação e resuspensas em 5 ml de PBS 1x contendo PMSF 0,15 mM e lizozima 0,1 mg/ml. A resuspensão de células foi sonicada mediante 6 pulsos de 5 segundos cada um, com intervalos de 1 minuto, durante o qual as células foram mantidas em gelo. A ruptura das células bacterianas foi verificada por observação em microscópio de contraste de fase. Para eliminar restos celulares e células não lisadas, a suspensão foi centrifugada a 4 °C durante 30 min a 10.000 rpm em microcentrifuga Eppendorf. Ao sobrenadante (contendo a proteína GSTFtsKe a purificar) foi acrescentado Triton X-100 a uma concentração final de 0,2% e 400 µl de resina Glutathione-Sepharose 4B fast flow (Pharmacia), previamente equilibrada em PBS 1x. A mistura foi incubada a 4 °C durante 16 h com agitação suave, e a fração não retida foi separada da resina por gravidade em coluna. A resina foi lavada

3 vezes com 10 ml de PBS contendo Triton X-100 0,2%, e 3 vezes com 10 ml de PBS. A proteína GST-FtsKe foi eluída em várias alíquotas com um tampão contendo Tris-HCl 50 mM pH 8 e glutatona reduzida a 10 mM (tampão Glutaciona).

### 3.10 PURIFICAÇÃO DE FtsZ DE *Escherichia coli*

Uma cultura da cepa BL21 pLysS pETftsZec foi incubada em 3 ml de LB+Cm+Ap a 30 °C por 16 horas. Em seguida fez-se uma diluição 1/100 em 250 ml de LB +Cm+Ap a 30 °C. Quando a cultura atingiu DO600 ~ 0,4-0,5, acrescentou-se IPTG para uma concentração final de 0,5 mM e fez-se uma indução por 3 horas a 30 °C. Em seguida centrifugou-se a cultura e o sedimento obtido foi resuspenso em 4 ml de PEM (50 mM Pipes pH 6,5, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA) + PMSF 0,15 mM. Esse material foi sonicado com 4 pulsos de 10 segundos na potência 7 e centrifugou-se o material sonicado por 30 minutos a 13000 rpm a 4 °C. Ao sobrenadante adicionou-se CaCl<sub>2</sub> (concentração final 20 mM) e GTP (concentração final 1 mM), incubou-se por 15 min a 30 °C e centrifugou-se por 15 min a 20.800 x g a 4 °C (FtsZ polimeriza e precipita). Resuspendeu-se o sedimento em 4 ml de tampão de ligação (20 mM TrisHCl pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol). Esse material foi centrifugado por 5 min a 20.800 x g a 4 °C e descartou-se o sedimento (material insolúvel). O sobrenadante foi incubado por 16 horas a 4 °C com a resina de Níquel-NTA (500 µl, previamente lavada com tampão de ligação). Após incubação, o material foi passado por uma coluna e recolheu-se o material não ligado. A resina retida foi lavada com 10 ml de tampão de ligação (5 mM de imidazol) e em seguida com 10 ml de tampão de lavagem (20 mM de imidazol). Eluiu-se então o material com 1 ml de tampão de eluição (imidazol 100 mM), sendo este passo repetido mais 3 vezes, obtendo-se ao final 4 eluatos.

### 3.11 OBTENÇÃO DE ANTISORO POLICLONAL CONTRA AS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas recombinantes (solúveis ou insolúveis) purificadas foram inoculadas em camundongos da linhagem BALBc, por via sub-cutânea, com 5 aplicações de aproximadamente 50 µg de antígeno em intervalos de 15 dias, seguindo-se obtenção do soro 1 semana após a última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund na primeira inoculação, e em adjuvante incompleto nas inoculações subseqüentes.

### 3.12 ENSAIO DE POLIMERIZAÇÃO DE FtsZe

#### 3.12.1 Método 1

Uma cultura da cepa BL21 pLysS pETftsZe foi incubada em 3 ml de LB+Cm+Ap a 30 °C por 16 horas. Em seguida fez-se uma diluição 1/100 em 250 ml de LB+Cm+Ap a 30 °C. Quando a cultura atingiu  $DO_{600} \sim 0,4-0,5$ , acrescentou-se IPTG para uma concentração final de 0,5 mM e fez-se uma indução por 3 horas a 30 °C. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 6.000 x g e o sedimento obtido foi resuspenso em 4 ml de PEM (50 mM Pipes pH 6,5, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA) + PMSF 0,15mM. Esse material foi sonicado com 4 pulsos de 10 segundos na potência 7. O material sonicado foi centrifugado por 30 minutos a 12000 x g a 4 °C. Ao sobrenadante adicionou-se  $CaCl_2$  (concentração final 20 mM) e GTP (final 1 mM), incubou-se por 15 min a 30 °C e centrifugou-se por 15 min a 20.800 x g a 4 °C (FtsZ polimeriza e precipita). Ao sobrenadante obtido deu-se o nome de material “não polimerizado”. Ressuspendeu-se o pellet em 4 ml de tampão de ligação (20 mM TrisCl pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol). Esse material foi centrifugado por 5 min a 20.800 x g a 4 °C. Ao sedimento obtido deu-se o nome de “polimerizado insolúvel” e ao sobrenadante “polimerizado solúvel”. Essas três frações foram aplicadas em gel SDS-PAGE e analisadas na presença de FtsZe por Western blot utilizando-se anti-histidina.

#### 3.12.2 Método 2

Diluiu-se a FtsZe, purificada por cromatografia de afinidade (resina de níquel), em tampão PEM (50 mM Pipes pH 6,5, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA) a uma concentração de 1 mg/ml. Adicionou-se  $Mg^{+2}$  a uma concentração final de 10 mM e imediatamente adicionou GTP (concentração final de 1 mM). Com auxílio de um espectrofotômetro mediu-se a absorbância a 360nm. Em aproximadamente um minuto a absorbância alcança um valor máximo e se mantém estável por 10-15 minutos. O controle foi feito sem a adição de GTP.

### 3.13 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS MinC e MinD EM EXTRATOS PROTÉICOS DE ENDOSIMBIONTE USANDO WESTERN BLOT

A técnica de Western blot consiste na transferência de proteínas, previamente separadas por SDS-PAGE para um suporte sólido (membrana de nitrocelulose).

Foram repetidos os mesmos passos do teste de solubilidade da proteína, desde a indução até a eletroforese em gel de poliacrilamida. O procedimento a seguir foi executado segundo o método de Towbin et al. (1979). Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. A transferência foi realizada a 28 mA a 4 °C por 16 h. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%) para verificar a qualidade da transferência e posteriormente foi descorada com TBS/Tween (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 0,05%) e incubada em solução de bloqueio (leite desnatado a 5% em TBS/Tween) por 16 h. No dia seguinte a membrana foi transferida para 3 ml de solução de bloqueio contendo o anticorpo primário (os antisoros utilizados foram aqueles produzidos em camundongos contra as proteínas GST-MinCe, GST-MinDe e GST-ZipAe, na diluição 1:250). A membrana foi incubada nessa condição por 1 hora e em seguida lavada 3 vezes (5 min) com aproximadamente 50 ml de TBS/Tween. Cerca de 3 ml da solução contendo o anticorpo secundário (policlonal) anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluído 1:7.500, foram adicionados à membrana e incubou-se por 45 min. A membrana foi lavada novamente por 3 vezes (5 min) com aproximadamente 50 ml de solução TBS/Tween. Para revelar a reação, foram utilizados 66 µl de NBT (cromógeno) e 33 µl de BCIP (substrato), diluídos em 10 ml de tampão para a fosfatase alcalina.

### 3.14 PROCEDIMENTO DE TRANSFEÇÃO

Cepas normais de *B. culicis* e *C. deanei* na fase logaritmica foram lavadas uma vez com PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco™, Invitrogen Corporation) e resuspensas a  $5 \times 10^8$  células/ml em tampão de eletroporação (NaCl 140 mM, HEPES 25 mM e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,74 mM, pH 7,5). Em um volume de 400 µl das células resuspensas foram adicionados 50 µg do plasmídeo pTEXGFPTcDnm e manteve-se por 10 min em gelo. As células foram eletroporadas utilizando-se o aparelho Gene Pulser® II Apparatus (Bio-Rad) a nas condições estabelecidas de 450 V e 500 µF. Dois pulsos foram utilizados para transfeção e após a eletroporação as células foram mantidas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida essas células foram inoculadas em 10 ml de meio de crescimento (meio Warren acrescido de 10% de soro fetal bovino, 10.000 U penicilina e 100 µg/ml estreptomicina). Após 24 h o

antibiótico G418 (Geneticin - Sigma<sup>®</sup>), a uma concentração final de 350 µg/ml, foi adicionado para selecionar a população transfectada. As células foram cultivadas por 3 dias e após esse tempo foram diluídas (1:10) em meio de cultura contendo G418. Esse procedimento foi realizado até a seleção da população resistente. Essa população selecionada foi utilizada para posterior análise por microscopia de fluorescência.

### 3.15 ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO

Para verificar se os genes *minCDEe* são capazes de substituir os genes próprios de *E. coli* na função de regulação da localização do septo, usou-se a cepa PB114 ( $\Delta minCDE::kan$ ), portadora de uma deleção total do operon *minCDE* e gentilmente cedida pelo Dr. Piet de Boer (Ohio, USA). Como consequência da deleção, essa cepa não é capaz de regular corretamente a posição do septo, mostrando células de longitude normal e filamentos curtos e também mini-células (células carentes de DNA, produto da formação errônea do septo em um pólo). PB114 foi transformada com o plasmídeo pJFminCDEe, portador dos genes *minCDEe* sob controle do P<sub>Tac</sub> e *lacI<sup>q</sup>* e plaqueada a 37 °C em LB-agar contendo ampicilina, kanamicina e glicose 0,2%. Como controle positivo ou negativo, a mesma cepa foi transformada em paralelo com o plasmídeo pJFminCDEEc (portador dos genes *minCDE* da *E. coli* sob controle do P<sub>Tac</sub> e *lacI<sup>q</sup>*) ou com o vetor vazio pJF119EH, respectivamente. As colônias assim obtidas foram cultivadas em meio líquido contendo ampicilina em presença ou ausência do indutor IPTG, e visualizadas no microscópio de contraste de fase. Cumpre ressaltar que só foi possível transformar a cepa PB114 com os plasmídeos pJFminCDEe ou pJFminCDEEc, mas não com os plasmídeos pJFminC ou pJFminCD, o que sugere que, a expressão mesmo basal dos genes *minC* e *minD* do endosimbionte é letal em uma cepa de *E. coli* que carece do operon *minCDE*.

Utilizando o pJF119EH para esse estudo não obtivemos um resultado satisfatório. Para se ter um resultado mais acurado, clonamos os genes *minCDEe* e *minCDEEc* no vetor pBAD22. Esse vetor é mais bem regulado pela utilização do promotor induzido por arabinose, resultando em um menor escape, já que a estequiometria é de extrema importância no sistema Min. O protocolo segue o descrito anteriormente, porém induziu-se as células transformadas com 0,0002% de arabinose.

### 3.16 ENSAIO DE ATIVIDADE ATPase DE MinD e FtsK DO ENDOSIMBIONTE

A hidrólise de ATP foi medida usando a técnica do verde de Malaquita, um ensaio colorimétrico que detecta a produção de fosfato inorgânico (LANZETTA et al., 1979; HOENIG et al., 1989). As proteínas recombinantes GST-MinDe e GST-FtsKe expressas a partir do pGEXminDe e pGEXftsKe, respectivamente, foram incubadas em 50 µl de tampão ATPase (50 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glicerol) durante uma hora a 28 °C com concentrações crescentes de ATP. A reação foi interrompida mediante adição de 200 µl de reativo de verde de Malaquita (2 volumes de verde de Malaquita 0.0812%, 2 volumes de água MilliQ, 1 volume de molibdato de amônia 5,72% preparado em HCl 6 M e 1 volume de Polivinil Alcohol 2.32%). Após dois minutos foram adicionados 25 µl de citrato de sódio 34% para parar a produção de cor. A absorbância das amostras foi medida a 630 nm usando um espectrofotômetro STAT FAX 2100. Os valores obtidos de amostras controle, contendo apenas GTP nas mesmas condições, foram subtraídos dos valores obtidos para as amostras teste. Os valores obtidos de amostras controle contendo apenas a proteína sem ATP também foram subtraídos. Para a quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado enzimaticamente, as amostras foram comparadas com uma curva padrão preparada com diluições de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 500 µM em tampão ATPase. Para determinar as constantes V<sub>max</sub> e K<sub>m</sub>, os dados foram ajustados à equação de Michaelis-Menten, usando regressão não-linear (GraphPad Prism version 4.00 para Windows, GraphPad software, Inc).

### 3.17 IMUNOLocalização POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Para os ensaios de imunofluorescência, *C. deanei* e *B. culicis* foram cultivadas em meio Warren acrescido de 10% de soro fetal bovino até a concentração de 1x10<sup>7</sup> células/ml. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 min, lavadas em PBS pH 7,2 e novamente coletadas por centrifugação nas mesmas condições descritas acima. As células foram então resuspensas em uma concentração final de 5x10<sup>6</sup> células/ml e depositadas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina 0,01% diluída em PBS. O material foi fixado em paraformaldeído a 2% diluído em PBS durante 5 min. A fixação foi interrompida por duas lavagens com glicina 0,1 M por 3 min. As lamínulas foram então lavadas duas



vezes com PBS durante 5 min e incubadas com Triton X-100 0,08% diluído em PBS por 2 min a temperatura ambiente. As lamínulas foram novamente lavadas por duas vezes com PBS durante 5 min, incubadas em tampão de bloqueio por 16 horas e em seguida incubadas por 1 hora com o antisoro policlonal correspondente diluído 1:50 em tampão de bloqueio. Posteriormente as lamínulas foram lavadas 3 vezes por 5 min com PBS e incubadas por 30 min com anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 488 (Sigma), diluído 1:400 em tampão de bloqueio. Após este tempo, as lamínulas foram incubadas com iodeto de propídio 0,1  $\mu\text{g/ml}$  em PBS por 5 min, lavadas três vezes em PBS por 5 min e montadas com n-propil-galato sobre uma lâmina de microscopia ótica. As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600. Imagens digitais foram capturadas usando-se a câmara CoolSnap (Media Cybernetics).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### O GENE *zipA* ESTÁ PRESENTE NO GENOMA DO ENDOSIMBIONTE

#### 4.1 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *zipAe*

A análise do sequenciamento do genoma do endosimbionte de *C. deanei* realizado no IBMP mostrou que a proteína FtsA não está codificada no genoma do endosimbionte. Essa proteína é importante para formação do anel Z, pois interage com FtsZ e ancora o complexo na membrana da bactéria, para o posterior recrutamento das demais proteínas do complexo. Assim, trabalhamos com a possibilidade de que ZipA, outra proteína de membrana que se liga ao anel Z nas etapas iniciais da divisão, fornecendo estabilidade ao anel Z, pudesse ser capaz de realizar a função correspondente à da FtsA no endosimbionte. Segundo Pichoff & Lutkenhaus (2002), tanto FtsA como ZipA podem estabilizar o anel Z, levando adiante a divisão. De fato, o anel Z pode se formar em mutantes de *E. coli* que carecem de *ftsA* ou *zipA*, mas não em mutantes que carecem de ambos os genes. ZipA também é importante para a localização de FtsK no septo (PICHOFF & LUTKENHAUS, 2002). Para obter informação nesse sentido, identificamos o gene *zipA* no genoma do endosimbionte de *C. Deanei*, que possui uma região codificante de 944 pb e codifica uma proteína de com massa molecular de 36,2 kDa. Esta proteína apresenta grande similaridade com uma proteína de membrana de *Bordetella parapertussis* (E value=  $4e^{-19}$ , 26% de identidade), que por sua vez mostra consistente homologia com várias proteínas ZipA de outras bactérias. O alinhamento da seqüência de aminoácidos entre as proteínas ZipA do endosimbionte (ZipAe) e da *Bordetella* sp. é mostrado na figura 14. A maior similaridade é evidenciada no domínio carboxi-terminal, responsável pela interação com FtsZ (MOSYAK et al., 2000). Todavia, o fragmento transmembrânico, normalmente presente ao amino-terminal, não foi identificado nessa região na seqüência da ZipAe. Usando o programa PHDhtm (ROST et al., 1996), foi possível identificar um possível fragmento transmembrânico na ZipAe, que compreende os resíduos 172 até 195. O programa Tm Pred por sua vez, prediz um possível fragmento transmembrânico entre os resíduos 189 e 206 (Figura 15). Esses dados, no entanto, resultaram com baixa confiabilidade, e precisam ser confirmados experimentalmente.

FIGURA 14 - ALINHAMENTO DA PROTEÍNA ZIPA DO ENDOSIMBIONTE COM A DO CORRESPONDENTE HOMÓLOGO DE *Bordetella papapertussis*

```

ZipAe      -----MNYNFLQSIKDIINNIKLMNTNVNNSKDISHISDRIEPVIS
ZipABorpar MSDLQIGLIAIGVLLILLVLFNWWQDRRVRRRMQAHFPSTEQDPLLG
Cons      :  . . *  :  :  *  . * . .  :  . *  .  : * : : .

ZipAe      ASA-----SILSEDYNNYYSNIDNEIEF
ZipABorpar AGAQDRTAAGATRREPGMGAAAGAAPAAAPANPDTDDQEEPDPACEV
Cons      * . *  :  :  :  :  :  *  *

ZipAe      SIDIIFDLPVLGIDIKKILTVNHE---EEIRYLVESTDKIKQIDISDN
ZipABorpar VIEIHFSEEPVREGADLLPYLQSLRQAGREKPLRVFAATAEQRRHRIHSE
Cons      * * * . * * * * . *  :  :  :  *  :  :  :  :  *  :  :

ZipAe      NEYSLLKMLVLLANRAGPISESFPFNEYQLAKDITSHINATIICPDYN
ZipABorpar ESYANMQLAVLLANREGPLTAIEWSQAWARAQDLADRFEASVEGPDQQ
Cons      :  * *  :  :  * * * * * * * * *  :  :  :  :  * * * * * * * * *  :  :  :  :  * *  :

ZipAe      FIIDKAICLDELCSLDSCISLHLMNKELDNQMLLSIANIPGFIYS-
ZipABorpar EVLEQAARLDDTCAALDTQVGLTLLLGVAQPAAEVLAVARDLGFPAADG
Cons      :  :  :  *  * *  *  * * * *  :  :  *  * * *  :  :  :  * * * *  :  :  :

ZipAe      YKDALLLDNSEYYIILSRENNYSLQDFVKIGDVISPTLDIPFSNSDKN
ZipABorpar ARLAWLADNGAVRPTLSRADGAAPDAGMGGIERLYLLLDVFCSPADQR
Cons      :  *  * * * .  :  * * * * * * * * *  :  :  :  :  :  :  :  * * * *  :  :  :

ZipAe      LPYIIFPSFIKEISEYIDAKIVDENGIELSEFDNINAIELQVQKILNGL
ZipABorpar APGEMVDVGRDLAARLRAELVDDQGEPLQDGADAVIDERLQVLFEOLE
Cons      *  :  :  :  :  :  :  :  * * * * * * * *  :  :  :  :  *  :  :  :  :  :  * * * * *

ZipAe      NNGFKAGSYRARRVFK
ZipABorpar QAGLPAGSARAQPVFA
Cons      :  *  * * * * * * * *

```

FIGURA 15 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO GENE *zipA* DO ENDOSIMBIONTE DE *Crithidia deanei* E A CORRESPONDENTE SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA PROTEÍNA

A)

ATGAATTATAACTTTTACAATCTATAAAAGATATTATTAATAATATAAAAATTAATGACTAATGTAAATAAATTCAAAAGATA  
TTAGTCATATTTCTGATCGTATTGAACCAGTTATTTCCGCATCTGCTTCTATTTTGAGTGAAGATTATAACAATTATTATTC  
TAATATTGATAATGAAATTGAATTTCAATAGATATTTATTTTCGATTTGCCAGTTTGGGTATTGATATTAAGAAAATATTA  
ACTGTTAATCATGAAGAAGAGATAAGATATTTGGTAGAGTCAACAGATAAAATAAAGCAGATAGATATTTCTGATAATAATT  
CTTACAGTTTGTAAAAATGCTAGTTTACTAGCAAATAGAGCAGGACCTATAAGTGAGTCAAGATTTTCAATTCATATCA  
ATTAGCTAAAGATATAACATCACATATTAATGCTACTATCATATGTCCTGATTATAATTTTATTATTGACAAAGCTATTTGT  
TTAGATAGGCTATGTATGTCTTTAGATTCTTGTATTAGTTTGCATTTAATTATGAACAAGAAATTAGATAATGGGATGTAT  
TAAGTATTGCTAATATATTCCGATTATATATTCATATAAAGATGCTTTATTATTGGATAATAGTGAATATTACATTATCTT  
ATCTCGAAGTAATAATTATTCATTACAAGATTTTGTAAAAATAGGAGATGTAATTAGTTTACATTAGATATTCCTCGTTCT  
AATCTGATAAAAAATTTGTTTTATATTTTTTTTAGTTTATAAAGGAAATCTCAGAATATATAGATGCTAAAAATAGTTGATA  
AAAATGGTATTGAGTTATCTTTTGATAATATAAATGCAATAGAATTACAAGTGCAAAAAATTTTGAATTCTTTAGAAAATAA  
TGGTTTTAAAGCTGGTAGCTATCGTGCAAGAAGAGTTTTTAA

B)

M N Y N F L Q S I K D I I N N I K L M T N V N N S K D I S H I S D R I E P  
V I S A S A S I L S E D Y N N Y Y S N I D N E I E F S I D I I F D L P V L  
G I D I K K I L T V N H E E E I R Y L V E S T D K I K Q I D I S D N N S Y  
S L L K M L V L L A N R A G P I S E S R F F N S Y Q L A K D I T S H I N A  
T I I C P D Y N F I I D K A I C L D R L C M S L D S C I S L H L I M N K K  
L D N G M L L S I A N I F G F I Y S Y K D A L L L D N S E Y Y I I L S R S  
N N Y S L Q D F V K I G D V I S F T L D I P R S N S D K N L F Y I F F S F  
I K E I S E Y I D A K I V D K N G I E L S F D N I N A I E L Q V Q K I L N  
S L E N N G F K A G S Y R A R R V F K

Seqüência de nucleotídeos do gene *zipA* do endosimbionte de *C. deanei* (A) e a correspondente seqüência de aminoácidos da proteína (B). Os prováveis fragmentos transmembrana segundo os programas PHDhtm ou Tm Pred estão ressaltados em amarelo ou fucsia, respectivamente.

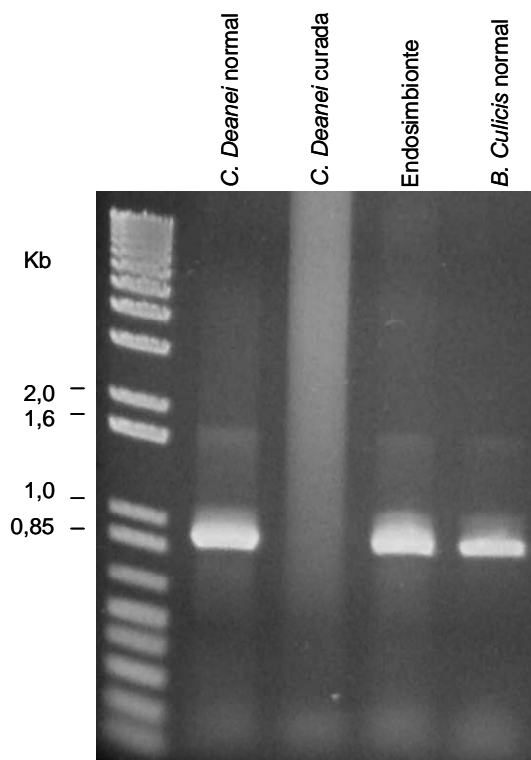
Vale ressaltar que a região genômica flanqueando o gene *zipA* acha-se conservada no endosimbionte em relação às outras bactérias, tais como *Bordetella* sp. e *E. coli*, onde *zipA* se localiza a jusante do gene *ligA* (que codifica para uma DNA ligase) (figura 16). Portanto, certa sintonia ainda é mantida.

FIGURA 16 – ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE *zipA* NO ENDOSIMBIONTE



Para verificar se o gene *zipAe* pertence efetivamente ao genoma da bactéria, não ocorrendo transferência para o genoma da *C. deanei*, realizamos amplificação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene *zipAe* do endosimbionte de *C. deanei*, usando como molde DNA genômico de cepas de *C. deanei* normal e aposimbiótica, do endosimbionte e de cepa de *B. culicis* normal.

FIGURA 17 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *zipA* DO ENDOSIMBIONTE



Amplificação por PCR do gene *zipA* a partir de DNA total de cepas de *C. deanei* normal, aposimbiótica, DNA genômico de frações purificadas de simbiote e cepa de *B. culicis* normal.

O resultado obtido (figura 17), indica que o gene *zipAe* encontra-se codificado no genoma do simbiote, dado que a partir da cepa aposimbiótica de *C.*

*deanei* não se amplificou fragmento algum. Também houve amplificação utilizando-se o DNA de *B. culicis* normal.

## **A PROTEÍNA ZipA DO ENDOSIMBIONTE É CAPAZ DE FILAMENTAR *Escherichia coli***

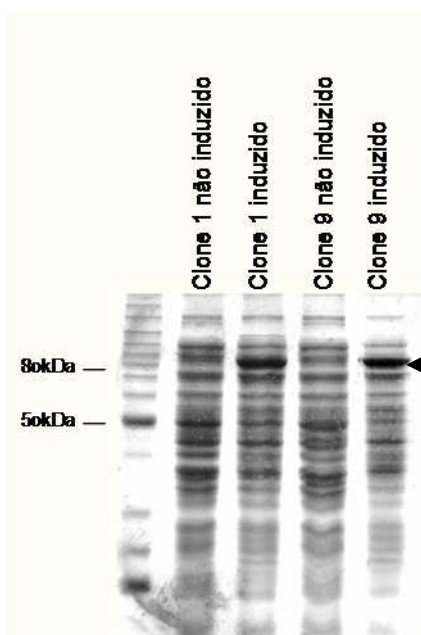
### 4.1.1 Análise de superexpressão de *zipAe* em *Escherichia coli*

O efeito da sobre-expressão do gene *zipAe* no fenótipo de *E. coli* foi analisado em clones bacterianos contendo o plasmídeo recombinante pJFzipAe, onde o gene *zipAe* foi inserido no vetor pJF119EH. Nesse sistema de expressão bacteriano a proteína recombinante ZipAe é produzida na sua forma nativa, sem qualquer etiqueta (*tag*). No entanto, nenhuma alteração fenotípica foi verificada. Os dados da literatura mostram, contudo, que a sobre-expressão do gene *zipA* leva a célula ao processo de filamentação (HALE & DE BOER, 1997).

A segunda estratégia foi inserir o gene *zipAe* no no vetor pGFPXa, com o objetivo de se ter uma maior expressão e aumentar a solubilidade da proteína ZipAe, já que a fusão com a proteína GFP aumenta a solubilidade da proteína a ela fusionada. Nesse sistema ZipAe foi fusionada à extremidade C-terminal da GFP.

A expressão da proteína recombinante está representada na figura 18.

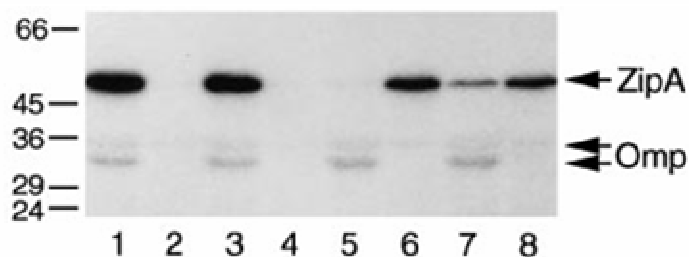
FIGURA 18 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE GFP-ZipAe EM *E. coli* POR SDS-PAGE



Gel desnaturante de poliacrilamida 12% corado com azul de coomassie, mostrando o perfil eletroforético dos extratos dos clones recombinantes 1 e 9. A indução foi feita com IPTG 2mM.

Nos dois clones obtidos pode-se perceber a produção de uma proteína recombinante de aproximadamente 80 kDa, diferente da massa molecular esperada de 63 kDa para o polipeptídeo resultante da fusão da GFP (28 kDa) com a ZipAe (35 kDa). No entanto, Hale & de Boer (1997) relataram uma migração aberrante da proteína ZipA de *E. coli* em gel SDS-PAGE. Os autores esperavam encontrar uma proteína de 36,4 kDa, mas caracterizaram a ZipA como uma proteína de 50 kDa, como se pode notar pela figura 19.

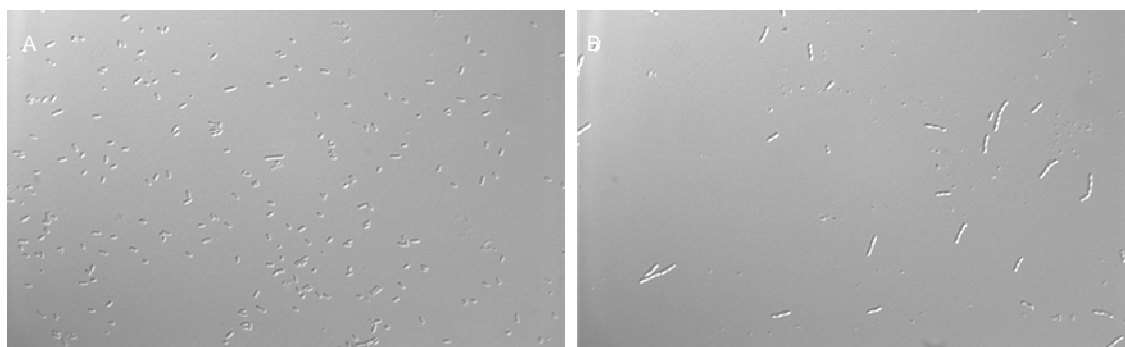
FIGURA 19 – PADRÃO MIGRATÓRIO DE ZipA DE *Escherichia coli* EM GEL SDS-PAGE



Fonte: Hale & de Boer (1997)

Então, considerando-se a hipótese que a ZipAe tenha o mesmo comportamento aberrante em SDS-PAGE que a ZipA de *E. coli*, é plausível que esta proteína recombinante de aproximadamente 80 kDa, que encontramos em extratos bacterianos induzidos possa ser a proteína de fusão GFP-ZipA (28 kDa + 50 kDa). Além disso, como consequência da expressão dessa proteína recombinante de 80 kDa, as bactérias apresentavam o esperado fenótipo de filamentação (Figura 20).

FIGURA 20 - SUPEREXPRESSÃO DE GFP-ZipAe EM *E. coli* (CEPA TOP10F') – ANÁLISE FENOTÍPICA

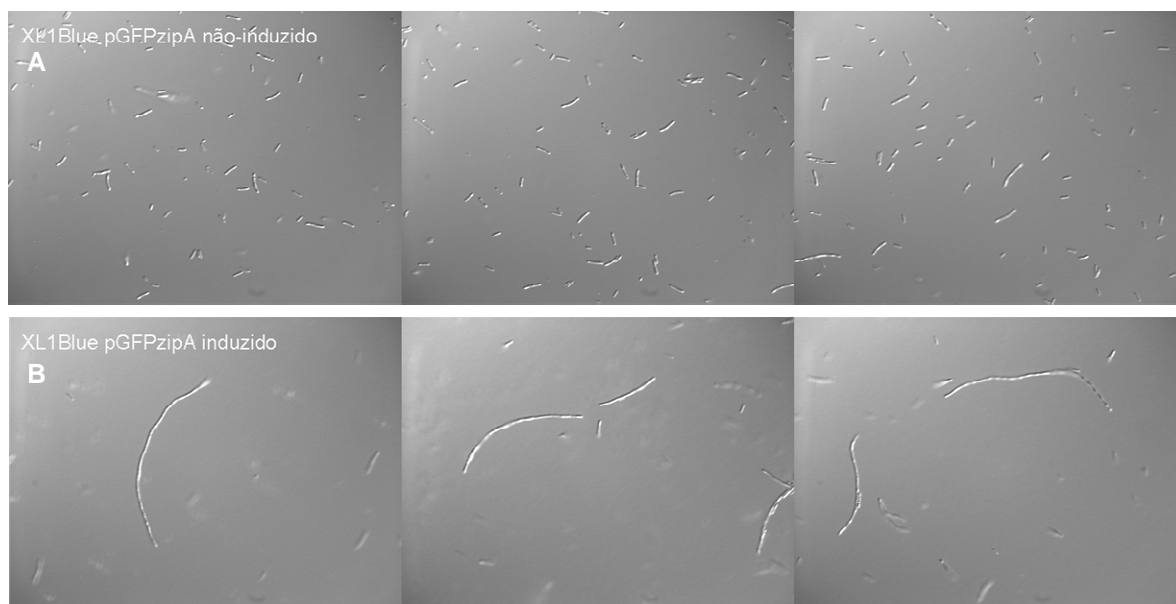


Fenótipo causado pela superexpressão de *zipAe* em *E. coli* Top10F' transformada com pGFPzipAe. A) Top10F' pGFPzipAe não induzido. B) Top10F' pGFPzipAe induzido com IPTG 2mM. As células foram fixadas e fotografadas usando um microscópio Nikon E600.

O fenótipo de filamentação foi ainda mais evidente quando a expressão da proteína GFP-ZipAe se deu na cepa XL1-Blue de *E. coli* (figura 21).



FIGURA 21 – SUPEREXPRESSÃO DE GFP-ZipAe EM *E. coli* (CEPA TOP10F') – ANÁLISE FENOTÍPICA USANDO MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE E DE FLUORESCÊNCIA



Fenótipo causado pela superexpressão de *zipAe* em *E. coli* XL1Blue transformada com pGFPzipAe. A) XL1Blue pGFPzipAe não induzido. B) XL1Blue pGFPzipAe induzido com IPTG 2mM. As células foram fixadas e fotografadas usando um microscópio Nikon E600.

## O GENE *ftsK* ESTÁ PRESENTE NO GENOMA DO ENDOSIMBIONTE

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *ftsK*

FtsK é uma proteína essencial para a viabilidade em *E. coli*, integrante do divisoma e responsável pela coordenação entre a constrição do anel septal e a segregação dos cromossomos (BEGG et al., 1995). Neste trabalho os autores analisaram a divisão celular de uma cepa mutante TOE44 termosensível. O cultivo dessa cepa mutante a 42 °C levou à inibição da divisão da bactéria. Contudo, essa inibição ocorreu em um estágio mais tardio do processo. A mutação que gerou esse fenótipo estava presente no gene denominado de *ftsK*. A proteína FtsK possui similaridade com a proteína SpoIIIE de *Bacillus subtilis*, a qual é requerida no processo final da constrição do septo durante esporulação e é responsável pela transferência do cromossomo da célula-mãe ao pré-esporo (WU & ERRINGTON, 1994; WU et al., 1995). FtsK é uma proteína bifuncional, com um domínio N-terminal contendo quatro fragmentos transmembrânicos e um domínio C-terminal citosólico com atividade ATPase. O domínio N-terminal é essencial para a localização da proteína no anel septal, enquanto que o domínio C-terminal participa na segregação

dos cromossomos mediante sua atividade DNA-translocase e a ativação da Topoisomerase IV e do complexo XerCD (que levam a cabo a decatenação dos cromossomos) (DRAPER et al., 1998; YU et al., 1998; LIU et al., 1998; AUSSEL et al., 2002; ESPELI et al., 2003).

A análise de busca de homologia nas seqüências de aminoácidos dos clones da biblioteca genômica do simbionte nos permitiu identificar o gene *ftsK*. A maior homologia encontrada foi com a FtsK de *Bordetella* (E value=0.0, 60% de identidade). As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos são mostradas na figura 22A. Foi anotado um códon GTT (valina) como início da tradução, porque não há presença de um ATG na posição apropriada.

## FIGURA 22 - SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO GENE *ftsK* DO ENDOSIMBIONTE DE *Crithidia deanei* E A CORRESPONDENTE SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DA PROTEÍNA

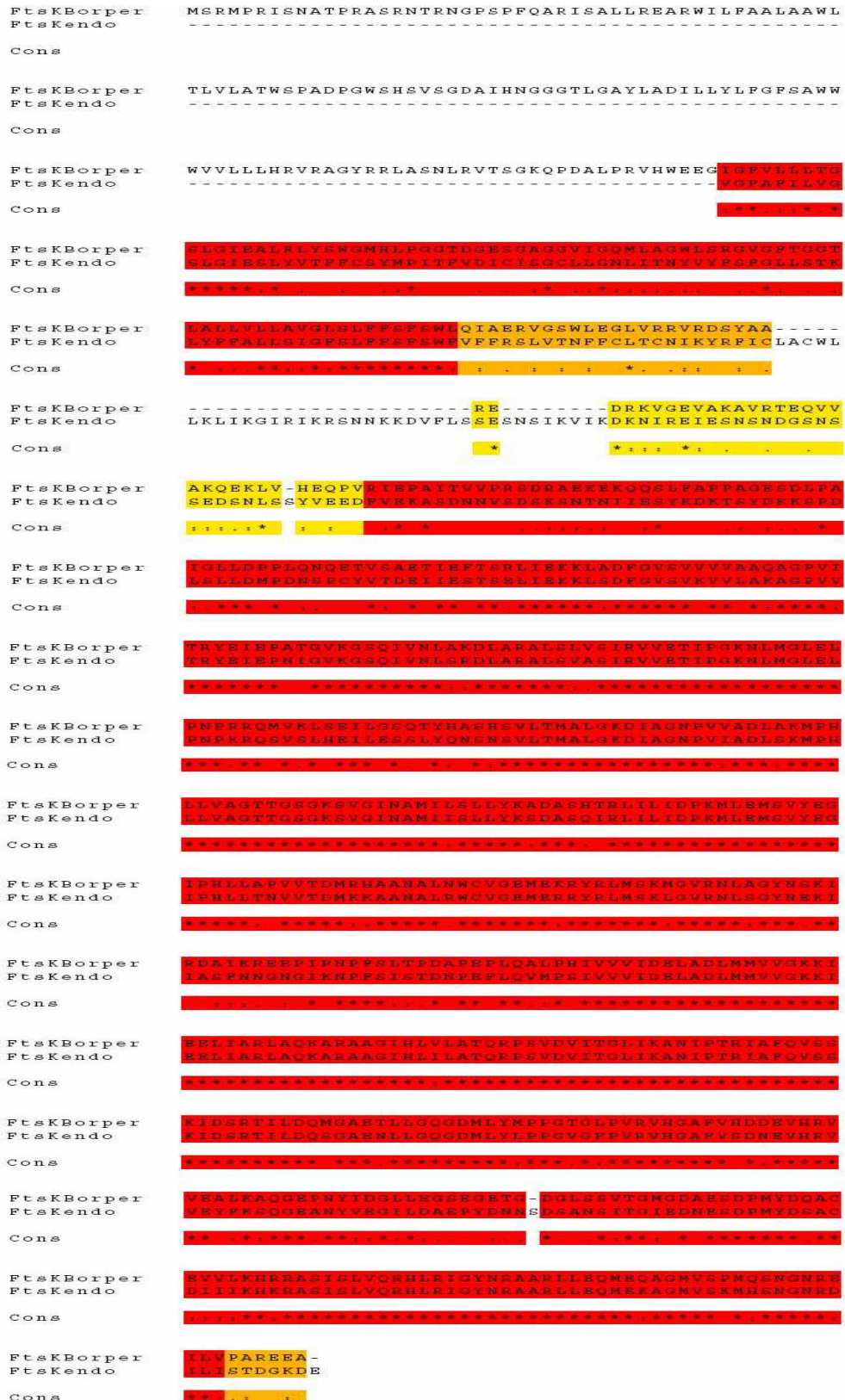


LEGENDA: Sequencia de nucleotídeos do gene *ftsK* do endosimbionte de *C. deanei* (A) e a correspondente seqüência de aminoácidos da proteína (B). Em fucsia se assinalam os prováveis fragmentos Tm segundo o programa Tm Pred. Em vermelho o domínio P-Loop, responsável pela atividade ATPásica.

Utilizando diversos programas de análise, foram identificados 3 ou 4 possíveis fragmentos transmembranários, localizados na região amino-terminal da proteína. Em vermelho está representado o domínio responsável pela atividade de ATPase ([AG]-x(4)-G-K-[ST]), estando, então, totalmente conservado (figura 22B).

A proteína resultante é um pouco menor que a homóloga de *B. pertussis* (tem 691 aa em comparação com os 789 aa de *Bordetella*), mas a seqüência está bastante conservada, sobretudo no domínio C-terminal (Figura 23).

FIGURA 23 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA FtsK DO ENDOSIMBIONTE COM A DO CORRESPONDENTE HOMÓLOGO DE *Bordetella sp.*



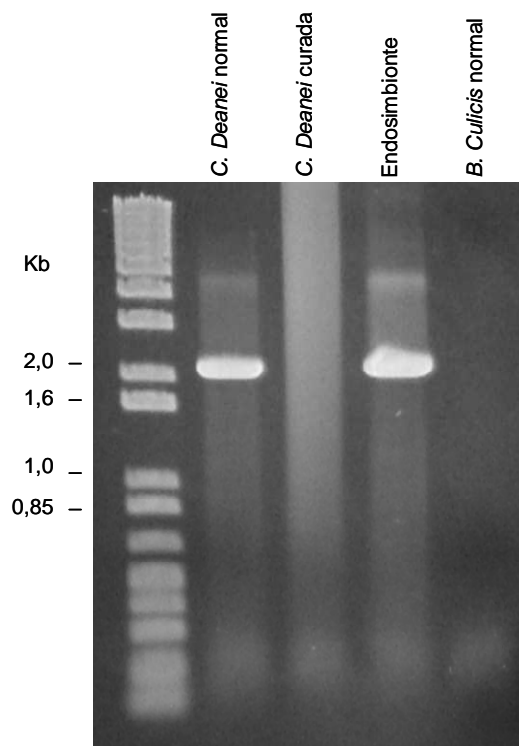
Vale a pena notar que a posição do locus do gene *ftsK* no genoma do simbionte está conservado em relação ao locus do gene *ftsK* das bactérias do gênero *Bordetella*, onde *ftsK* encontra-se adjacente ao gene *trxB* (figura 24).

FIGURA 24 – ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DO GENE *ftsK* NO ENDOSIMBIONTE



A figura 25 mostra que o gene *ftsKe* está presente no genoma do endosimbionte e que os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para o endosimbionte de *C. deanei* não foram capazes de amplificar o gene do endosimbionte de *B. culicis*.

FIGURA 25 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *ftsK* DO ENDOSIMBIONTE



Legenda: Amplificação por PCR do gene *ftsK* a partir de DNA total de cepas de *C. deanei* normal e aposimbiótica, DNA genômico de frações purificadas de simbionte e cepa de *B. culicis* normal.

## A PROTEÍNA FtsKe RECOMBINANTE POSSUI ATIVIDADE ATPásica

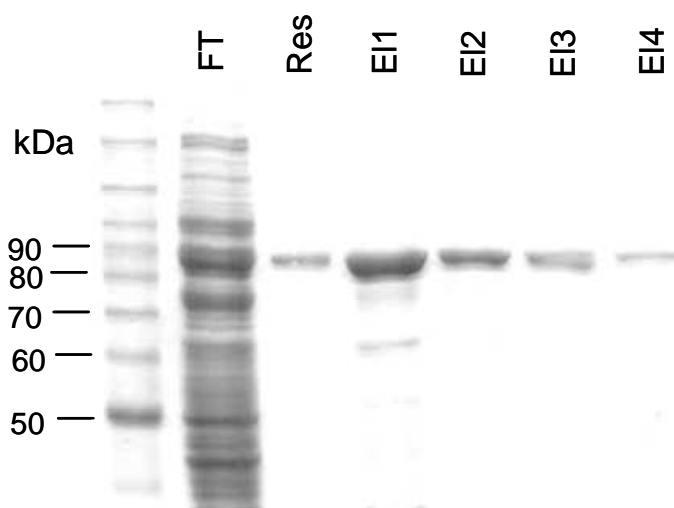
### 4.2.1 Ensaio atividade ATPase de FtsKe

Pelo fato da região N-terminal do gene *ftsK* do endosimbionte ser um fragmento transmembranar, foi amplificado somente um fragmento de 1480 pb correspondente à região C-terminal e clonado no vetor pGEX-4T. O plasmídeo resultante foi chamado pGEXftsKe.

Essa clonagem teve como objetivo produzir uma proteína recombinante para avaliar a atividade ATPásica. Aproveitando a indução realizada em *E. coli* para a produção dessa quimera, uma alíquota foi retirada e visualizada por microscopia óptica para análise fenotípica. No entanto, nenhuma alteração foi observada.

Após indução em cepa de *E. coli* Top10F' obteve-se uma proteína recombinante solúvel de aproximadamente 84 kDa (54 kDa correspondente ao fragmento de FtsK e 28 kDa correspondente à GST) que foi purificado por resina de glutationa-sepharose (figura 26).

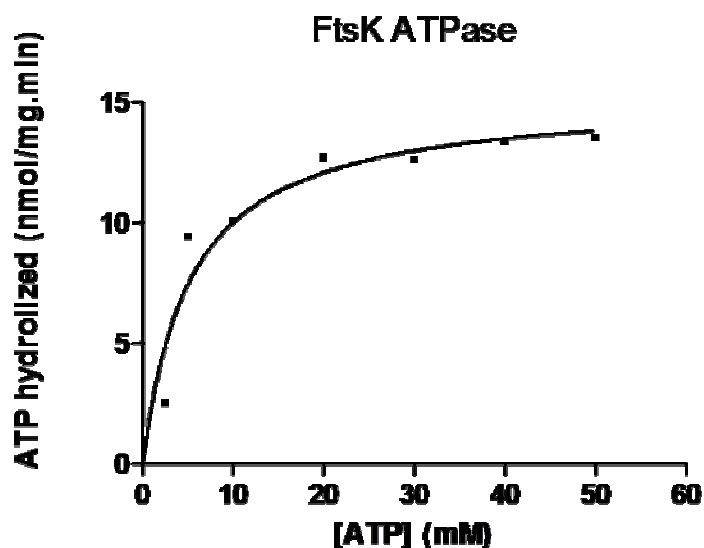
FIGURA 26 - PURIFICAÇÃO DE GST-FtsKe MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR GLUTATIONA



LEGENDA: Alíquotas dos diferentes passos da purificação foram aplicadas num gel desnaturante de poliácridamida 10%, corado com Azul de Coomassie. FT: material não retido após passagem pela resina de Glutationa-sepharose. Res: material retido na resina. E1-E4: eluições do material retido usando um buffer com excesso de glutatione livre.

O material das eluições 1 e 2 foi utilizado no ensaio de atividade ATPásica (figura 27):

FIGURA 27 – ATIVIDADE ATPÁSICA DE FtsKe



GST-FtsKe foi incubada durante uma hora a 28°C com concentrações crescentes de GTP, e a produção de Pi foi medida a 630nm.

Observa-se que FtsK ainda mantém a atividade ATPase, que é característica das translocases. Vale ressaltar que o ensaio controle somente com a proteína GST foi não apresentou atividade.

## A PROTEÍNA FtsZe É CAPAZ DE SE POLIMERIZAR

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *ftsZe*

A proteína FtsZ desempenha um papel chave na divisão celular das bactérias, fornecendo o arcabouço molecular sobre o qual se monta o aparelho de divisão. Além disso, a regulação da localização do divisoma na célula acontece através da polimerização de FtsZ. FtsZ é a proteína de divisão mais conservada evolutivamente, estando presente em virtualmente todas as eubactérias (com algumas exceções, dentre as quais aquelas do gênero *Chlamydia*), assim como também em arqueias e algumas organelas eucarióticas, tais como cloroplastos das plantas e algas verdes, e mitocôndrias de eucariotos primitivos (OSTERYOUNG & NUNNARI, 2003). A proteína FtsZe já foi caracterizada em trabalhos anteriores de

nosso laboratório. A seqüência completa do gene (figura 28), de 1161 pb, foi obtida a partir dos dados do seqüenciamento dos clones da biblioteca genômica do endosimbionte, e a maior homologia, a partir da seqüência de aminoácidos, se dá com a FtsZ de bactérias do gênero *Bordetella*. A análise da região adjacente ao gene *ftsZ* confirma os nossos dados: a homologia de todos os genes do agrupamento *dcw* é maior com os ortólogos de *Bordetella sp.* O conteúdo em GC é de 34,97%, um valor baixo quando comparado com o que se observa nos genomas procarióticos em geral, mas que está em concordância com o valor calculado a partir da totalidade de seqüências genômicas do endosimbionte conhecidas até o momento (33,6%).

FIGURA 28 - SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE *ftsZ* DO ENDOSIMBIONTE DE *C. deanei*

```

ATGAGGTTTGAGATTCTAGATAATAGTTCTAAAGGAACAATTATAAAAGTTATAGGGGTCGGAGGTGCAGGAGGTAATGCTGT
AGCACATATGATTAATAGTGGAAATTAAGGTGTTGATTTTATATGTGCAAATACAGATTCTCAAGCTTTAGCTGCTACTAATG
CTCCTGTGCAAATACGTCCTTGGAGAGACTGGTTTAGGTGCAGGAGCAAAACCAGAGCAAGGAAGGGCACATGCGGAAACGGCG
AGAGAAGAGATACGTTCTGTGTTAGATGGATCCCATATGGTATTTATTACTGCAGGAATGGGAGGAGGTACAGGTACAGGTGC
TAGTCCTATTGTTGCAGAAATAGCAAAAAATTTAGGTATATTGACGGTGGGGATTGTAACAAAACCATTTTTTATTTGAAGGCA
ATAAGCGCTTACGTTTAGCAGAAGAAGGTATAGCAGAGTTATCAAAATATGTAGATTCTCTGATTGTTATTTTGAATGAGAAT
CTTTATGAGTTTATGGATGATGATTCTACACAAGAAGATTGTTTTAAAGCTGCAGATAGTGTTTTACATAATGCCTGTGCTGG
TATTGCAGAAATAATTAATGTTGATGGTAATGTTAATGTTGATTTTGAAGACGTGCGTACAATTATGGGCGAGCATGGACAAG
CTATGATGGGTACTGCAGTAGCATCTGGTATAGAACGTGCAAAAATTGCAGCAAAACAGGCTATTTCTTGCCCTTTATTAGAA
GGAGTGAATTTAGAAGGGGCAAAAGGATTGCTAGTTAATATTACTTCTAATAGATCACTAAAAATGAAGGAACTCGTGAAT
TATGAAATAATACGTGCTTATGCATCAGAAGATGCTACTGTGATTTTTGGTAATGCTTATGATGATTCTATGGGCGATGAAC
TTAGAGTTACTGTTGTGGCAACTGGTTTGAATAAGTTTACAGATGATATAAATAATAATAAATTGCAGAGTATTTCTATTGAT
AAAAAGAGATCAGCTTTTGATTCTAATAAATATCAAAATAGAGTTTCTACTCCATCTGTCTATACGAATCCTAGATTAAGA
TTCTAATATTGAAAATGATAAATCTGTTCAAAGTAATAATGATTTTCGATATTCCTAGCTTTCTAAGAAAGAGAGTTGATTAG

```

A proteína resultante possui 386 aa, um peso molecular calculado de 41.3 kDa e apresenta 69% de identidade com o ortólogo de *Bordetella bronchiseptica*. A identidade com o ortólogo de *E. coli* é ainda alta (48,9%). É interessante ressaltar que todos os motivos envolvidos na união e hidrólise do GTP acham-se presentes na proteína do simbionte, assim como também o domínio C-terminal altamente conservado envolvido na interação com FtsA e ZipA (figura 29) (MA & MARGOLIN, 1999; MOSYAK et al., 2000; HANEY et al., 2001).



FIGURA 29 - ALINHAMENTO DAS PROTEÍNAS FtsZ DE *B. bronchiseptica*, DO ENDOSIMBIONTE DE *C. deanei* E DE *E. coli*

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *
FtsZBorbr : MNNFEMLENNAKGTVIKVVVGGAGGNVAHMRISGVSQVDFICANTDAQAAATNAPVQIRLG---RTGLGAGARPEQGRASAEAREE
FtsZEndo  : -MRFEILDNSKGTIIKVIKVVGGAGGNVAHMINSGIKGVDFICANTDSQAATNAPVQIRLG---ETGLGAGARPEQGRAHAETAREE
FtsZEcoli : --MFEPMELTN-DAVIKVIKVVGGGGNVAHMHVRRERIEGVVEFAANTDAQARRKAVGQTIQICSGITKGLGAGANPEVGRNAADEDRDA

      100     *      120     *      140     *      160     *      180
FtsZBorbr : IRAALNGAHMVFIITAGIGGGTGTGAPVVAEVAKEELGILLTVGVTKPPTFEENKRLRMAEDGIGELGKHVHSLIVVINENLYEIMDDDAT
FtsZEndo  : IRSVLDGSHMVFIITAGIGGGTGTGASPIVAEIAKNLGILTVGI/TKPELDFENKRLRLAEBGTAELSKEYVDSLIVVINENLYEIMDDST
FtsZEcoli : IRAALEGADMVFIITAGIGGGTGTGAPVVAEVAKDLGILLTVAVTKPENEENKRMARAEQGITELSKHVNSLITIPNDKLLKVLGRGIS

      200     *      220     *      240     *      260     *
FtsZBorbr : QEDFKAADDIIHNACAGIAEIIINVDGNVNVDFEDVKTIMGEOGQAMMGTAASCADRARVAEKATAAPLLEGVDLNGARGVLVNITAS
FtsZEndo  : QEDFKAADSVIHNACAGIAEIIINVDGNVNVDFEDVRTIMGEGHQAMMGTAVASCIERAKIAAKQAIAPLLEGVNLGARGLLVNITSN
FtsZEcoli : LLDLFGAANDVIKGAIVQIGIAELITRPGLVNVDADVRTVMSEMGHAMMGSQVASCEDRAEAEAEAMAIAPLLEDIDISGARGVLVNITAG

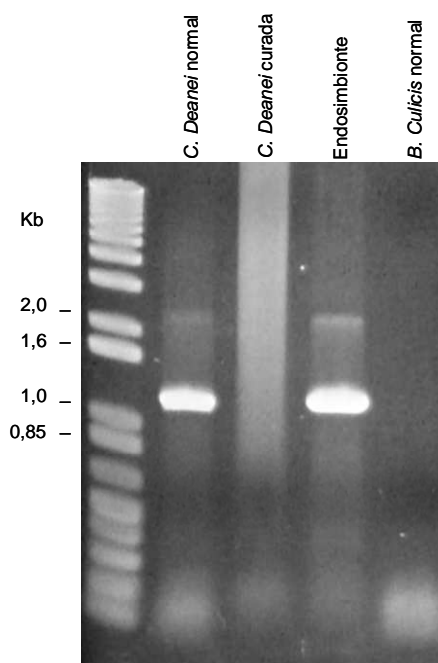
      280     *      300     *      320     *      340     *      360
FtsZBorbr : RTLKMREREIMEIIRSYASDDATVIEGTAYDEQMEBELRVTVVATGLGREAVRPQLVQHTSEALRTGTDNMPVGNMLAGQQGDYRGLDM
FtsZEndo  : RSLKMREREIMEIIRAYASEDATVIEGNAYDDSMGDELRVTVVATGLN--KFTDDINNKLOSLISIDKK----RSAFDSNKYQNR-VST
FtsZEcoli : FDLRLDEEFETVGNITRAFASDNATVVIGISLDPDMNDELRVTVVATGIG-----MDKRPEITLIVNKRQ----VQQPVMDRYQHGMAP

      *      380      *
FtsZBorbr : ESMVRNPNSSQASQVRALESSGIDHEDIPAFLRKRQAD
FtsZEndo  : ESVITNPELKDSENIENDKRVQSHNDEDIPEFLRKRVD
FtsZEcoli : LTQEQKEVAKVVNDNAPQIAKEIDYLDIPEFLRKRQAD

```

Os aminoácidos conservados em todas as seqüências estão sombreados em preto, e aqueles conservados na maioria das seqüências em cinza. As regiões envolvidas na união de GTP e o peptídeo Ct responsável pela interação com FtsA e ZipA em *E. coli* se indicam com quadros vermelhos e amarelo, respectivamente.

No caso dos cloroplastos ou mitocôndrias, o gene *ftsZ* foi transferido para o genoma nuclear. No nosso modelo de estudo não ocorreu essa transferência, visto que em cepas aposimbóticas não foi possível amplificar o gene *ftsZ* por PCR (figura 30).

FIGURA 30 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *ftsZ* DO ENDOSIMBIONTE

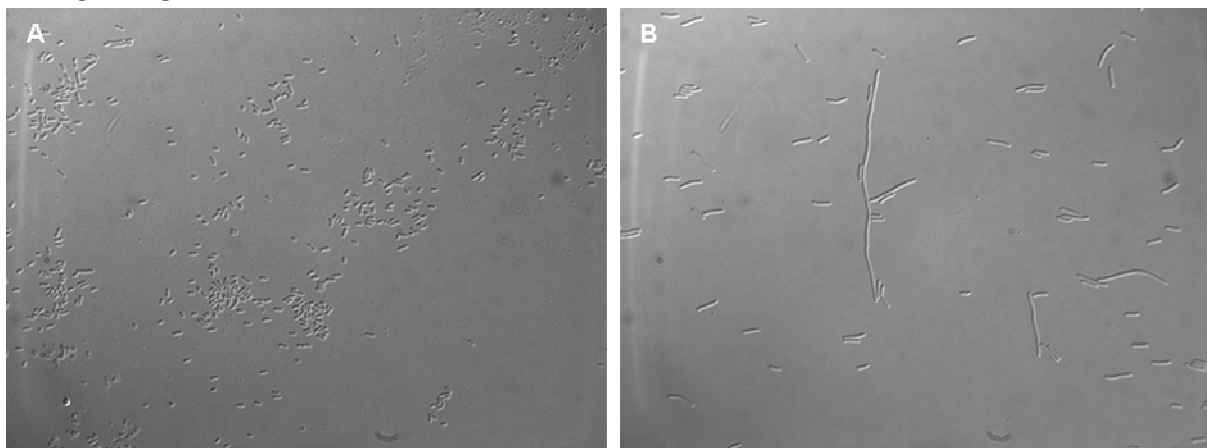
Amplificação por PCR do gene *ftsZ* a partir de DNA total de cepas de *C. deanei* normal e aposimbiótica, DNA genômico de frações purificadas de simbiote e DNA total da cepa de *B. culicis* normal.

Já se sabe que FtsZe possui atividade GTPásica, mas no entanto não é capaz de complementar a cepa de *E. coli* PAT84 (*ftsZ84<sup>Ts</sup>*). Essa cepa é portadora de uma mutação em *ftsZ* que produz uma proteína FtsZ termo-sensível. Como consequência, essa cepa cresce e se divide normalmente a 30°C, mas na temperatura restritiva de 42 °C a FtsZ é inativada e a bactéria, incapaz de se dividir e portanto, filamenta e morre.

A primeira questão que levantamos em relação a FtsZ do endosimbionte é se ela seria capaz de se polimerizar. Para analisarmos essa característica, expressamos o gene *ftsZe* na cepa BL21 LysS *E. coli*, a partir do plasmídeo pETftsZe, no qual o gene *ftsZe* foi ligado ao vetor pET47b. O sistema de expressão pET fornece a proteína FtsZe com uma cauda de 6xHis.

Ao visualizarmos por microscopia óptica o fenótipo dessa cepa induzida com IPTG verificou-se uma filamentação, indicando que um excesso de FtsZe interfere com o processo de divisão de *E. coli*, como pode ser observado na figura 31.

FIGURA 31 – SOBREENPRESSÃO DE FtsZe EM *E. coli* (CEPA BL21) – ANÁLISE FENOTÍPICA

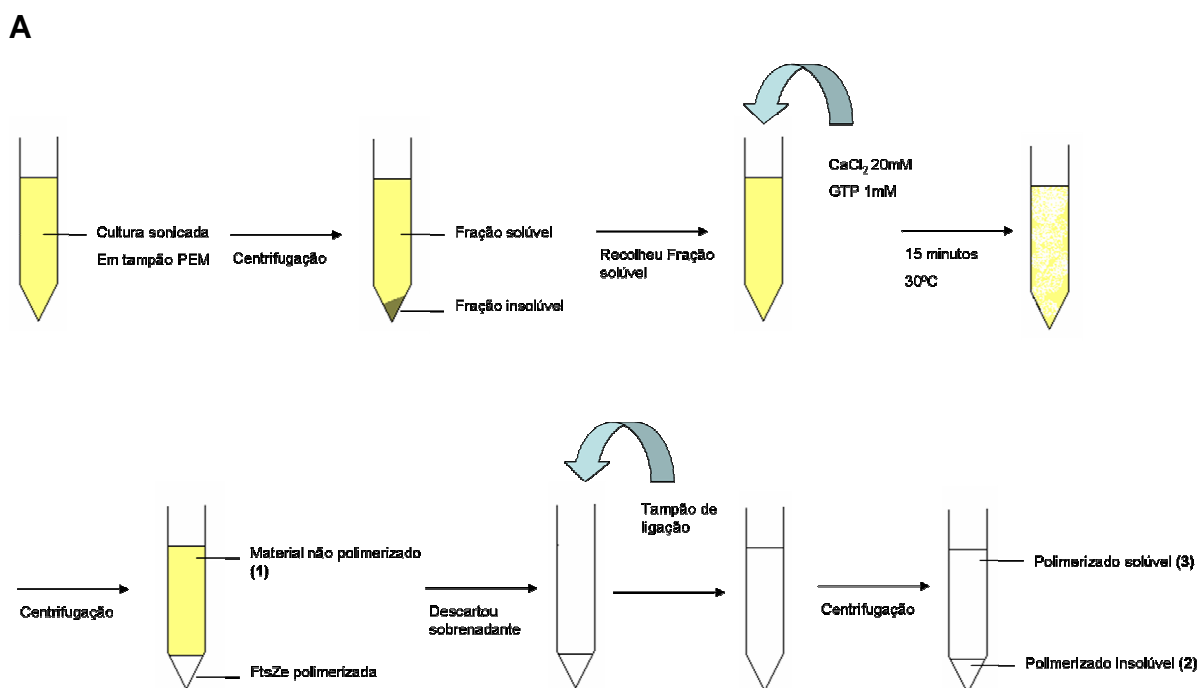
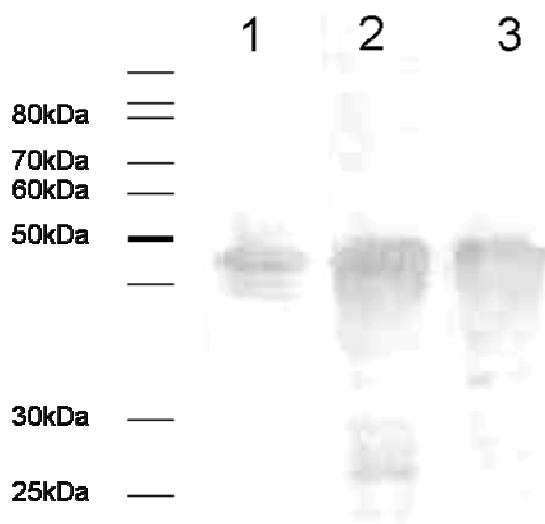


Fenótipo causado pela superexpressão de *ftsZe* em *E. coli* BL21 pLysS transformada com pETftsZe. A) BL21 pLysS pETftsZe não induzido. B) BL21 pLysS pETftsZe induzido com IPTG 2mM. As células foram fixadas e fotografadas usando um microscópio Nikon E600.

#### 4.3.1 Ensaio de Polimerização de FtsZe

Para verificar se FtsZe seria capaz de se polimerizar, utilizamos duas técnicas, ambas partindo do mesmo princípio: quando FtsZ está em solução tamponante PEM e adiciona-se um íon divalente ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) e GTP, a proteína é capaz de se polimerizar. A primeira técnica seguiu o princípio da purificação de FtsZ de *E. coli* (materiais e métodos item 3.10). Alíquotas de diferentes frações obtidas durante o ensaio foram aplicadas em gel de proteína para realização de Western blot reagindo a membrana com anticorpo monoclonal anti-histidina, com a finalidade de identificar em qual dessas frações se acha presente a proteína FtsZe (figura 32).

FIGURA 32 – ANÁLISE DE POLIMERIZAÇÃO DE FtsZe POR WESTERN BLOT

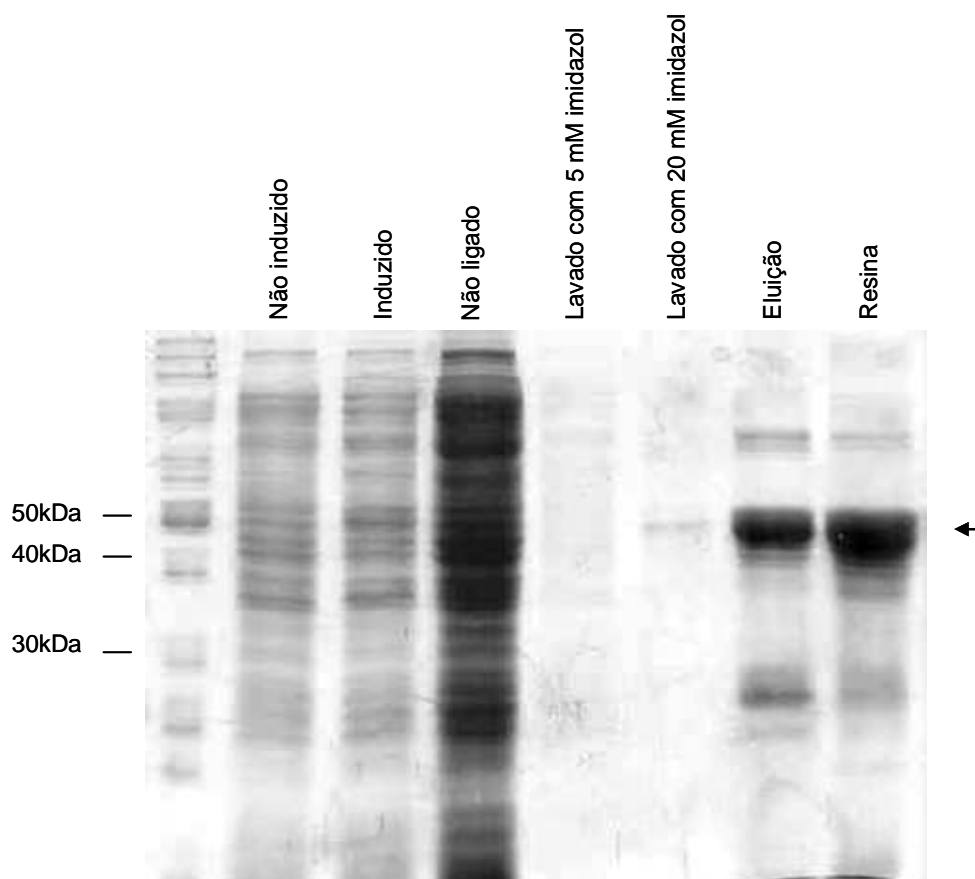
**B**

A) Esquema do ensaio de polimerização de FtsZe. Alíquotas das frações representados pelos números 1 (material não polimerizado), 2 (polimerizado insolúvel) e 3 (polimerizado solúvel) foram aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida 12% para realizar análise por western blot utilizando anticorpo monoclonal anti-histidina (B). 1) FtsZe não polimerizada em tampão PEM + GTP 1mM. 2) FtsZe polimerizada em tampão PEM + GTP 1mM e insolúvel em tampão de ligação (Tris-HCl, NaCl, imidazol 5mM). 3) FtsZe polimerizada em tampão PEM + GTP 1mM e solúvel em tampão de ligação (Tris-HCl, NaCl, imidazol 5mM). O Western blot foi revelado por fosfatase alcalina.

Percebe-se que FtsZe aparece em todas as frações, inclusive na fração polimerizada, sugerindo-se que FtsZe é capaz de polimerizar. No entanto, diferentemente do que ocorre com FtsZ de *E. coli*, a FtsZe polimerizada - em sua grande maioria - não se solubiliza quando se adiciona o tampão de ligação. Portanto, este não é o melhor método para purificar FtsZe utilizando resina de níquel-NTA. Para se ter a proteína purificada, e assim fazer análise de polimerização por espectrofotometria, utilizou-se o método usual para purificação de proteínas com cauda de histidina (sem prévia polimerização).

A figura 33 representa a purificação de FtsZe com resina de níquel-NTA.

FIGURA 33 – PURIFICAÇÃO DE FtsZe POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA



Purificação de FtsZe mediante cromatografia de afinidade (Níquel-NTA). Alíquotas dos diferentes passos da purificação foram aplicadas num gel desnaturante de poliacrilamida 10% e coradas com Azul de Coomassie.

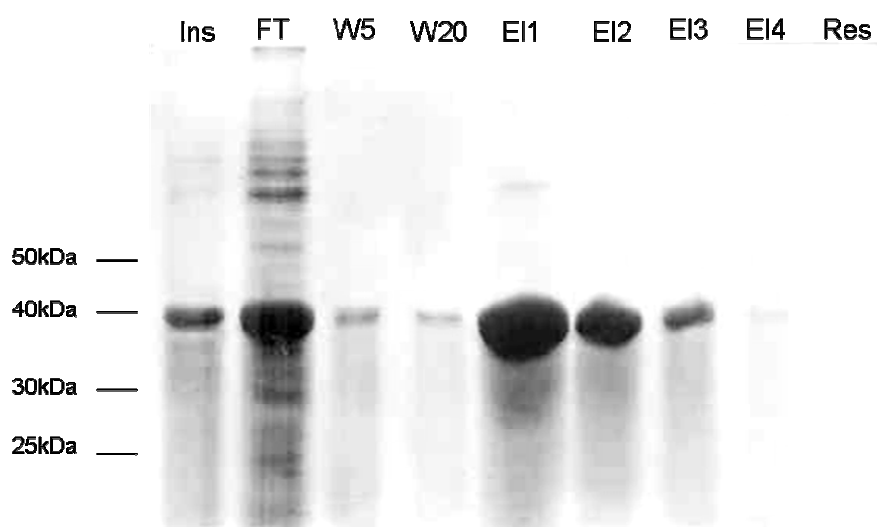
Com a proteína purificada, seguiu-se o protocolo descrito no item 3.11.2 da seção Materiais & Métodos. Dados preliminares sugerem que com a presença de

Mg<sup>+</sup> e GTP ocorre polimerização de FtsZ<sub>ec</sub>, havendo aumento da absorvância medida pelo espectrofotômetro em comparação com a amostra que não continha GTP (tabela 5). Após 10 minutos a absorvância diminuiu, mostrando que com o consumo de GTP o polímero é desfeito. Esse experimento precisa ser repetido mais algumas vezes para se fazer um tratamento estatístico dos valores obtidos.

#### 4.3.2 Purificação de FtsZ de *Escherichia coli*

Utilizando-se o plasmídeo pETftsZ<sub>ec</sub>, a proteína FtsZ de *E. coli* produzida na cepa BL21 pLysS. O fenótipo de BL21 pLysS pETftsZ<sub>ec</sub> induzida também é de filamentação (dado não mostrado). A purificação de FtsZ está representada na figura 34. A primeira etapa da purificação parte de sua capacidade de polimerizar, mas não está mostrada na figura abaixo.

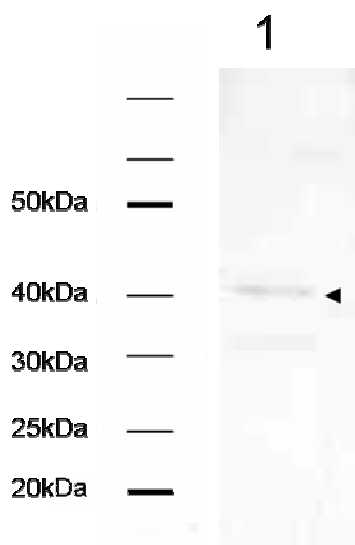
FIGURA 34 – PURIFICAÇÃO DE FtsZ DE *ESCHERICHIA COLI* POR CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA



Purificação de FtsZ<sub>ec</sub> mediante cromatografia de afinidade (Níquel-NTA). Alíquotas dos diferentes passos da purificação foram aplicadas num gel desnaturante de poliacrilamida 10% e coradas com Azul de Coomassie. Ins: material insolúvel após sonicação. FT: material não retido após passagem pela resina de níquel. W5: lavagem com tampão contendo 5 mM de imidazol. W20: lavagem com 20 mM de imidazol. E1-E4: eluições do material retido usando um tampão com 100 mM de imidazol. Res: material que ficou retido na resina após as eluições.

A proteína FtsZ<sub>ec</sub> purificada foi então inoculada em camundongos Balb-C para produção de antígeno policlonal, que foi testado por ensaio de western blot (figura 35).

FIGURA 35 – WESTERN BLOT UTILIZANDO SORO ANTI-FtsZ DE *Escherichia coli*



Western blot usando o soro anti FtsZ<sub>Ec</sub> obtido em camundongos reagido com extrato de *E. coli* (1). O Western blot foi revelado por fosfatase alcalina. A banda corresponde está assinalda com a ponta de seta.

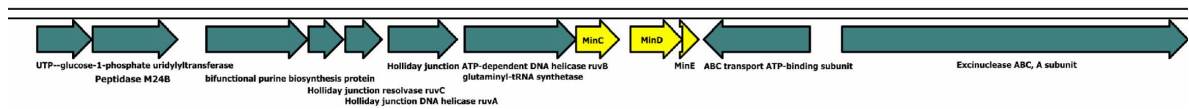
Os soros dos camundongos 1 e 2 houve a reconhecimento de apenas um banda de aproximadamente 41kDa, referente à proteína FtsZ de *E. coli*. Esses soros foram utilizados para ensaios de interação que serão apresentados mais adiante.

## O SISTEMA *minCDE* PARTICIPA DA DIVISÃO DO SIMBIONTE

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *minCDE*

Como já mencionado na introdução deste trabalho, a divisão celular bacteriana é um processo finamente regulado, tanto temporal como espacialmente. As proteínas responsáveis pelo controle espacial da divisão, MinC, MinD e MinE, são codificadas por três genes que se encontram formando um operon nos cromossomos bacterianos. Como resultado do seqüenciamento sistemático dos clones da biblioteca do endosimbionte e da procura por homologia, fomos capazes de identificar os genes *minC-minD-minE*, localizados na mesma região cromossômica e na mesma fita de DNA, o que indica que provavelmente sejam transcritos de forma coordenada (figura 36).

FIGURA 36 – ORGANIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS GENES *minCDE* NO ENDOSIMBIONTE



As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir desses genes (figura 37) mostraram maior identidade com os ortólogos de *Bordetella sp.*, em concordância com o observado na imensa maioria dos genes do endosimbionte. O conteúdo em G+C do operon (31,88%) é consistente com o valor determinado para a totalidade das seqüências genômicas do endosimbionte conhecidas (33,6%). As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir desses genes mostraram maior identidade com os ortólogos de *Bordetella sp.*, sendo as porcentagens de identidade significativas: 38,5% e 64,5% para MinC (domínios N-terminal e C-terminal respectivamente), 78,6% para MinD e 72,6% para MinE.



FIGURA 37 - SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DOS GENES *minCDE* DO ENDOSIMBIONTE DE *C. deanei* E A CORRESPONDENTE SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA

MinC

ATGATGAATAAATCCTTAATTGAATTTAAAAGTGCCAGTTTTAATGTATATGCTCCTAAAATTATAATTCATACTTCTAATAT  
 AAATGACTTAAGCACCTCAATAACAAAACATATATATAAATCTGGAAACTTTTTTAAAAATGAACATGTAGTTATAGATGCTA  
 CTCAGATAGACCAAATTATAGACTGGGATATGCTGATCACAATCTTAAAGAACACGAGATTAATATATTAGGAATAGTAGCT  
 AATAACATTAATATTCAGAATGCAATCAAAGCTGGATTGTCTCCATTAGATATTATCACTAATAAAAAATATTTAAATTTGAAAC  
 AAACGCTACACAATTACCAACGATGCTAATTGATAAACCGTTACGCTCTGGGCAAAAAATATATGCTAGCAAATCTGACCTTA  
 TTGTAATCGGCATGGTCAGCCAAGGAGCTGAAATTATAGCAGATGGAAATATACATGTGTATGGCCCGCTAAGAGGTAAAGCA  
 ATGGCTGGAGCACAGGGTAATAAAGAGGCTAGAATATTTACAACACAACCTAAATGCAGAATTATTATCTATATCAGGTGTATA  
 TCAAGTTATAGAAAATGATTTAAAAGATACTGTGATGAATAAACAGCCATAGTACAACCTAATGGATGAAAACTAACATAA  
 TTGCCATATAA

M M N K S L I E F K S A S F N V Y A P K I I I H T S N I N D L S T S I T K H I Y N S  
 G N F F K N E H V V I D A T Q I D Q I I D W D M L I T I L K E H E I N I L G I V A N  
 N I N I Q N A I K A G L S P L D I I T N K N I K I E T N A T Q L P T M L I D K P L R  
 S G Q K I Y A S K S D L I V I G M V S Q G A E I I A D G N I H V Y G P L R G K A M A  
 G A Q G N K E A R I F T T Q L N A E L L S I S G V Y Q V I E N D L K D T V M N K P A  
 I V Q L M D E K L T I I A I

MinD

GTGGCGGAGTTGTTGTAGTAACCTTCTGGTAAAGGAGGCGTGGGTAAAACCACTAGCAGTGCTAGCTTTTCTGCTGGATTAGC  
 TTTACGCGGCTATAAACTATCGTAATAGACTTTGATGTGCGATTACGTAATCTTGATCTTATATGGGTTGTGAAAGAAGAG  
 TAGTATATGATTTTCATAAACGTAGTACAAGGAGACGCCAATCTAAAACAAGCTCTAATAAAAAGATAAAAATACTGAAAATCTA  
 TTTTACTTCTGCTTCGCAACAAGAGATAAAGATGCATTAACACAATCTGGAGTAGAAAAGGTTTTAGAAAGATCTAAAAAA  
 AATGGGTTTCGAATACATAGTATGCGACTCTCCAGCTGGAATAGAGTCTGGTGCCTTAATGGCCGCATATTTTCAGATGATG  
 CTATTATYGTACAAAATCCTGAAATATCTTCTGTAAGAGACTCCGATAGGATTTTAGGGATACTGTCTCAAAGTCAAAAACGT  
 GCTAYAGAGGGCCTCGARCTATAAAAAGAAATCTTGTGTGATAACCCAGATATAACCCAAAAAGAGTTATTAATGGTGAATGCT  
 TTCTATATCAGATATAGAAGATATYWTGCGTATCGACCTAGCTGGAGTTATTCCAGAATCTGAATCAGTATTGCACGCATCTA  
 ACCAGGGTCTACCTGCTATTTCATCTTAATGAAAACACCAGTATCAATAGCATAACAATGATCTTGTTTCTCGTTACTTAGGCGAA  
 TCCATTTCCAATGAAATTTACAGAATATGAAAAACCTAGCTTTATCAAACGACTTTTTGGAGGTAGATAA

V A R V V V V T S G K G G V G K T T S S A S F S A G L A L R G Y K T I V I D F D V G  
 L R N L D L I M G C E R R V V Y D F I N V V Q G D A N L K Q A L I K D K N T E N L F  
 I L P A S Q T R D K D A L T Q S G V E K V L E D L K K M G F E Y I V C D S P A G I E  
 S G A L M A A Y F A D D A I I V T N P E I S S V R D S D R I L G I L S S K S K R A X  
 E G L E P I K E F L L I T R Y N P K R V I N G E M L S I S D I E D I X R I D L A G V  
 I P E S E S V L H A S N Q G L P A I H L N E T P V S I A Y N D L V S R Y L G E S I P  
 M K F T E Y E K P S F I K R L F G G R

MinE

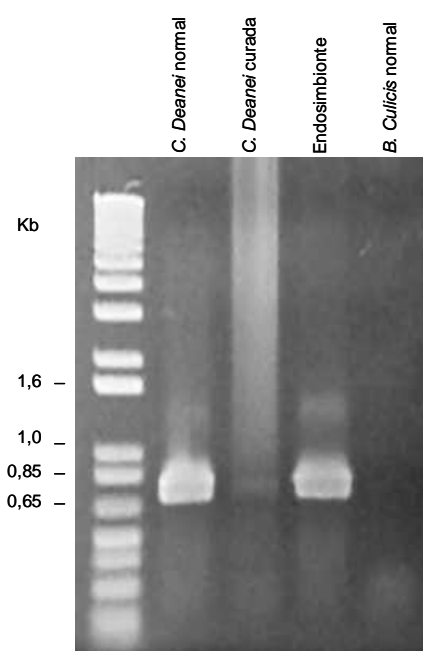
ATGTCATTTCTGCTGTTTTATTAGGAGAAAAAGAAAAAACTGCCTCTGTTGCTAAGGAAAGATTACAAATCATACTTGCACA  
 CGAGCGTTCAAACAAAATTCACCAGACTATCTAAATAAACTACAACAAGAACTTATATCAGTTCTATCTAAGTATGTTGTAA  
 TAAACCCGATGATATTAAGTTAaTATTGAAAGTCAGGGTCTTTGGATGTTCTTGAAGTAAAAATAGAGATGCAACAAAAA  
 ACTTAA

M S F L S F L L G E K K K T A S V A K E R L Q I I L A H E R S N K N S P D Y L N K L  
 Q Q E L I S V L S K Y V V I N P D D I K V N I E S Q G S L D V T S K N R D A T K H

Após a descoberta de genes *ftsZ* no genoma de *Arabidopsis*, uma procura em banco de dados levou à descoberta de ortólogos dos genes *minD* e *minE* em algumas plantas superiores e em algas. Contudo, nenhum ortólogo de *minC* foi identificado. Os ortólogos de *minD* e *minE* foram primeiramente identificados no genoma de cloroplastos de *Chlorella vulgaris*. Em seguida, esses genes foram identificados no genoma nuclear de *Arabidopsis*, e posteriormente no genoma de

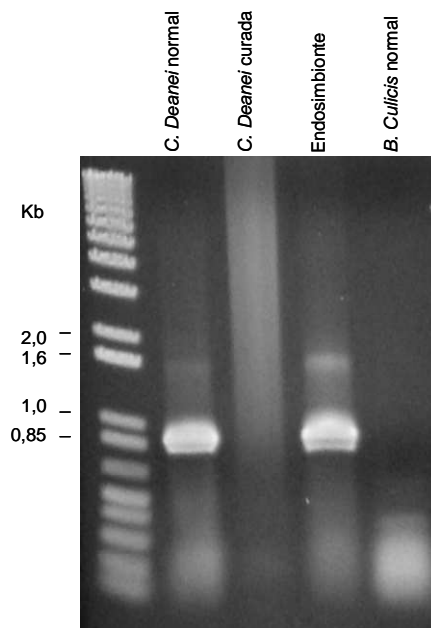
outras espécies, tais como tabaco e arroz. Análises mostram que esses genes codificam proteínas funcionais que participam ativamente da maquinaria de divisão dos cloroplastos. (revisto por MAPLE & MOPLER, 2007). Verificamos então se os genes *minCDE* estavam presentes em cepas normais e aposimbóticas. Foram realizadas PCRs utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos baseados nas seqüências nucleotídicas do genoma do endosimbionte de *C. deanei* (figura 38).

FIGURA 38 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *minC* DO ENDOSIMBIONTE



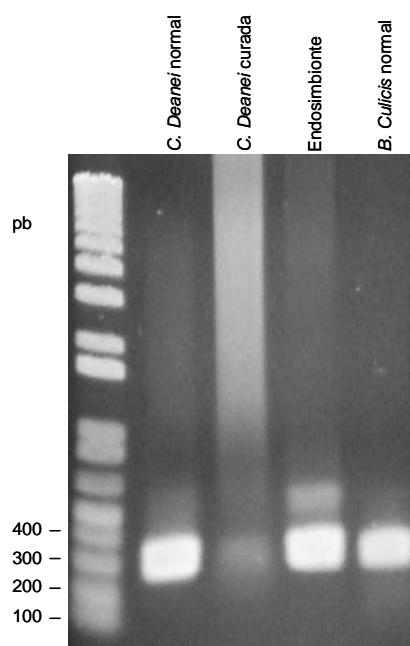
LEGENDA - Amplificação por PCR do gene *minC* a partir de DNA total de cepas de *C. deanei* normal e aposimbótica, DNA genômico de frações purificadas de simbiote e DNA total da cepa de *B. culicis* normal.

Houve amplificação de *minCe* apenas quando utilizamos DNA total de *C. deanei* normal e DNA do endosimbionte (figura 38), levando a conclusão que o gene só está presente no genoma da bactéria endosimbótica, não tendo ocorrido sua transferência para o genoma do protozoário hospedeiro. Os iniciadores utilizados não foram capazes de amplificar o gene do endosimbionte de *B. culicis*. Os mesmos resultados foram obtidos para o gene *minDe* (figura 39).

FIGURA 39 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *minD* DO ENDOSIMBIONTE

LEGENDA: Amplificação por PCR do gene *minD* a partir de DNA total de cepas de *C. deanei* normal e aposimbótica, DNA genômico de frações purificadas de simbiote e DNA total de cepa de *B. culicis* normal.

A figura 40 mostra os resultados obtidos para *minEe*. Como para os outros genes do sistema min, *minEe* está presente no genoma do endosimbionte. No entanto, conseguiu-se uma amplificação de *minE* quando se utilizou DNA da cepa normal de *B. culicis*.

FIGURA 40 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE *minE* DO ENDOSIMBIONTE

LEGENDA: Amplificação por PCR do gene *ftsK* a partir de DNA total de cepas de *C. deanei* normal e aposimbiótica, DNA genômico de frações purificadas de simbionte e DNA total de cepa de *B. culicis* normal.

Foi realizada uma análise detalhada de domínios e aminoácidos importantes para a função característica de cada proteína do sistema Min a partir de pesquisas feitas com bactérias de vida livre (figuras 41, 43 e 44).

FIGURA 41 - ALINHAMENTO DA PROTEÍNA MinC DO ENDOSIMBIONTE DEDUZIDO A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS, COM OS CORRESPONDENTES HOMÓLOGOS DE *Bordetella spp* E *Escherichia coli*

MinC			
Bordetella spp	-MNTESLALDFKSATLYAIRVVLH DADTTRLRAALDKRMADAGS FENEPPVIDATR VDA	59	
Simbi	MMNKSLIEFKSASFNVYAPKIIITSNINDLSTSI TKHIYNSGNFKNEHVVIDATQIDQ	60	
E.coli	-MSNTPIELKGSSTLS--VVHLHAEPKVIHQALEDKIAQAPALKHAPVVLNVSAL ED	57	
	*.. : : * : : : * : : : : : : : : * : : * : : : : :		
Bordetella spp	PVD PALLQALADHNLPII VV-AEGANLQGARDAGLV VELSTPVARAPQVIDTAPPND	118	
Simbi	IIDMDMLITILKEHEINILGIV-ANNINIQNAIKAGLSPLDIITNKN---IKIETN----	112	
E.coli	PVNSAMHKAVSATGLRVI VSGCKDAQLKAEIEKMGLPILTEGKEKAPRPAPTPQAPAQ	117	
	::* : : : : * : . : : : . *		
Bordetella spp	VATPVPSVPEATAEAAKAGPQDDEAYGEQADEAPAHNPESVPTRAARETTEANRPTATP	178	
Simbi	-ATQLP-----	117	
E.coli	NTLPVT-----	123	
	:* : .		
Bordetella spp	PQSSALVITKPLRSGQRVYARHTDLIVIGMVSQGAEVIADGNVHVGPLRGKAMAGAR	238	
Simbi	-----TMLIDKPLRSGOKIYASKSDLIVIGMVSQGAEIIADGNIHVYGPLRGKAMAGAQC	172	
E.coli	----KTRLIDTFVRSQRIYAPQC DLIVTSHVSAGAEIADGNIHVYGMGRALAGASS	179	
	: : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
Bordetella spp	DTSARIFTQLDAELLAVAVYRVVEDKLDRALHNQPALVRI DGDTRIEALKG	292	
Simbi	NKEARIFTQLNAELLSISVYQVIENDLKDVTMKNKPAIVQIMDEKLTIIAI--	224	
E.coli	DRETQIFCINMAELVSIAGEY-WLSDQIPAEFYGKAARLQIVENALITVQPLN-	231	
	: . : * * : * : * : * : * : * : . : . : * : * : * : * : . :		

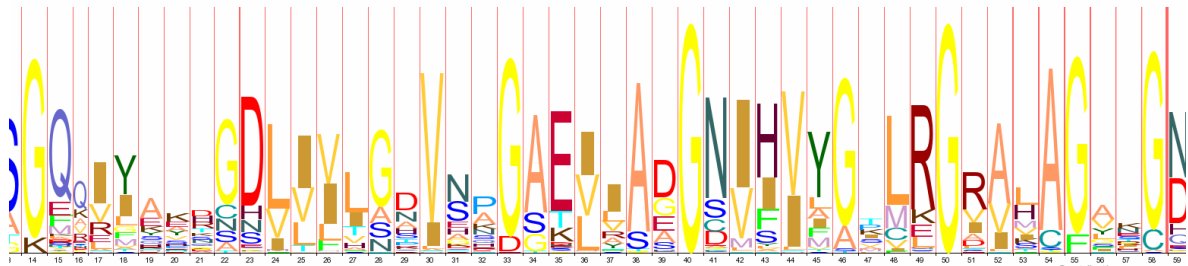
LEGENDA: Alinhamento da proteína MinC do endosimbionte deduzido a partir das seqüências nucleotídicas, com os correspondentes homólogos de *Bordetella spp* e *Escherichia coli* utilizando o programa ClustalW. Em vermelho mostra-se os aminoácidos consenso entre as proteínas dos três organismos. Em amarelo e verde, resíduos de glicinas conservadas.

MinC é constituída por dois distintos domínios ligados por uma região flexível. Em *E. coli* o domínio N-terminal compreende os resíduos de aminoácidos de 1 a 99. O domínio C-terminal inclui os resíduos 125 a 231. A região C-terminal da proteína MinC é mais conservada e interage com ela mesma e com MinD (HU & LUTKENHAUS, 2000). A região N-terminal interage com FtsZ (HU et al., 1999). Foi proposto que a interação de MinC com MinD é responsável por fazer com que a região N-terminal de MinC interaja com seu alvo, FtsZ (JOHNSON et al., 2002)., Quatro resíduos de glicina completamente conservados no domínio C-terminal de MinC têm um papel chave na função dessa proteína na inibição da divisão celular. O resíduo de glicina que ocupa a posição 161 (G161) está envolvido com a homodimerização, a qual é essencial para a função de MinC, enquanto os resíduos G135, G154 e G171 são críticos na interação MinC-MinD (RAMIREZ-ARCOS et al., 2004).

Analisando a figura 42, percebemos que o domínio C-terminal é o mais conservado, em concordância com trabalhos anteriores, e também que todos os resíduos de glicina citados como importantes para a função de MinC de *E. coli*

estão presentes na proteína MinCe (realçados em amarelo), indicando que essa proteína seja funcional no processo de divisão do endossimbionte. Outros resíduos de glicina também estão conservados na região C-terminal (em verde). A figura 43 nos mostra de uma maneira mais visual esse domínio da proteína MinC rico em resíduos de glicina.

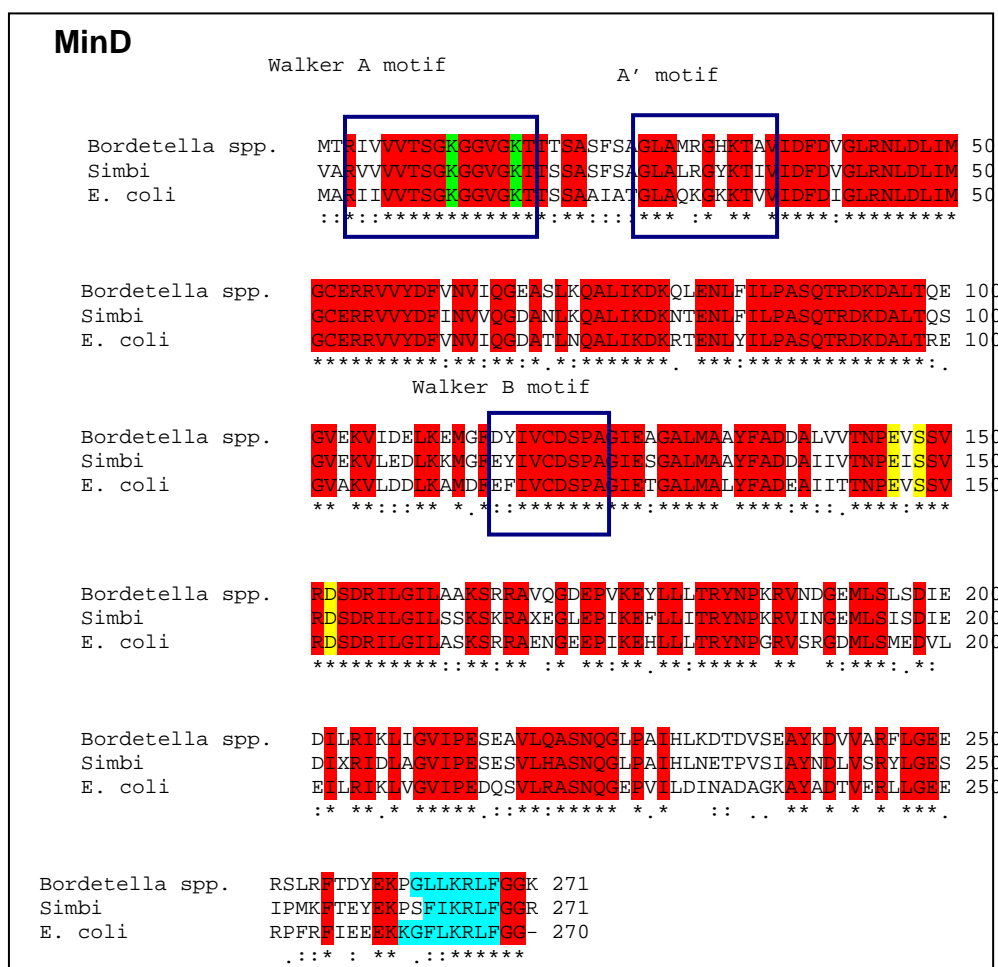
FIGURA 42 – REPRESENTAÇÃO DO DOMÍNIO C-TERMINAL DA PROTEÍNA MinC RICO EM RESÍDUOS DE GLICINA



As letras G em amarelo representam os resíduos de glicina.

MinD é uma proteína conservada membro da família das ATPases. Pode-se perceber claramente que MinD do endossimbionte permaneceu bastante conservada (Figura 43).

FIGURA 43 - ALINHAMENTO DA PROTEÍNA MinD DO ENDOSIMBIONTE DEDUZIDO A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS, COM OS CORRESPONDENTES ORTÓLOGOS DE *Bordetella spp* E *Escherichia coli*



Alinhamento da proteína MinD do endossimbionte deduzido a partir das seqüências nucleotídicas, com os correspondentes ortólogos de *Bordetella spp* e *Escherichia coli* utilizando o programa ClustalW. Em vermelho mostra-se os aminoácidos idênticos entre a proteína dos três organismos. Em amarelo e verde, resíduos de aminoácidos idênticos e essenciais para a função da proteína. Em azul, seqüência MTS de endereçamento para membrana (*membrane-targeting sequence*)

A proteína MinD possui conservados os domínios e resíduos de aminoácidos importantes para sua função. Por exemplo, o resíduo de lisina que ocupa a posição 11 (K11) – destaque em verde – é essencial para a ativação de MinC de *E. coli*, bem como é responsável pela interação de MinD com a membrana, MinE e com si próprio (Hayashi et al., 2001; Zhou et al., 2005). Tanto o resíduo de lisina na posição 11(K11) , quanto na posição 16 (K16) são importantes para a atividade ATPase de MinD. Outros resíduos importantes são E146, S148 e D152 (destaque em amarelo). Na proteína MinD de *E. coli*, esses três resíduos estão presentes na hélice 7 da

proteína e interagem eletrostaticamente com a lisina 11. Esses três resíduos da hélice 7 não são necessários para a ligação de MinD à membrana ou para a ativação de MinC e também não são requeridos para a ligação com MinE. No entanto, são importantes pela estimulação da atividade ATPase de MinD pela MinE (ZHOU et al., 2005).

A proteína MinD do endosimbionte compartilha outro sinal importante com a MinD de *E. coli*, o sinal MTS (*membrane-targeting sequence* – MTS), uma região de 8 a 12 resíduos de aminoácidos altamente conservados na porção C-terminal e que é essencial para o direcionamento da proteína para a membrana. MinD se associa com a membrana interna e essa interação é pré-requisito para o subsequente recrutamento de MinC à membrana. Este passo é crítico para a regulação topológica da divisão bacteriana. O consenso de MTS é KG[FLI][LFI]X3-4KR[LFI][FL], onde X3-4 representa três ou quatro inserções de resíduos achados em algumas proteínas MinD (SZETO et al., 2002). Esse consenso está representado pela cor azul na figura 43. Percebe-se que ainda está bastante conservado, mais um indício de que o sistema Min continua funcional na divisão endossimbiótica.

A região N-terminal de MinE (resíduos de 1 a 31) é responsável pela supressão da atividade de inibição da divisão do complexo MinCD (Figura 44). Essa função está correlacionada com a habilidade de MinE de se ligar a MinD e, assim, estimular sua atividade ATPase, tornando-a inativa. No entanto, não há uma especificidade topológica. Essa especificidade topológica de MinE é dada pelo domínio C-terminal (resíduos de 32 a 88), que é o responsável pela dimerização de MinE (revisto por LUTKENHAUS, 2007). Um estudo recente (RAMOS et al., 2006) mostrou que o domínio N-terminal interage com o domínio C-terminal, indicando que esses domínios não são completamente independentes. Nesse trabalho mostrou-se que o mutante não funcional L22D possuía alterações estruturais nos dois domínios com uma significativa desestabilização de toda a estrutura de MinE. Isto sugeriu que há uma íntima associação entre os domínios anti-MinCD e de especificidade topológica. Vale ressaltar que o resíduo de lisina 22 importante pra estruturação da proteína está conservada em MinEe.



FIGURA 44 - ALINHAMENTO DA PROTEÍNA MinE DO ENDOSIMBIONTE DEDUZIDO A PARTIR DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS, COM OS CORRESPONDENTES ORTÓLOGOS DE *Bordetella spp* E *Escherichia coli*

MinE	
Bordetella spp.	MSFISFLLGQKKSSASVAKERLQIILAHERRGRGDSFDYLPQLQQELVAVISKYVKIDPED 60
Simbi	MSFISFLLGKKKKTASVAKERLQIILAHERRSNKNSFDYLNKIQQELISVLSKYVVINPDD 60
E.coli	MALIDDFLSRKKNTANIAKERLQIILVAERRRSDAEFHYPQLRKDILEVICKEYVQIDPEM 60
	*:
Bordetella spp	IKVHLERQ-DTLEVLEVKIEMPQN---- 83
Simbi	IKVNIESQ-GSLDVTSKNRDATAKH---- 83
E.coli	VTVQLQKQKGDGDISILELNVTLPAAEELK 88
	:.*:*:* : . : . : . : . : . :

Alinhamento da proteína MinE do endosimbionte deduzido a partir das seqüências nucleotídicas, com os correspondentes ortólogos de *Bordetella spp* e *Escherichia coli* utilizando o programa ClustalW. Em vermelho mostra-se os aminoácidos idênticos entre a proteína dos três organismos. Em amarelo e verde, resíduos de aminoácidos idênticos e essenciais para a função da proteína.

Segundo Shih (2002), mutantes MinE<sup>D45A/V49A</sup> em *E. coli* são incapazes de formar o anel E. Ao realizar uma análise desses resíduos de aminoácidos percebemos que o resíduo de valina 49 está conservada no endosimbionte. Entretanto, tanto em *Bordetella spp* quanto no endosimbionte o resíduo de aminoácido na posição 45 é o glutamato e não o aspartato. No entanto, esse dois aminoácidos possuem a mesma característica, pois os dois são aminoácidos ácidos. D45 e V49 estão destacados em amarelo na figura 45.

Todas essas análises mostram que apesar da relação endossimbiótica, essas proteínas mantiveram-se conservadas, principalmente em regiões chaves pra suas funções, como vimos anteriormente. As análises também sugerem que as proteínas do sistema Min continuam tendo papel no controle da divisão do endosimbionte. Para tirarmos maiores conclusões, outros testes que poderiam nos fornecer maiores informações sobre essa questão foram realizados.

## O SISTEMA Min CONTINUA FUNCIONAL NO ENDOSIMBIONTE

### 4.4.1 Fenótipo da sobreexpressão dos genes do sistema Min do endosimbionte em *E. coli*

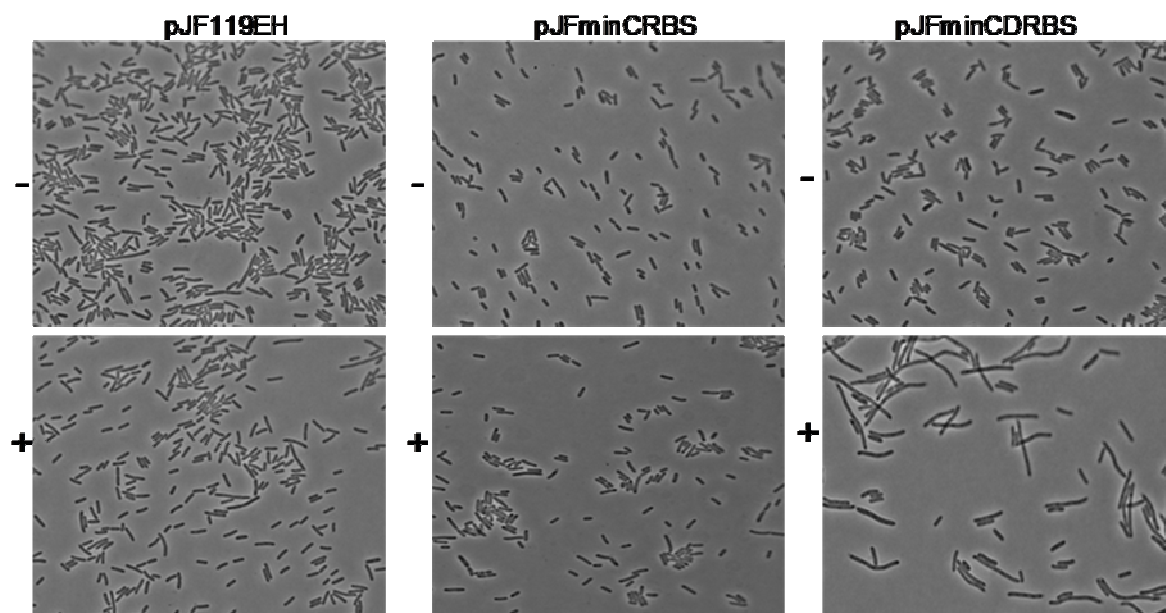
MinC é um inibidor da formação do septo, já que interage especificamente com FtsZ, impedindo sua polimerização e, portanto, a formação do anel Z. MinD é uma proteína de membrana com atividade ATPásica que se liga a MinC, ativando-a, e permitindo a sua localização na membrana. A localização do complexo MinCD é

oscilatória, achando-se na maior parte do tempo próximo aos pólos celulares. MinE é a responsável por dar especificidade ao complexo MinCD, já que mediante a sua união a MinD e sua localização central na célula, desloca o complexo inibidor da membrana, permitindo assim a formação do anel Z no lugar correto. Em *E. coli*, quando o gene *minC* é superexpresso observa-se uma inibição da divisão celular, evidenciada pelo aumento no comprimento das células. Esse efeito é mais dramático se *minC* e *minD* são superexpressos conjuntamente, formando longos filamentos de células. Para verificar se essas alterações de fenótipos também ocorrem quando se sobreexpressa *minCDE* do endosimbionte, esses genes foram clonados no vetor pJF119EH.

As clonagens foram feitas como especificado na seção Materiais & Métodos. O clone bacteriano contendo o plasmídeo resultante, pJFminCe, quando incubado na presença de IPTG produzia uma proteína do peso molecular esperado (24,7 kDa), mas a indução era muito pobre, e não apresentava alteração do fenótipo de *E. coli*. Acreditamos que nessas condições a indução não era suficiente para aumentar os níveis de MinCe significativamente. Para isso, foi desenhado outro primer (minC3) introduzindo a seqüência AGGAGG, consenso para o *Ribosome Binding Site (RBS)*, 5 pb a montante do ATG do gene, para aumentar a sua expressão. Assim, foi possível aumentar os níveis de expressão de *minCe* em *E. coli*. No entanto, quando se transformava *E. coli* cepa XL1Blue com esse plasmídeo e depois se induzia com IPTG também não se verificava uma mudança do fenótipo (filamentação).

Então decidimos usar uma outra estratégia, que consistiu em clonar no mesmo vetor os genes *minC* e *minD*. O plasmídeo resultante chamou-se pJFminCDRBS. Como já explicado anteriormente, a sobreexpressão do *minCe* não gerou alteração visível na morfologia celular, mas quando se superexpressou conjuntamente *minCe* e *minDe* observou-se filamentação celular (figura 45).

FIGURA 45 - EFEITO DA SUPEREXPRESSIONO DE MinCe E MinCDe EM *Escherichia coli*

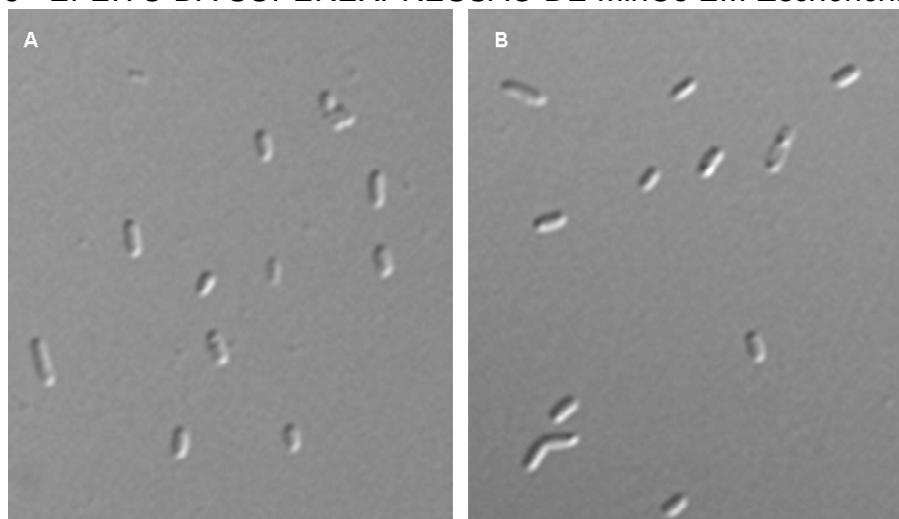


A cepa XL1blue (contendo o plasmídeo pRARE) foi transformada com o pJFminCRBS, pJFminCDRBS (construções portadoras do RBS upstream de *minC*) ou, como controle, com o vetor vazio, e as bactérias cultivadas na presença de 0,5 mM de IPTG durante 2 hs.

Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que MinCe não ter suficiente afinidade pela FtsZ da *E. coli* para inibir sua polimerização. Então, a presença de MinDe ativaria MinCe, possibilitando sua localização na membrana, com a conseqüente inibição da divisão. Esses dados apontam uma possível funcionalidade do complexo MinCD do simbionte na localização de FtsZ.

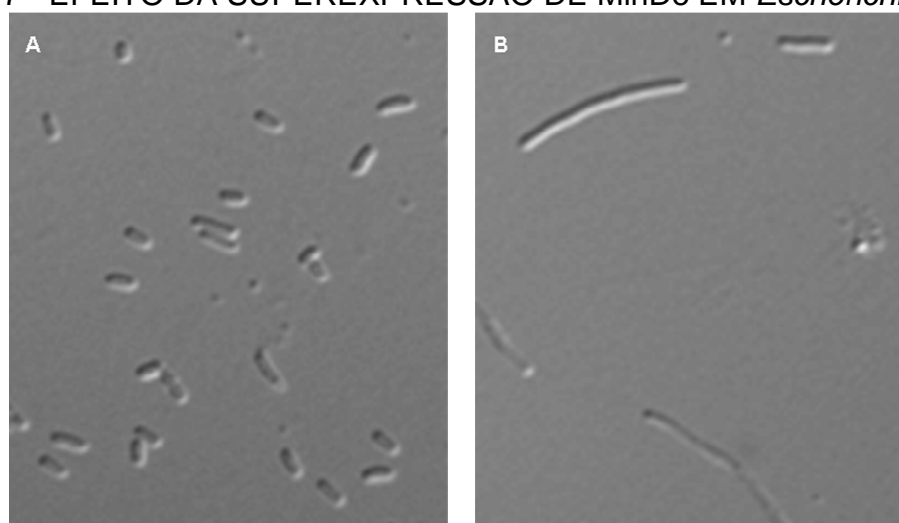
Utilizando-se do vetor de expressão pQE30 fez-se a clonagem de *minCe* e *minDe* separadamente, resultando nos plasmídeos pQEminCe e pQEminDe, respectivamente. O resultado da indução desses dois genes para o fenótipo da *E. coli* transformada pode ser visualizado nas figuras 46 e 47.

FIGURA 46 - EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE MinCe EM *Escherichia coli*



Efeito da superexpressão de MinCe em *E. coli* (cepa Top10F') contendo o plasmídeo pREP4 e pQEminCe induzida com IPTG 2mM. Em (A) Cultura de Top10F' pREP4 pQEminCe não induzida, (B) ) Cultura de Top10F' pREP4 pQEminCe induzida.

FIGURA 47 - EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE MinDe EM *Escherichia coli*



Efeito da superexpressão de MinDe em *E. coli* (cepa Top10F') contendo o plasmídeo pREP4 e pQEminDe induzida com IPTG 2mM. Em (A) Cultura de Top10F' pREP4 pQEminDe não induzida, (B) ) Cultura de Top10F' pREP4 pQEminDe induzida.

Como se percebe, a expressão MinCe não causou filimentação, que foi posteriormente observada quando se expressou MinDe. Esse resultado mostra que MinDe é suficiente para inibir a divisão e enfraquece a hipótese levantada acima, de que sua superexpressão poderia aumentar a afinidade de MinCe por FtsZ, causando então a filimentação.

Este resultado sugere que MinCe não é mais funcional. No entanto, outro resultado abaixo nos mostra a funcionalidade de todo o sistema Min (tabela 3).

TABELA 3 – NÚMERO DE COLÔNIAS OBTIDAS QUANDO SE TRANSFORMAVA PB114 OU PB114 pRARE COM DIFERENTES PLASMÍDEOS

Transformação	pJF119EH	pJFminC	pJFminCRBS	pJFminCDRBS	pJFminCDE	pJFminCDEEc
PB114	>1000	< 5	< 5	< 5	>1000	>1000
PB114 pRARE	>1000	0	0	0	>1000	>1000

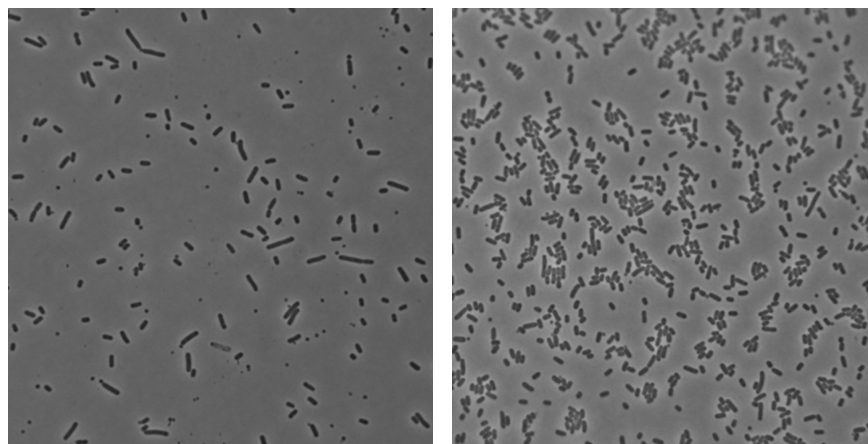
A cepa PB114 é um mutante que tem os genes *minCDE* deletados. O fenótipo dessa cepa é bem característico, já que não existe o controle espacial da formação do septo, função esta realizada pelo sistema *min*. Portanto, o sítio de divisão é formado em qualquer parte da célula. Portanto essa cepa apresenta tanto o fenótipo de mini-células (septo formado nos pólos), quanto de células filamentadas e células normais. Quando tentamos transformar essa cepa com o plasmídeo contendo só o gene *minC* ou os genes *minCD* do endosimbionte, as bactérias não foram capazes de proliferar, e portanto não obtivemos muitas colônias transformantes. Quando a mesma cepa foi transformada com os dois plasmídeos, mais o plasmídeo pRARE, o resultado negativo foi acentuado, e não foram obtidos transformantes. A conclusão é que MinCe e MinCDe podem estar interagindo com as outras proteínas do divisoma, inibindo então a formação do septo, levando as células a morte. No entanto, quando a cepa PB114 foi transformada com um plasmídeo contendo conjuntamente os genes *minCDE* do endosimbionte ou da própria *E. coli*, o número de colônias obtidas foi superior a 1000, o mesmo resultado foi obtido quando a cepa foi transformada com o vetor nativo. Neste caso, acreditamos que a proteína MinEe está suportando a divisão celular pela inibição do complexo MinCDe, permitindo a correta formação do septo. Isso sugere que de alguma maneira MinCe é funcional na divisão de *E. coli*. Contudo, não temos dados para afirmar que participe na divisão do endosimbionte.

A proteína MinE atua deslocando o complexo inibitório MinCD do centro da célula para os pólos, permitindo assim a formação de anel Z no centro e evitando a sua formação nos pólos (que são, pela sua vez, sítios potenciais de divisão). Um aumento dos níveis da MinE gera deslocamento do MinCD inclusive dos pólos, e assim a divisão pode também acontecer nessas regiões com a conseqüente ocorrência de mini-células (células pequenas, carentes de DNA) (DE BOER et al., 1989). Para obter informação sobre a possível funcionalidade da MinE do simbionte,

o gene *minEe* foi clonado em pJF119EH para a sua superexpressão em *E. coli*. Obtivemos então o plasmídeo pJFminEe.

Na figura 48 se observa o fenótipo resultante:

FIGURA 48 - EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE MinEe EM *Escherichia coli* UTILIZANDO O PLASMÍDEO pJFminEe

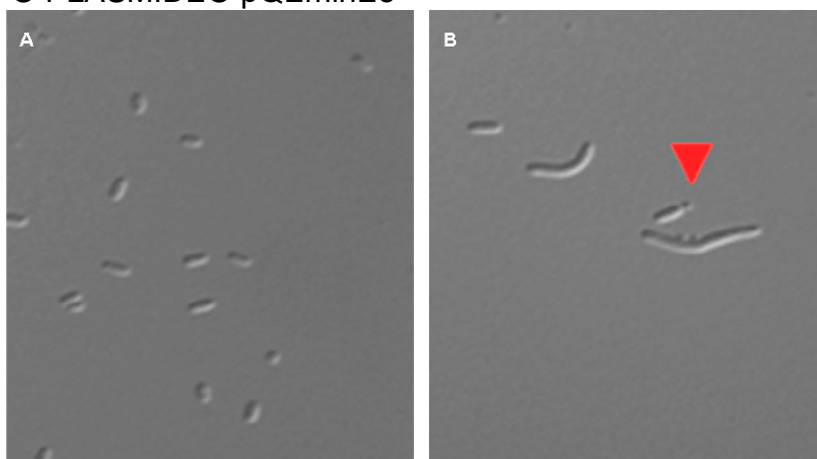


Efeito da superexpressão de MinEe em *E. coli*. A cepa Rosetta (contendo pRARE) foi transformada com o plasmídeo pJFminEe ou com o vetor vazio e as culturas crescidas durante 2 horas em 0,5 mM de IPTG. Algumas minicélulas estão assinaladas com setas vermelhas.

Fica claro que a presença de MinEe induz a formação de mini-células em *E. coli*, apontando à funcionalidade do sistema Min do simbiote na determinação da posição do aparelho de divisão na célula.

Com o plasmídeo pQEminEe, que expressa minEe com uma cauda de 6xHis, também se verifica o mesmo fenótipo (Figura 49).

FIGURA 49 - EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE MinEe EM *Escherichia coli* UTILIZANDO O PLASMÍDEO pQEminEe

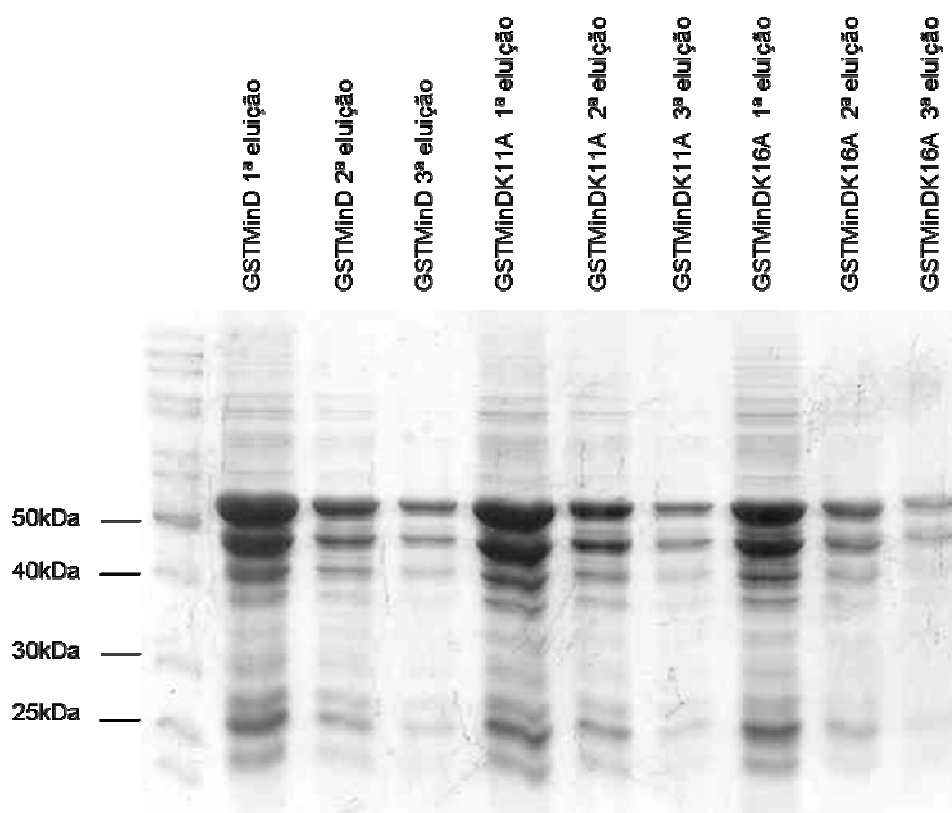


Efeito da superexpressão de MinDe em *E. coli* (cepa Top10F') contendo o plasmídeo pREP4 e pQEminCe induzida com IPTG 2mM. Em (A) Cultura de Top10F' pREP4 pQEminEe não induzida, (B) Cultura de Top10F' pREP4 pQEminEe induzida.

#### 4.4.2 Purificação de MinDe solúvel pra teste de atividade ATPásica

Como visto anteriormente, MinD é uma proteína bastante conservada e possui atividade ATPase. Portanto, avaliamos se MinDe ainda mantém essa atividade. A proteína MinDe foi purificada a partir da superexpressão do gene *minDe* na cepa Top10F' de *E. coli* contendo o plasmídeo pGEXminDe. Essa indução foi feita a baixa temperatura. Além disso, como mostrado anteriormente, os resíduos de lisina das posições 11 e 16 da proteína MinD tem fundamental importância na sua atividade ATPásica. Para avaliar se esses resíduos ainda continuam tendo um importante papel na proteína MinD do endossimbionte, mutações foram feitas, substituindo-se os resíduos de lisina por resíduos de alanina das posições citadas. Os plasmídeos contendo essas mutações foram denominados de pGEXminDK11A e pGEXminDK16A. A utilização desses mutantes também serviu de controle nesse ensaio, já que se poderíamos estar medindo a atividade de uma proteína inespecífica presente na purificação. As proteínas purificadas podem ser visualizadas na figura 50.

FIGURA 50 – PURIFICAÇÃO DE GST-MinDe, GST-MinDeK11A E GST-MinDeK16A MEDIANTE CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE

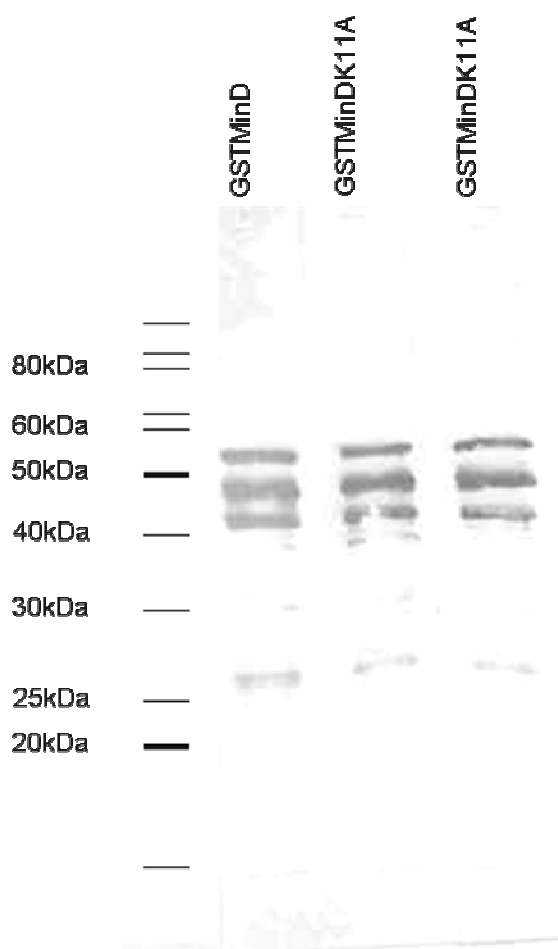


Purificação de GST-MinDe, GST-MinDeK11A e GST-MinDeK16A mediante cromatografia de afinidade. Alíquotas das três eluições realizadas para cada proteína foram aplicadas em um gel desnaturante de poliacrilamida 12% e coradas com Azul de Coomassie. As eluições foram feitas utilizando um tampão com excesso de glutationa livre.

A banda de 57 kDa corresponde à fusão de GST com MinDe e MinDe mutantes. Como não se obteve somente uma banda específica, fez-se *Western blot*, reagindo as frações eluídas com um soro anti-MinDe (Figura 51).



FIGURA 51 - WESTERN BLOT USANDO O SORO ANTI-MinDe OBTIDO EM CAMUNDONGOS E REAGIDO CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE PURIFICADA GST-MinDe E AS PROTEÍNAS MUTANTES GST-MinDeK11A e GST-MinDeK16A



LEGENDA: A reação foi contra a terceira eluição da purificação mostrada na figura 51 e utilizando anticorpo policlonal anti-MinDe. O Western blot foi revelado por fosfatase alcalina.

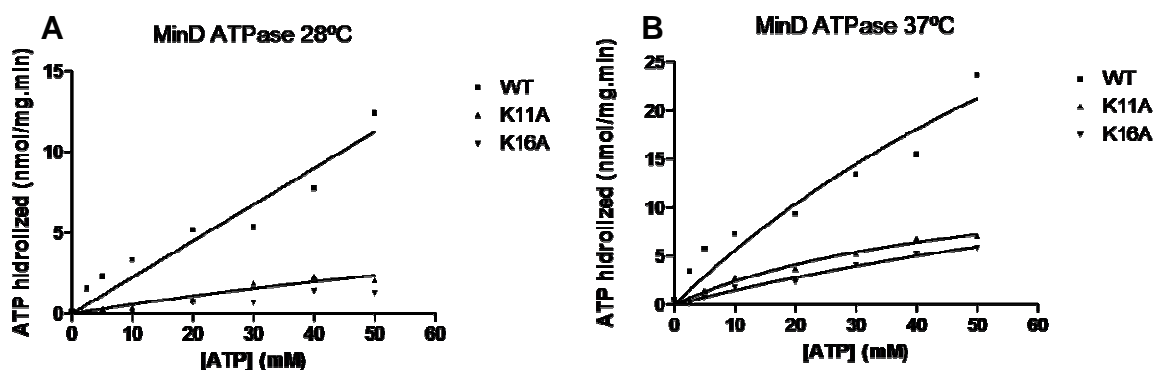
Apesar de purificação não apresentar bandas únicas, percebe-se que majoritariamente têm-se na purificação a proteína MinDe e degradações inerentes ao processo.

#### 4.4.2.1 Ensaio de atividade ATPase de MinDe, MinDeK11A e MinDeK16A

Os ensaios de atividade ATPase foram realizados simultaneamente com as três proteínas submetidas a duas diferentes temperaturas: 28 °C e 37 °C. A temperatura de 28 °C é a temperatura de incubação das culturas de

tripanosomatídeos com endosimbionte e a temperatura de 37 °C é a temperatura ótima para crescimento de muitas bactérias, inclusive *E. coli*, que é nosso organismo modelo. Os resultados obtidos estão representados na figura 52.

FIGURA 52 – ENSAIO DE ATIVIDADE ATPase DE MinD DO ENDOSIMBIONTE

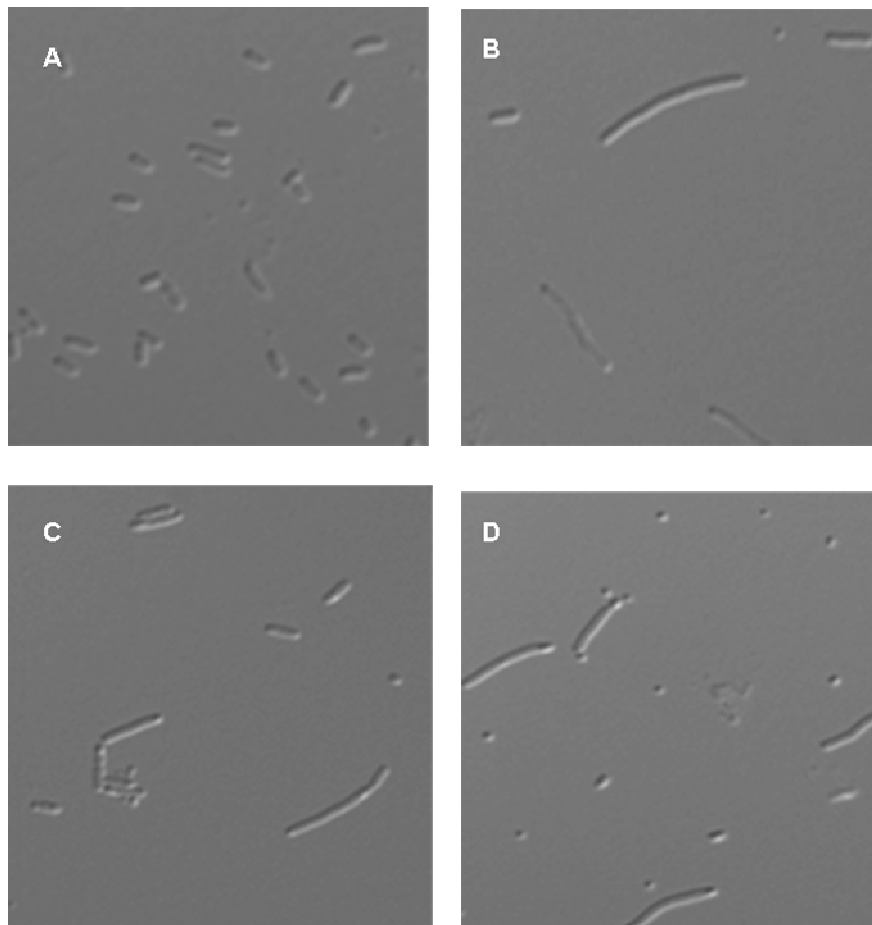


LEGENDA: GST-MinDe (WT), GST-MinDeK11A (K11A) e GST-MinDeK16A (K16A) foram incubadas durante uma hora a 28°C (A) e 37 °C (B) com concentrações crescentes de GTP, e a produção de Pi foi medida a 630nm.

Podemos observar que a proteína MinDe apresentou uma fraca atividade ATPásica. Em MinD de *E. coli* essa atividade é estimulada pela presença de MinE. No entanto, percebe-se claramente que as proteínas mutantes MinDeK11A e MinDeK16A possuem uma atividade ainda menor quando comparado com a proteína nativa. Isso mostra que os resíduos de lisina nas posições 11 e 16 são, de fato, importantes na atividade ATPase de MinDe. Todos esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos na literatura para a proteína MinD de *E. coli* (HAYASHI et al, 2001). Esse resultado também nos faz inferir de que a atividade detectada não se trata de uma proteína inespecífica, já que houve uma redução da atividade nas proteínas mutantes.

Para verificar se os mutantes MinDeK11A e MinDeK16A continuavam com capacidade de inibir a divisão, fez-se uma análise fenotípica de cepa de *E. coli* quando da sobreexpressão dessas proteínas mutantes. O resultado está mostrado na figura 53.

FIGURA 53 - EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE GST-MinDe, GST-MinDeK11A e GST-MinDeK16A EM *Escherichia coli*



Efeito da superexpressão de GST-MinDe e das proteínas mutantes GST-MinDeK11A e GST-MinDeK16A em *E. coli* (cepa Top10F'). A) Cultura de Top10F' contendo o plasmídeo pGEX-4T, (b) Cultura de Top10F' contendo o plasmídeo pGEXminDe, (C) Cultura de Top10F' contendo o plasmídeo pGEXminDeK11A, (D) Cultura de Top10F' contendo o plasmídeo pGEXminDeK16A. As culturas foram induzidas com IPTG 0,5mM..

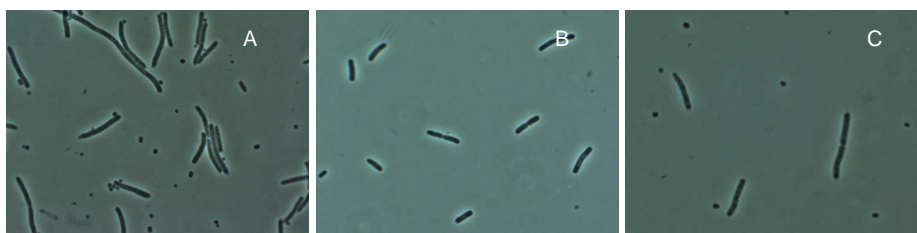
Podemos observar que as proteínas mutantes de MinDe continuam apresentando capacidade de inibir a divisão celular de *E. coli*, já que a filamentação continua ocorrendo. É interessante notar a grande presença de mini-células quando da expressão de MinDeK16A.

#### 4.4.3 Ensaio de complementação de minCDEe em *E. coli*

Mutantes de *E. coli* sem o operon *minCDE* ( $\Delta minCDE$ ) mostraram um fenótipo de mini-células, juntamente com células inusitadamente alongadas com conteúdo de DNA maior do que o normal (BI & LUTKENHAUS, 1993; DE BOER et al., 1989). Quando essas cepas mutantes são transformadas com plasmídeos contendo os

genes *minCDE*, elas recuperam o fenótipo normal. Para verificar a funcionalidade do sistema Min do simbionte, o operon *minCDEe* completo foi clonado no plasmídeo pJF119EH e o efeito da sua expressão no mutante de *E. coli* PB114 ( $\Delta$ *minCDE*, gentilmente fornecido pelo Dr. Piet de Boer, da Universidade de Ohio, EUA) foi analisado. Como controle negativo ou positivo utilizamos o plasmídeo vazio ou o pJFminCDEEc (portador do operon *minCDE* de *E. coli*), respectivamente (figura 54).

FIGURA 54 – ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO DE PB114 COM O OPERON *minCDE* DO ENDOSIMBIONTE CLONADO NO VETOR pJF119EH



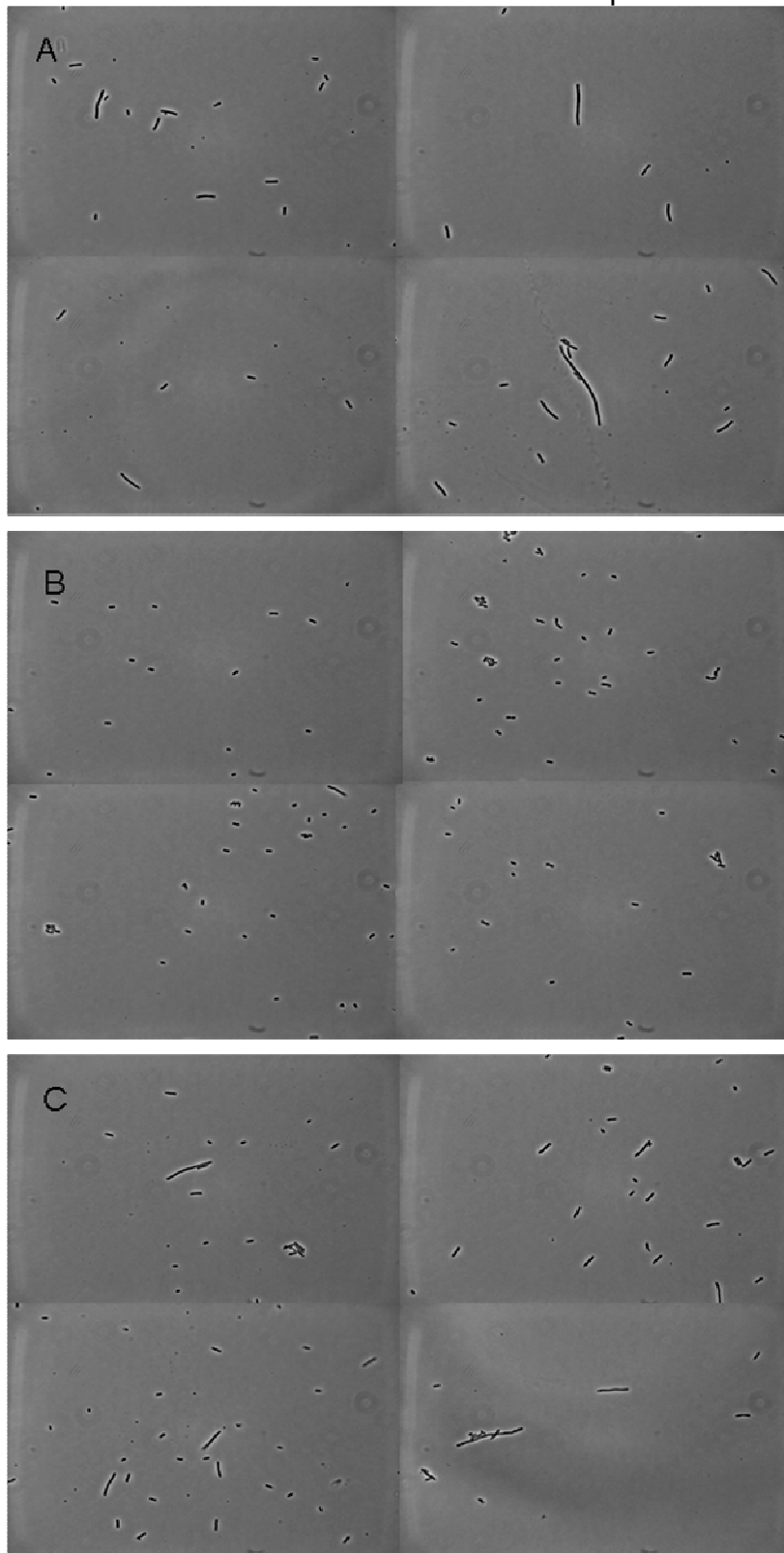
LEGENDA: Ensaio de complementação de PB114 (*minCDE::kan*) com o operon *minCDE* do simbionte. PB114 foi transformada com o vetor vazio (A), com o pJFminCDEEc (B) ou com o pJFminCDEe (C), e as células crescidas em LB contendo 0,5 mM de IPTG durante 2 horas.

O resultado obtido mostra que *minCDEe* clonado no vetor pJF119 não foi capaz de complementar a cepa mutante PB114. Segundo de Boer (1988), o operon *min* é capaz de complementar a cepa mutante *min* quando se utiliza um plasmídeo que se replica com baixo número de cópias (*low-copy*), mas a complementação não é conseguida com um plasmídeo com grande número de cópias (*high-copy*), indicando que os níveis de proteínas Min deve obedecer certa estequiometria (de aproximadamente 1-10 vezes os níveis fisiológicos) para ser funcional.

A fim de se obter um resultado mais conclusivo, adotamos a mesma estratégia de clonagem, mas agora utilizando o pBAD22 como vetor. Este vetor permite um fino controle nos níveis de expressão, já que é possível reduzir fortemente a expressão do gene de interesse na ausência do indutor e conseguir uma maior modulação nos níveis de expressão de acordo com a concentração do indutor (arabinose). No teste de complementação foram usadas várias concentrações de arabinose. Conseguimos complementar a cepa PB114 com o plasmídeo pBADminCDEEc com 0,0002% do indutor. Em concentrações maiores houve filamentação da cepa, no entanto não havia presença de mini-células, comprovando assim que a estequiometria de expressão do sistema Min é importante

para a divisão normal da célula bacteriana. O estudo de complementação utilizando o vetor pBAD22 pode ser visto na figura 55.

FIGURA 55 – ENSAIO DE COMPLEMENTAÇÃO DE PB114 COM O OPERON *minCDE* DO ENDOSIMBIONTE CLONADO NO VETOR pJF119EH

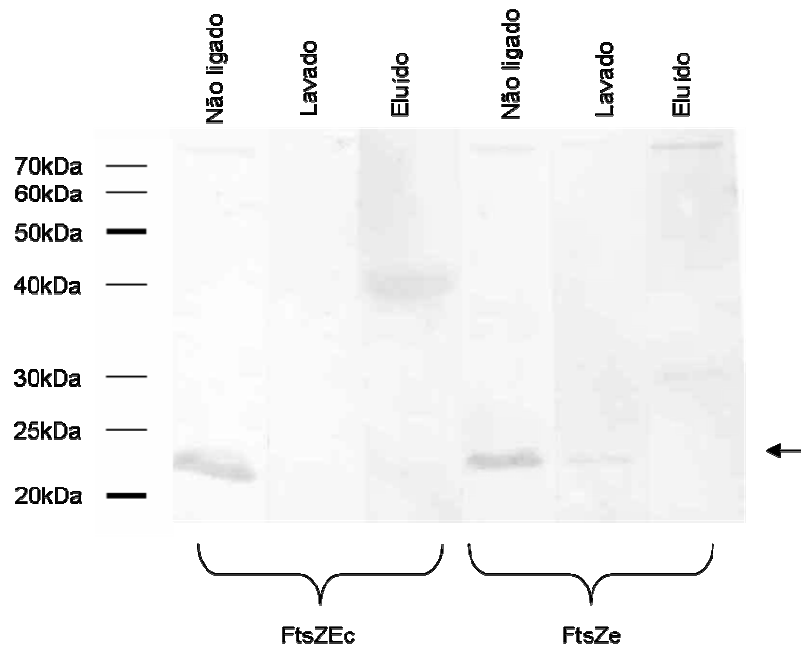


LEGENDA: Ensaio de complementação de PB114 (*minCDE::kan*) com o operon *minCDE* do simbionte. PB114 foi transformada com o vetor vazio (A), com o pBADminCDEEc (B ) ou com o pBADminCDEe (C), e as células crescidas em LB contendo 0,0002% de arabinose durante 2 horas.

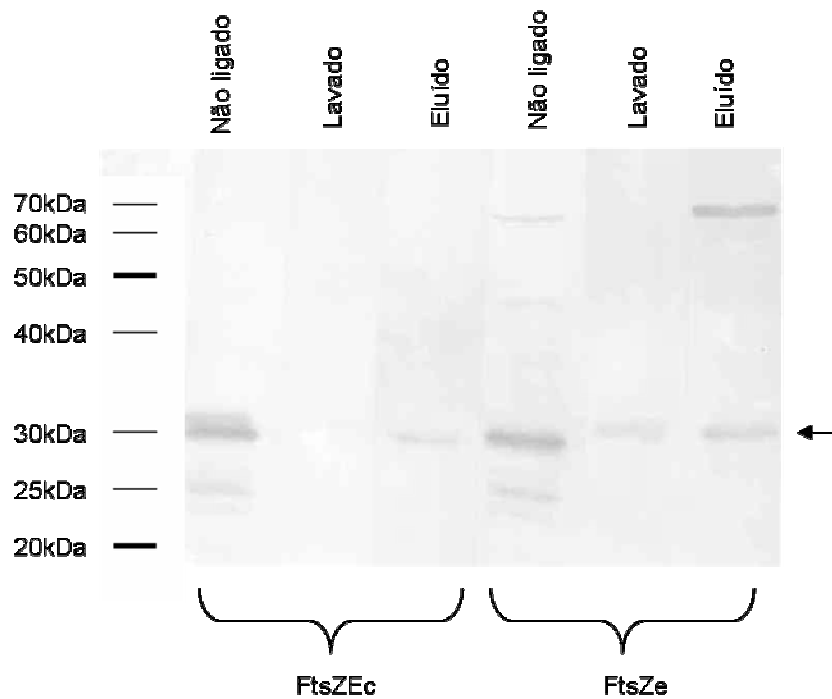
Observa-se que as células de PB114 portadoras do operon *minCDE* de *E. coli* se dividem normalmente, enquanto que as que possuem o *minCDE* do simbionte mostram fenótipo de mini-células e filamentos, similar ao observado nas células portadoras do vetor vazio. Podemos concluir que os genes *minCDE* do simbionte não são capazes de complementar a cepa PB114 quando se fez a utilização dos vetores pJF119 e pBAD22.

#### 4.4.4 Ensaio de interação

Como se pode perceber pelos dados já apresentados, toda a maquinaria de divisão atua como um grande complexo. Para verificar se as proteínas do divisoma do endosimbionte interagem entre si e com as proteínas de *E. coli*, realizamos um ensaio de *pull-down* utilizando GST-FtsZ ligado à resina de sepharose e FtsZEc ligado à resina de níquel-NTA (figura 56 e 57). Os testes foram feitos com extrato bacteriano da cepa PB114 pJFminCDEe induzida, pelo fato dessa cepa não possuir MinCDE endógenas, que poderiam interferir nos estudos de interação propostos e em virtude da impossibilidade de obtermos extrato de endosimbionte recém purificado.

FIGURA 56 – ENSAIO DE *PULL-DOWN* REAGIDO COM ANTI-MinCe

Nas primeira 3 tiras mostra a interação de FtsZEc com o extrato protéico de PB114 pJFminCDEe reagido com anticorpo monoclonal anti-MinCe. Nas outras três tiras mostra a interação de FtsZe com o extrato protéico de PB114 pJFminCDEe reagido com anticorpo monoclonal anti-MinCe. A seta mostra a banda corresponde a MinCe.

FIGURA 57 – ENSAIO DE *PULL-DOWN* REAGIDO COM ANTI-MinDe

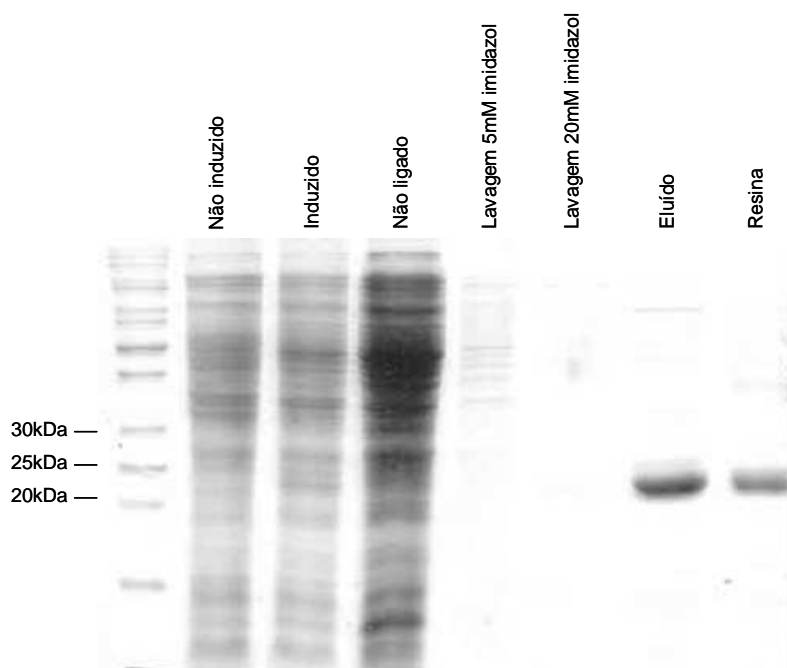
Nas primeira 3 tiras mostra a interação de FtsZEc com o extrato protéico de PB114 pJFminCDEe reagido com anticorpo monoclonal anti-MinDe. Nas outras três tiras mostra a interação de FtsZe com o extrato protéico de PB114 pJFminCDEe reagido com anticorpo monoclonal anti-MinDe. A seta mostra a banda corresponde a MinDe.

Podemos observar mais claramente a interação de MinDe com FtsZ de *E. coli* e com FtsZe. A interação de MinCe com a FtsZ não pode ser visualizada, pois reage fracamente com o antisoro policlonal. Esse ensaio será repetido, mas dessa vez utilizando o anticorpo monoclonal anti-MinCe. Não está descrito que MinD interaja diretamente com FtsZ. Essa interação que observamos através da técnica de *pull-down* pode ser consequência de proteínas intermediárias (formação de complexos) como, por exemplo, MinCe fazendo o papel de ponte entre MinDe e FtsZ. Nenhuma reação específica foi observada quando apenas GST foi utilizada como controle negativo.

Outro fato que sugere que ocorra interação entre as proteínas Min do endossimbionte e proteínas da maquinaria de divisão de *E. coli*, é a presença de FtsZ de *E. coli* quando da purificação de MinCe e MinDe recombinantes por cromatografia em resina de níquel-NTA. Durante o procedimento de purificação dessas proteínas, observamos que as frações eluídas quando submetidas a eletroforese em SDS-PAGE apresentavam uma proteína contaminante, de mesma massa em ambas as purificações, nos levando a acreditar de que poderia se tratar de uma proteína do complexo da maquinaria de divisão de *E. coli*. Uma vez que a presença dessa proteína poderia ser meramente devido a interações inespecíficas, resolvemos fazer outra purificação em condições mais estridentes, como a utilização de Triton X-100 1% na incubação com a resina e nas lavagens. As purificações podem ser visualizadas nas figuras 58 e 59.

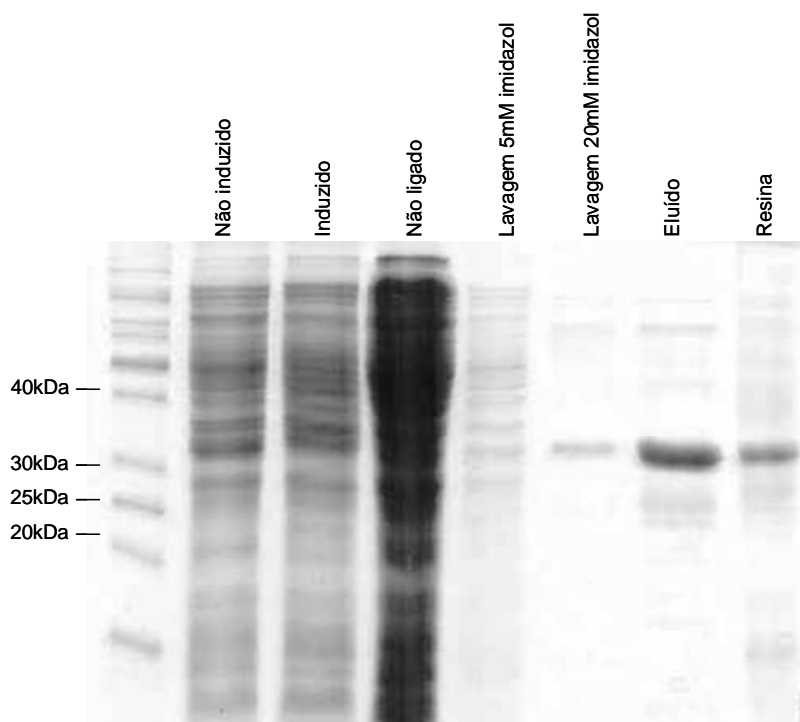


FIGURA 58 – PURIFICAÇÃO DE MinCe UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA



Purificação de MinCe mediante cromatografia de afinidade (Níquel-NTA). Alíquotas dos diferentes passos da purificação foram aplicadas num gel desnaturante de poliacrilamida 15% e coradas com Azul de Coomassie. A eluição foi realizada com 100mM de imidazol.

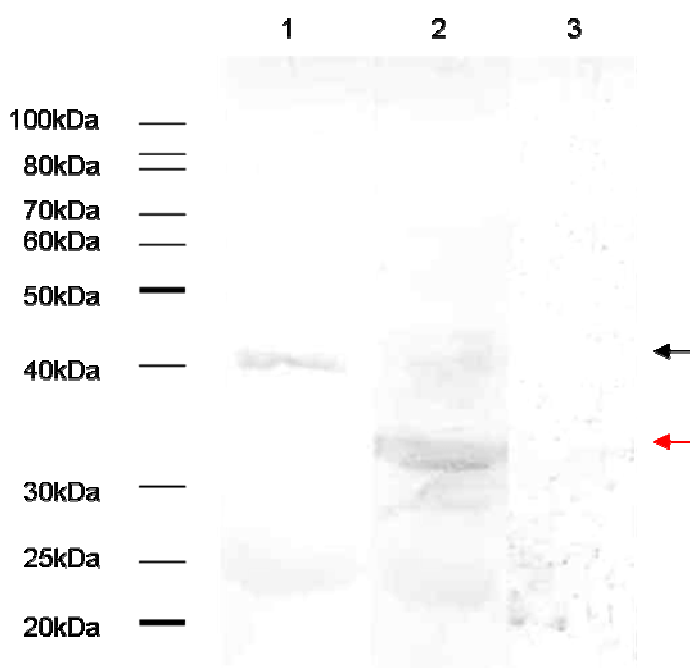
FIGURA 59 – PURIFICAÇÃO DE MinDe UTILIZANDO RESINA DE NÍQUEL-NTA



Purificação de MinDe mediante cromatografia de afinidade (Níquel-NTA). Alíquotas dos diferentes passos da purificação foram aplicadas num gel desnaturante de poliacrilamida 15% e coradas com Azul de Coomassie. A eluição foi realizada com 100mM de imidazol.

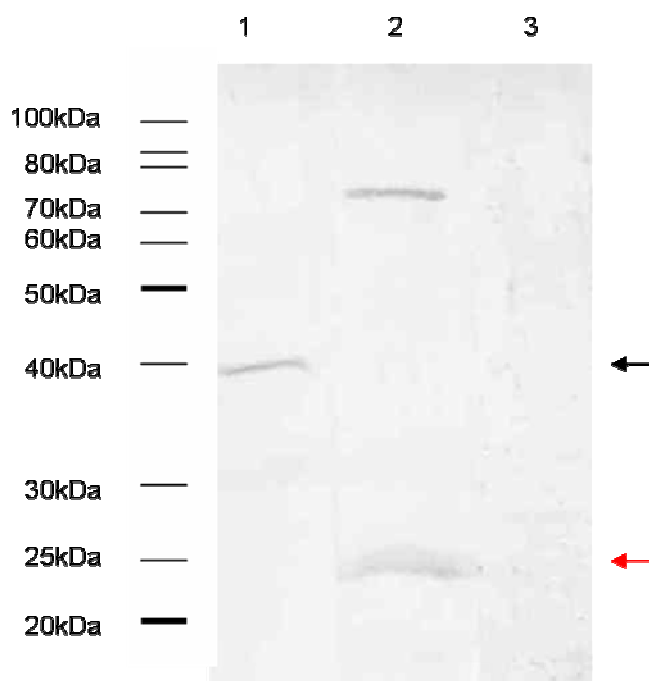
Uma alíquota da fração eluída da purificação de MinCe foi analisada por western blot usando antisoros contra as proteínas FtsZ, MinDe e GyrBe (figura 60). Da mesma forma, uma alíquota da fração eluída da purificação de MinDe foi analisada por western blot usando antisoros contra as proteínas FtsZ, MinCe e GyrBe (figura 61). O anticorpo anti-FtsZ foi produzido a partir da proteína de *E. coli*. Para MinC, MinD e GyrB, os antisoros foram produzidos a partir das respectivas proteínas do endossimbionte.

FIGURA 60 – ENSAIO DE INTERAÇÃO DE MinCe COM A MAQUINARIA DE DIVISÃO DE *Escherichia coli*



Western blot do material eluído mostrado na figura 58. Em (1) reação com o anticorpo policlonal anti-FtsZ<sub>Ec</sub>, em (2) reação com o anticorpo policlonal anti-MinDe e em (3) reação com o anticorpo policlonal anti-GyrBe. , banda FtsZ<sub>Ec</sub> está indicada pela seta preta, enquanto MinDEc é indicada pela seta vermelha.

FIGURA 61 – ENSAIO DE INTERAÇÃO DE MinDe COM A MAQUINARIA DE DIVISÃO DE *Escherichia coli*



Western blot do material eluido, mostrado na figura 59. Em (1) reação com o soro anti-FtsZ<sub>Ec</sub>, em (2) reação com soro anti-MinCe e em (3) reação com o soro anti-GyrBe. A proteína FtsZ<sub>Ec</sub> está indicada pela seta preta, enquanto que a seta vermelha indica a banda correspondente a MinCEc.

Pelo resultado do western blot, podemos observar que MinCe e MinDe interagem com FtsZ de *E. coli*. MinCe interage com MinD de *E. coli*. MinDe interage com MinC de *E. coli*. O anticorpo anti-GyrB foi utilizado como controle negativo. É possível que na purificação de MinCe e MinDe possa estar ocorrendo a copurificação de outras proteínas do divisoma de *E. coli* (ZipA, FtsK, ...). Para comprovar isso estamos produzindo antisoros contra essas outras proteínas.

Esse resultado corrobora nossa hipótese de que o sistema Min continua funcional no endosimbionte.

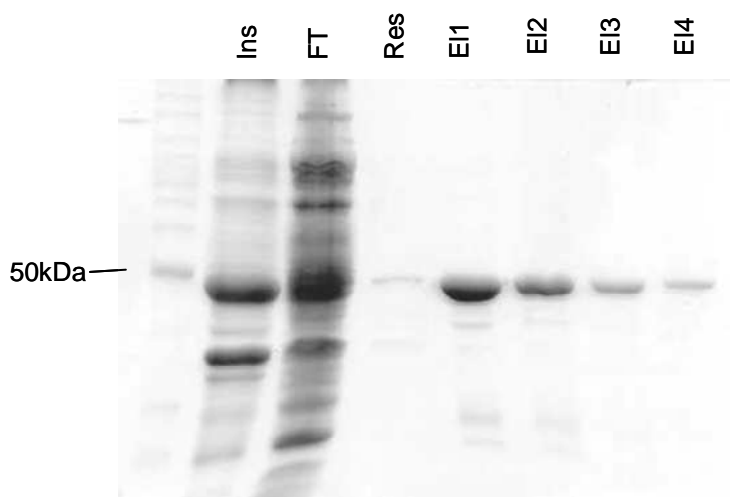
## LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA Min NO ENDOSIMBIONTE

### 4.4.5 Purificação de MinCe, MinDe, MinEe para produção de anti-soro específico

Com o objetivo de localizar as proteínas do sistema Min no endosimbionte, construímos plasmídeos contendo os genes Min individuais fusionados com o gene da GST (Glutathione S-Transferase). Bactérias expressando esses genes quimeras produzem proteínas recombinantes fusionadas a GST que podem ser purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando resina de glutathione-sepharose. As

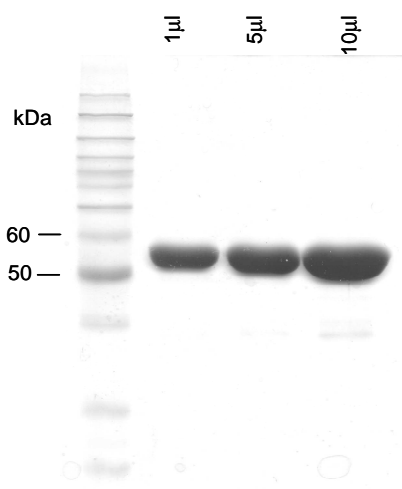
proteínas recombinantes purificadas dessa maneira podem então ser utilizadas para a produção de anti-soro específico para as proteínas MinC, MinD e MinE do endosimbionte. Os plasmídeos pGEXMinCe, pGEXminDe e pGEXminEe foram introduzidos na cepa Top10F' e a produção das respectivas proteínas induzida com IPTG. Nestas condições foram observadas bandas com o peso molecular esperado para as fusões (GST-MinC com 50 kDa, GST-MinD com 55 kDa , GST-MinE com 35 kDa). Como os níveis de indução foram muito pobres, usamos a cepa Rosetta (DE3) pRARE. Essa cepa possui o plasmídeo pRARE que contém genes para certos tRNAs que são pouco abundantes em *E. coli* (que reconhecem os códons: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Assim, é possível aumentar a expressão de genes heterólogos que em condições normais seriam expressos muito pobremente. Nestas condições, a produção das proteínas recombinantes aumentou consideravelmente, o que permitiu obter suficiente quantidade de proteína purificada para imunizar camundongos. As figuras 62, 63 e 64 a seguir mostram a purificação dessas proteínas recombinantes.

FIGURA 62 - PURIFICAÇÃO DE GST-MinCe



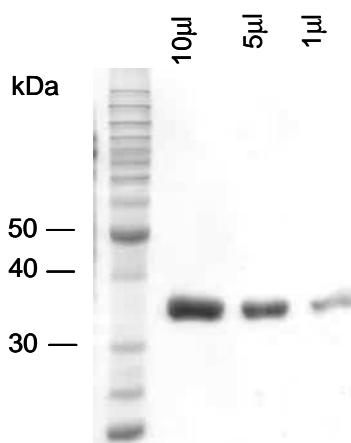
Purificação de GST-MinCe mediante cromatografia de afinidade. Aliquotas dos diferentes passos da purificação foram aplicadas num gel de SDS-PAGE contendo 10% de poliacrilamida, corado com Azul de Coomassie. Ins: insolúvel após da sonicação. FT: material não retido após passagem pela resina de Glutathionasepharose. Res: material retido na resina. E1-E4: eluições do material retido usando um tampão com excesso de glutathion livre.

FIGURA 63 - PURIFICAÇÃO DE GST-MinDe



Análise da purificação do corpúsculo de inclusão da fusão GST-MinDe por SDS-PAGE

FIGURA 64 - PURIFICAÇÃO DE GST-MinEe



Análise da purificação do corpúsculo de inclusão da fusão GST-MinE por SDS-PAGE

A análise por Western blot dos soros obtidos está representada na figura 65. Somente se conseguiu soros anti-MinCe e MinDe.

FIGURA 65 – WESTERN BLOT UTILIZANDO SOROS ANTI-MinCe E ANTI-MinDe

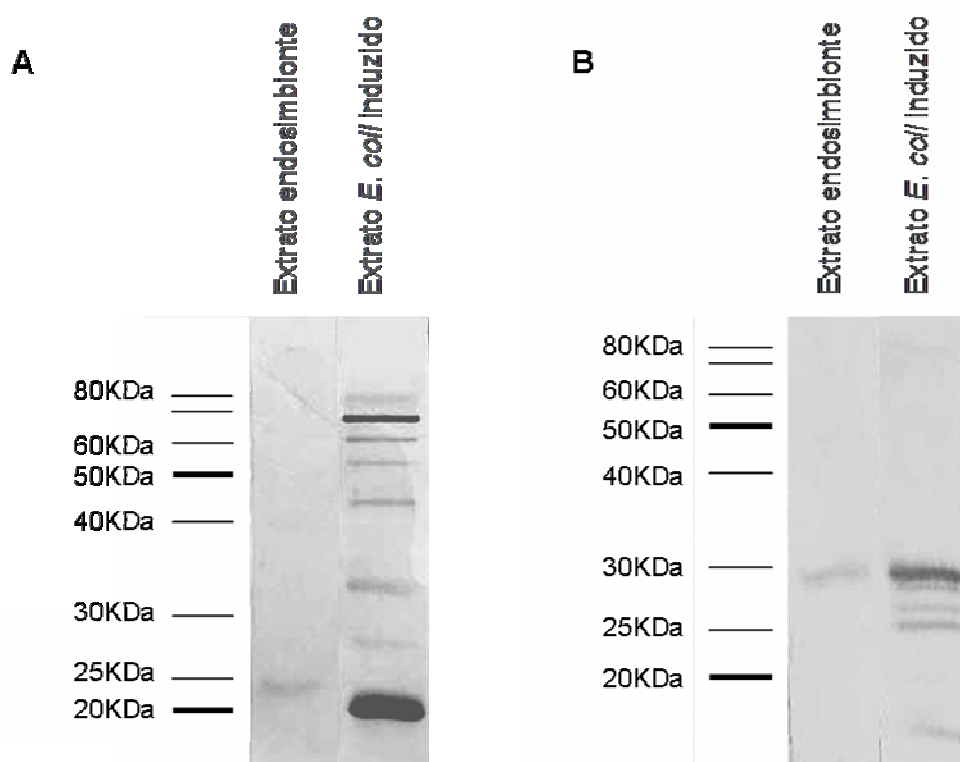
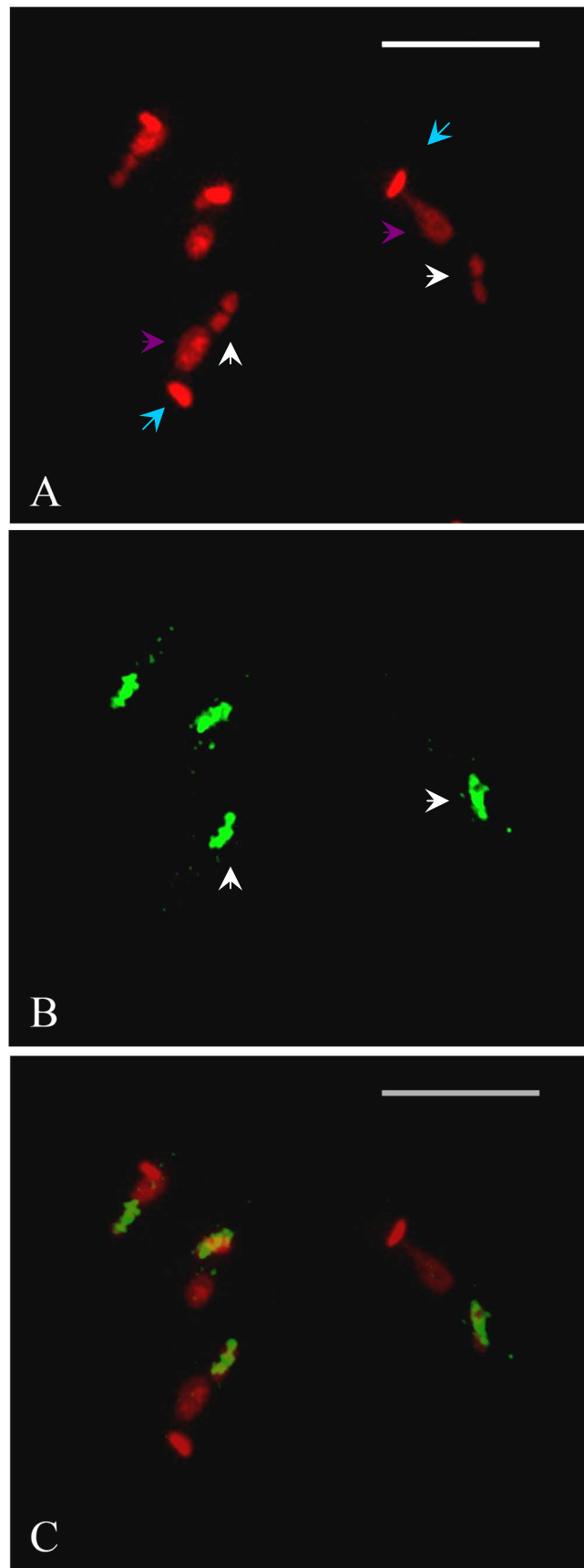


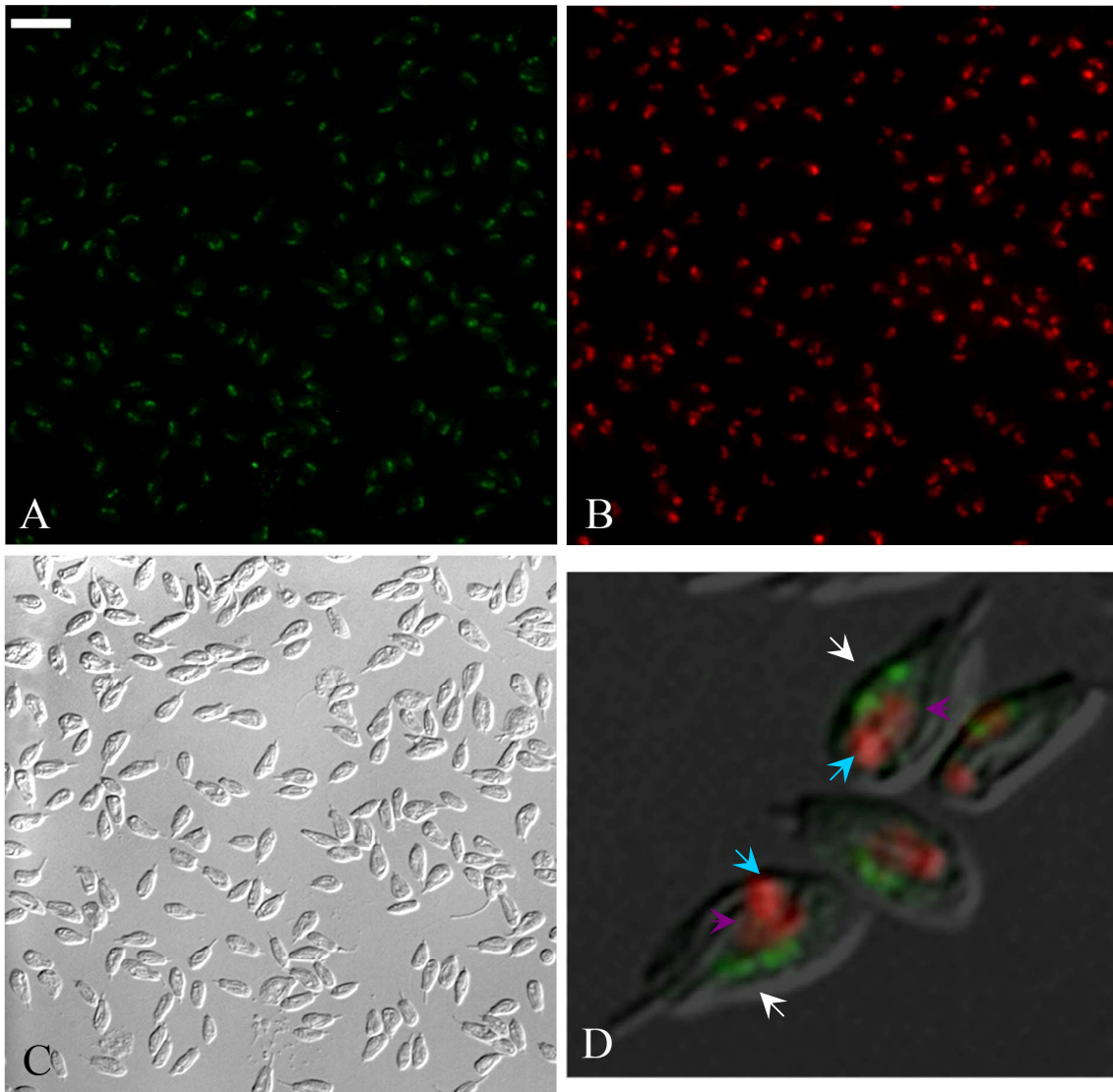
Figura 54 - Western blot usando anti-soro anti-MinCe (A) e anti-MinDe (B) obtidos em camundongos. Extrato *E. coli* induzido: *E. coli* transformada com o pJFminCDEe e induzida com IPTG. O Western blot foi revelado por fosfatase alcalina

Observa-se pela análise de western blot que as proteínas MinCe e MinDe sintetizadas pela *E. coli*, a partir da expressão dos genes *minCe* e *minDe* inseridos no vetor pJFminCe e pJFminDe respectivamente, são claramente reconhecidas pelos soros, mas as proteínas MinC e MinD presentes no extrato protéico do simbionte são fracamente identificadas. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, em condições fisiológicas, os níveis de MinC e MinD em *E. coli* são baixos ( $400 \pm 80$  moléculas/célula para MinC). Se os níveis de MinC no endosimbionte forem similares aos de *E. coli*, é possível a quantidade dessa proteína presente no extratos utilizados esteja no limite de detecção da técnica imunológica utilizada.. Outro problema recorrente na produção dos anticorpos policlonais foi conseguir camundongos em que o soro pré-imune não reagisse com proteínas dos tripanosomatídeos e também do endosimbionte.

As figuras 66, 67 e 68 a seguir mostram a imunolocalização das proteínas MinCe e MinDe no endosimbionte dos tripanosomatídeos utilizando-se os soros anti-MinCe e anti-MinDe, respectivamente.

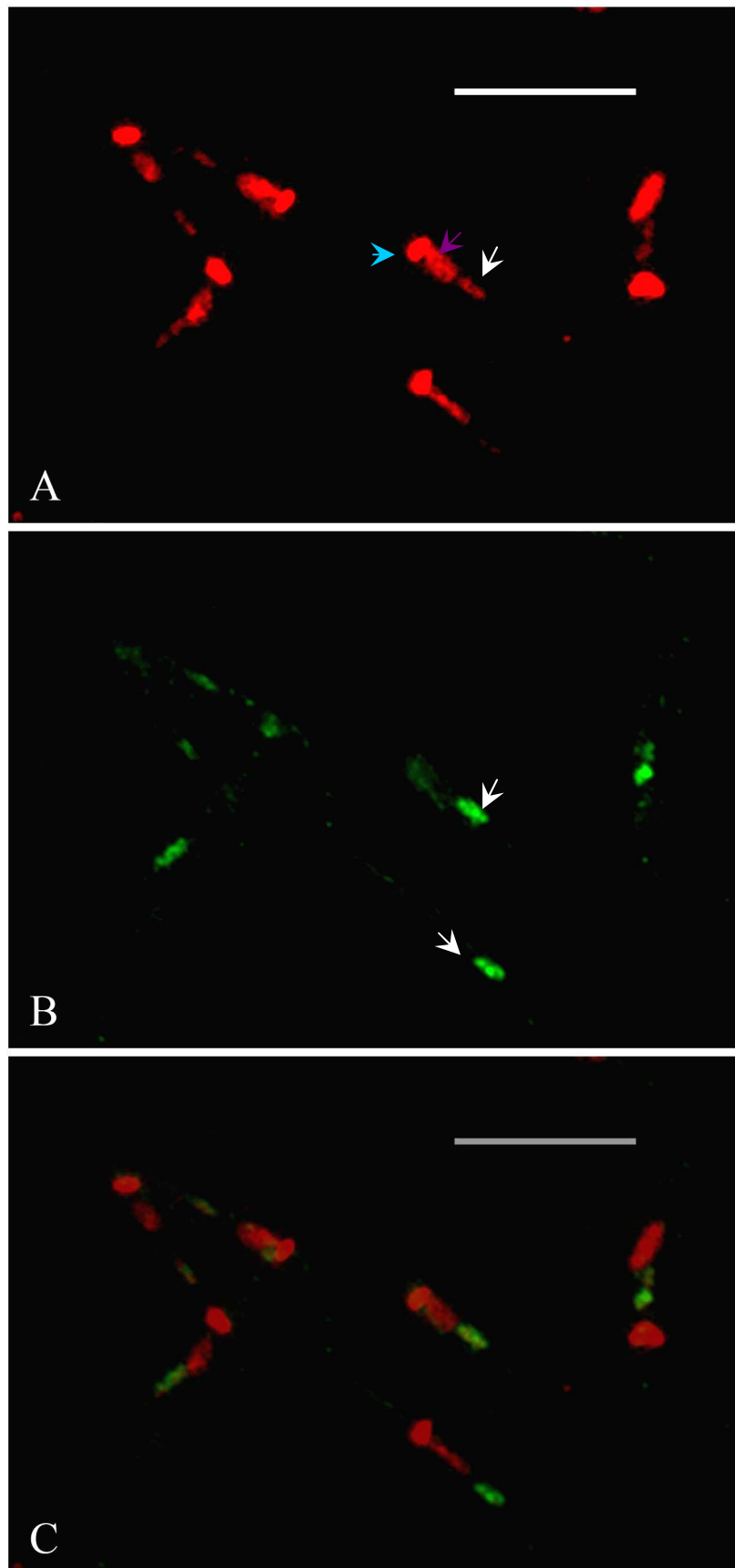
FIGURA 66 - IMUNOLocalização DE MinCe EM *B. culicis*

A) Marcação com iodeto de propídeo. B) Anticorpo secundário conjugado ao Alexa Flúor 488. C) Sobreposição das imagens A e B. Em setas azuis está representado o cinetoplasto, em roxo, o núcleo e em branco o endosimbionte. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

FIGURA 67 - IMUNOLocalização DE MinCe EM *C. deanei*

A) Marcação com iodeto de propídeo. B) Anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 488. C) Campo claro. D) Sobreposição ampliada. Em setas azuis está representado o cinetoplasto, em roxo, o núcleo e em branco o endosimbionte. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .



FIGURA 68 - IMUNOLocalização DE MinDe EM *B. culicis*

A) Marcação com iodeto de propídeo. B) Anticorpo secundário conjugado ao Alexa Fluor 488. C) Sobreposição das imagens A e B. Em setas azuis está representado o cinetoplasto, em roxo, o núcleo e em branco o endosimbionte. A barra representa 10  $\mu\text{m}$ .

Portanto, os soros anti-MinCe e anti-MinDe reconhecem seus antígenos no endosimbionte. Espera-se que essas proteínas tenham uma localização nos pólos. No entanto, com este tipo de microscopia não é possível ter essa percepção mais afinada.

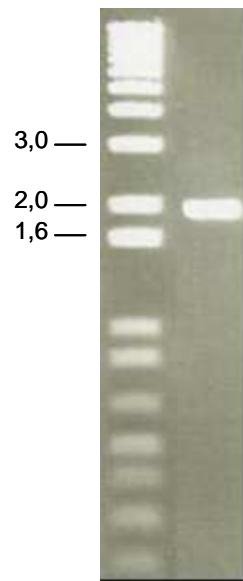
## **A PROTEÍNA Dinamina SE CO-LOCALIZA COM O ENDOSIMBIONTE**

### **4.5 LOCALIZAÇÃO DA DINAMINA COM FUSÃO À GFP NO TRIPANOSOMATÍDEO *Blastocrithidia culicis***

Uma importante característica dos tripanosomatídeos contendo simbiontes até agora estudados é que há apenas uma bactéria por célula hospedeira. Outra característica é que a divisão do endosimbionte é coordenada com a divisão do tripanosomatídeo hospedeiro. Essas duas características sugerem que a célula hospedeira dispõe de mecanismos para regular a divisão da bactéria simbiótica. Como discutido na Introdução, a dinamina e proteínas do tipo dinamina (dinamina-like) que estão codificadas no núcleo de eucariontes primitivos são responsáveis pelo processo final na fissão de plastídeos. Partindo desse conhecimento, iniciamos a investigação sobre a possível participação da dinamina na divisão do endosimbionte. Para testar essa hipótese, o gene da dinamina foi clonado em fusão com o gene da GFP em um plasmídeo, o qual foi posteriormente usado para transfectar cepas normais de *C. deanei* e *B. culicis*, seguida da observação dos protozoários transfectados por microscopia de fluorescência.

Uma vez que o gene da dinamina de *C. deanei* não está caracterizado, resolvemos utilizar a informação sobre o gene da dinamina de *T. cruzi*, (disponível no portal [www.genedb.org](http://www.genedb.org)) para desenhar oligonucleotídeos. Embora esses genes sejam bem conservados em *T. cruzi*, *Leishmania* e *T. brucei*, não conseguimos obter amplificação usando o DNA genômico de *C. deanei*. Então, fizemos a clonagem utilizando o gene da dinamina amplificado do DNA genômico de *T. cruzi* (Figura 69). O plasmídeo resultante foi denominado de pTEXGFPDnm. A transfecção foi feita em *C. deanei* e *B. culicis*. No entanto, conseguimos clones transfectantes apenas com *B. culicis*.

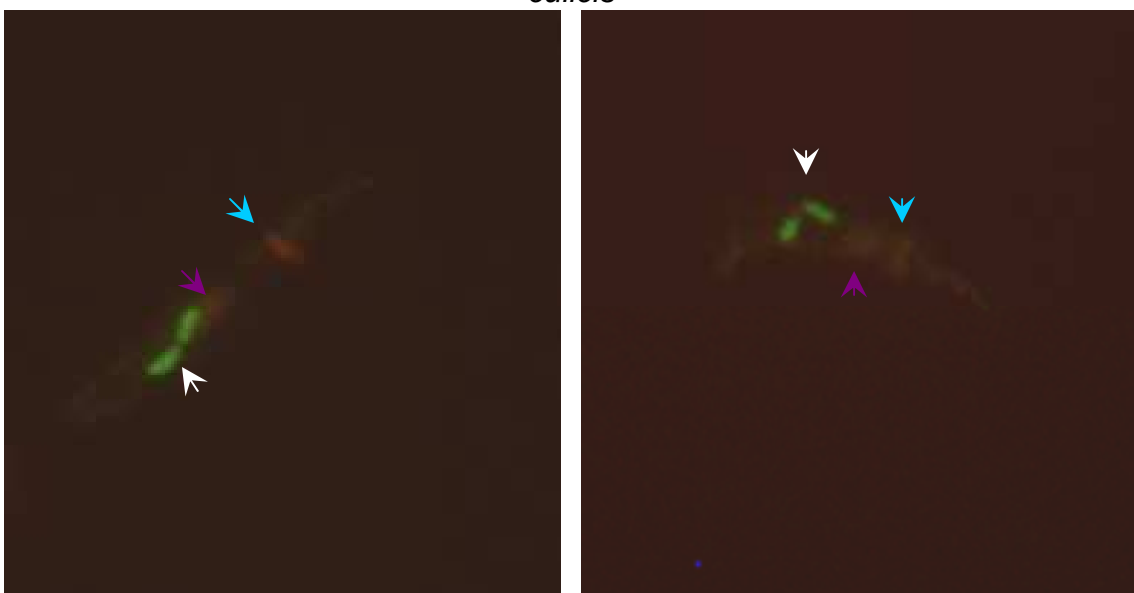
FIGURA 69 – AMPLIFICAÇÃO DO GENE DINAMINA DO *T. cruzi*



Eletroforese em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação do gene *dnmTc*. O marcador utilizado foi o DNA 1Kb ladder plus, as bandas estão indicadas em kb.

A proteína GFP-Dinamina nos protozoários transfectados foi identificada por microscopia de fluorescência indireta usando anticorpo monoclonal anti-GFP, seguida da incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa Flúor 488 (Figura 70).

FIGURA 70 – CO-LOCALIZAÇÃO DE GFP-DINAMINA NO ENDOSIBIONTE DE *B. culicis*



Em setas azuis está representado o cinetoplasto, em roxo, o núcleo e em branco o endosimbionte.

Nessas imagens todo o endosimbionte está marcado. No entanto, acreditamos que esse padrão de marcação seja devido ao estágio de divisão do endosimbionte. Nossa hipótese é que no começo da divisão nenhuma dinamina se encontra associada ao endosimbionte, e apenas as proteínas de divisão do endosimbionte estão atuando. À medida que a divisão vai chegando ao seu termo, a dinamina se concentra no lado exterior do sítio de constrição, finalizando o processo de divisão, em um processo conjunto com o divisoma bacteriano. Como visto na figura 70, a dinamina ainda está associada o endosimbionte que já se dividiu. Nossa hipótese é que essa proteína tenha papel importante, juntamente com outras proteínas da célula hospedeira ainda não caracterizadas, na segregação do endosimbionte, garantindo que cada protozoário, depois da divisão, contenha um único endosimbionte. Esse resultado é bastante promissor. No entanto, análises mais minuciosas devem ser realizadas.

## 5 CONCLUSÕES

- 1) O gene *zipA* encontra-se presente no genoma do endosimbionte de *C. deanei*.
- 2) ZipAe tem maior homologia com a proteína ortóloga de bactérias do gênero *Bordetella sp.*
- 3) Superexpressão de ZipAe é capaz de filamentar cepa de *Escherichia coli*, estando de acordo com o descrito na literatura
- 4) O gene *ftsK* encontra-se presente no genoma do endosimbionte de *C. deanei*.
- 5) FtsKe tem maior homologia com bactérias do gênero *Bordetella*.
- 6) FtsKe possui atividade ATPásica, característico de proteínas translocase.
- 7) FtsZe é capaz de polimerizar, característica essencial pra formação do anel Z.
- 8) Os genes *minCDE* encontram-se presente no genoma do endosimbionte de *C. deanei*. As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir desses genes mostraram maior homologia com os ortólogos de *Bordetella sp.*
- 9) Superexpressão de MinCe não é capaz de filamentar cepa de *Escherichia coli*.
- 10) Superexpressão de MinDe é capaz de filamentar cepa de *Escherichia coli*.
- 11) Superexpressão de MinEe é capaz de produzir o fenótipo ca cepa mutante PB114, estando de acordo com o descrito na literatura.
- 12) MinDe possui atividade ATPase e essa atividade é diminuída nos mutantes MinDeK11A e MinDeK16A, mostrando que os resíduos de lisina na posição 11 e 16 são importante para esse atividade, como descrito na literatura.
- 13) Análise por microscopia de fluorescência mostra que antisoros anti-MinCe e MinDe reconhecem esses antígenos no endosimbionte.
- 14) MinCe interage com FtsZ e MinD de *Escherichia coli*.
- 15) MinDe interage com FtsZe, FtsZ e MinC *Escherichia coli*.
- 16) Dinamina pode estar atuando no processo de divisão do endosimbionte e pode ser um mecanismo usado pela célula hospedeira para controlar a divisão da bactéria endosimbiótica..

## REFERÊNCIAS

- AARSMAN, M.; PIETTE, A.; FRAIPONT, C.; INKENVLEUGEL, T.; NGUYEN-DISTÈCHE.; DEN BLAAWEN, T. **Maturation of the *Escherichia coli* divisome occurs in two steps.** Mol. Microbiol. 55: 1631-1645, 2005.
- ANDERSSON, S. G. E.; KURLAND, C. G. **Reductive evolution of resident genomes.** Trends Microbiol. 6: 263-268, 1998.
- ANDERSON, D. E.; GUEIROS-FILHO, F. J.; ERICKSON, H. P. **Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*, the effects of FtsZ-regulating proteins.** J Bacteriol 186: 5775–5781, 2004.
- AUSSEL, L.; BARRE, F. X.; AROYO, M.; STASIAK, A.; STASIAK, A. Z.; SHERRATT, D. **FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases.** Cell 108: 195–205, 2002.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. & STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology.** Green Publishing Associates and Wiley, New York, NY, 1988.
- BAUMANN, L.; BAUMANN, P. **Characterization of *ftsZ*, the cell division gene of *Buchnera aphidicola* (endosymbiont of aphids) and detection of the product.** Current Microbiology 36: 85-89, 1998.
- BEGG, K. J., DEWAR, S. J., DONACHIE, W. D. **A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*.** Journal of Bacteriology 177: 6211-6122, 1995.
- BI E.; LUTKENHAUS, J. **Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring.** J Bacteriol. 175:1118-25, 1993.
- BIGOT, S.; CORRE, J.; LOUARN, J. M.; CORNET, F.; BARRE, F. X. **FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein.** Mol Microbiol. 54: 876-86, 2004.
- BIGOT, S.; SIVANATHAN, V.; POSSOZ, C.; FRANÇOIS-XAVIER, B.; CORNET, F. **FtsK, a literature chromosome segregation machine.** Molecular Microbiology 64: 1431-1441, 2007.
- BLEAZARD, W.; McCAFFERY, J. M.; KING, E. J.; BALE, S.; MOZDY, A.; TIEU, Q.; NUNNARI, J.; SHAW, J. M. **The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast.** Nature Cell Biol. 1: 298-304, 1999.
- BRUESKE, W.A. **The diplosome of *Blastocrithidia culicis*** (Novey, Mc Neal and Torrey, 1907) (Mastigophora: Trypanosomatidae). 1967. Tese – Universidade de Minnesota, Minneapolis, Minn. pp. 77-401.
- CARBALLIDO-LOPEZ, R.; ERRINGTON, J. **The bacterial cytoskeleton: in vivo**

dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell* 4: 19–28, 2003.

CAVALIER-SMITH, T. **The simultaneous symbiotic origin of mitochondria, chloroplasts and microbodies.** *Ann. New York Acad. Sci.* 503: 55-71, 1987.

CHANG, H.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 in *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti* freed of intracellular symbionts by chloramphenicol.** *J. Protozool.* 22: 271-276, 1975.

DE BOER, P. A.; CROSSLEY, R. E.; ROTHFIELD, L. I. **Isolation and properties of *minB*, a complex genetic locus involved in correct placement of the division site in *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol* 170:2106-12, 1988.

DE BOER, P. A.; CROSSLEY, R. E.; ROTHFIELD, L. I. **A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the *minicell* locus determines the proper placement of the division septum in *E. coli*.** *Cell* 56:641-649, 1989.

DE BOER, P. A.; CROSSLEY, R.; ROTHFIELD, L. **The essential bacterial cell-division protein *FtsZ* is a GTPase.** *Nature* 359: 254–256, 1992a.

DE BOER, P. A, ROBIN, E.; CROSSLEY, R. E.; LAWRENCE I.; ROTHFIELD, L. I. **Roles of *MinC* and *MinD* in the site-specific septation block mediated by the *MinCDE* system of *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* 174:63-70, 1992b.

DE SOUZA, W.; MOTTA, M. C. M. **Endosymbiosis in protozoa of *Trypanosomatidae* family.** *FEMS Microbiol. lett.* 173: 1-8, 1999.

DRAPER, G. C.; McLENNAN, N.; BEGG, K.; MASTERS, M.; DONACHIE, W. D. **Only the N-terminal domain of *FtsK* functions in cell division.** *J. Bacteriol.* 180: 4621–4627, 1998.

DU, Y.; DMITRI, A. M.; CHANG, K. P. **Monophyletic origin of ( $\beta$ -division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 8437-8441, 1994a.

DU, Y.; McLAUGHLIN, G.; CHANG, K.P. **16S ribosomal DNA sequence identities of  $\beta$ -proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species.** *J. Bacteriol.* 176: 3081-3084, 1994b.

DWYER, D. M.; CHANG, H. P. **Surface membrane carbohydrate alterations of a flagellated protozoan mediated by bacterial endosymbiontes.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73: 852-856, 1976.

ERRINGTON, J.; DANIEL R. A.; SCHEFFERS, D. J. **Cytokinesis in bacteria.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 52-65, 2003.

ESPELI, O.; LEVINE, C.; HASSING, H.; MARIANS, K. J. **Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*.** *Mol. Cell* 11, 189–201, 2003.

ESTEVEZ, M. J. G.; ANDRADE, A. F. B.; ANGLUSTER, J. **Cell surface carbohydrates in *Crithidia deanei*: influence of the endosymbiote.** *Eur. J. Cell Biol.* 26: 244-248, 1982.

FARIA E SILVA, P. M.; SOLE-CAVA, A. M.; SOARES, M. J.; MOTTA, M. C. M.; FIORINI, J. E.; DE SOUZA, W. ***Herpetomonas roitmani*: a trypanosomatid with a bacterium-like endosymbiont in the cytoplasm.** *J. Protozool.* 38: 489-494, 1991.

FIORINI, J. E.; FARIA-E-SILVA, P. M.; BRAZIL, R. P. **Três novas espécies de tripanosomatídeos de insetos isolados em Alfenas, Minas gerais, Brasil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84: 69-74, 1989.

FREYMULLER, E.; CAMARGO, E. P. **Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts.** *J. Protozool.* 28: 175-182, 1981.

FROSSARD, M. L., SEABRA, S. H.; DAMATTA, R. A., DE SOUZA, W.; DE MELLO, F. G.; MOTTA, M. C. M. **Na endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343: 443-449, 2006.

FURSTE, J. P.; PANSEGRAU, W.; FRANK, R.; BLOCKER, H.; SCHOLZ, P.; BAGDASARIAN, M.; LANKA, E. **Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector.** *Gene* 48: 119-131, 1986.

GADELHA, C.; WICKSTEAD, B.; DE SOUZA, W.; GULL, K.; CUNHA-E-SILVA, N. **Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa.** *Eukaryotic Cell* 4: 516-525, 2005.

GEISSLER, B., ELRAHEB, D., AND MARGOLIN, W. **A gain-of function mutation in *ftsA* bypasses the requirement for the essential cell division gene *zipA* in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4197–4202, 2003.

GILL, J. W.; VOGEL, H. J. **Lysine synthesis and phylogeny: biochemical evidence for a bacterial type endosymbiont in the protozoan *Herpetomonas (Strigomonas) oncopelti*.** *Biochim. Biophys. Acta.* 56: 200-201, 1962.

GILL, J. W.; VOGEL, M. J. **A bacterial endosymbiont in *Crithidia (Strigomonas) oncopelti*: biochemical and morphological aspects.** *J. Protozool.* 10: 148-152, 1963.

GRAY, M. W.; BURGER, G.; LANG, B. F. **Mitochondrial evolution.** *Science* 283, 1476-1481, 1999.



GUZMAN, L.-M.; BELIN, D.; CARSON, M.; BECKWITH, J. **Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter.** J. Bacteriol. 177: 4121-4130, 1995.

HALE, C. A.; DE BOER, P. A. **Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*.** Cell. 88:175-85, 1997.

HANEY, S. A.; GLASFELD, E.; HALE, C.; KEENEY, D.; HE, Z.; DE BOER, P. **Genetic analysis of the *Escherichia coli* FtsZ-ZipA interaction in the yeast two-hybrid system.** Characterization of FtsZ residues essential for the interactions with ZipA and with FtsA. J Biol Chem 276: 11980-11987, 2001.

HAYASHI, I.; OYAMA, T.; MORIKAWA, K. **Structural and functional studies of MinD ATPase: implications for the molecular recognition of the bacterial cell division apparatus.** EMBO J. 20:1819-1828, 2001.

HIMMELREICH, R.; HILBERT, H.; PLAGENS, H.; PIRKL, E.; LI, B. C.; HERRMANN R. **Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*.** Nucleic Acids Res. 24: 4420-4449, 1996.

HINSHAW, J. E. **Dynamin and its role in membrane fission.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16: 483-519, 2000.

HOENIG, M.; LEE, R. J.; FERGUSON, D. C. **A microtiter plate assay for inorganic phosphate.** J. Biochem. Biophys. Meth. 19: 249-252, 1989.

HOFFMEISTER, M.; MARTIN, W. **Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer.** Environ Microbiol. 5: 641-649, 2003.

HOWARD M. **A mechanism for polar protein localization in bacteria.** J Mol Biol. 335: 655-663, 2004.

HU, Z.; LUTKENHAUS, J. **Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE.** Mol Microbiol. 34: 82-90, 1999.

HU, Z.; LUTKENHAUS, J. **Analysis of MinC reveals two independent domains involved in interaction with MinD and FtsZ.** J. Bacteriol. 182:3965-3971, 2000.

HU, Z.; MUKHERJEE, A.; PICHOFF, S.; LUTKENHAUS, J. **The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization.** Proc. Natl. Acad. Sci. 96:14819-14824, 1999.

JOHNSON, J. E.; LACKNER, L. L.; DE BOER, P. A. **Targeting of DMinC/MinD and DMinC/DicB complexes to septal rings in *Escherichia coli* suggests a multistep mechanism for MinC-mediated destruction of nascent FtsZ rings.** J. Bacteriol. 184:2951-2962, 2002.

KELLY, J. M.; WARD, H. M.; MILES, M. A.; KENDALL, G. **A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*.** Nucleic Acids Res. 20: 3963-3969, 1992.

LABROUSSE, A. M.; ZAPPATERRA, M. D.; RUBE, D. A.; VAN DER BLIEK, A. M. **C. elegans** dynamin-related protein **DRP-1** controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell.* 4: 815-26, 1999.

LANZETTA, P. A.; ALVAREZ, J. L.; REINACH, P. S.; CANDIA, O. A. **An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate.** *Anal. Biochem.* 100: 95-97, 1979.

LIU, G.; DRAPER, G. C.; DONACHIE, W. D. **FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in *Escherichia coli*.** *Mol. Microbiol.* 29: 893–903, 1998.

LUTKENHAUS, J. **Assembly Dynamics of the Bacterial MinCDE System and Spatial Regulation of the Z Ring.** *Annu. Rev. Biochem.* 76: 539-62, 2007.

MA, X.; MARGOLIN, W. **Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ.** *J Bacteriol.* 181: 7531-7544, 1999.

MAPLER J. & MØLLER, S. G. **Plastid Division: Evolution, Mechanism and Complexity.** *Annals of Botany* 99: 565–579, 2007.

MARGULIS, L. **Genetic and evolutionary consequences of symbiosis.** *Exp. Parasitol.* 39: 277-349, 1976.

MARTIN, W. **Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 8612-8614, 2003.

MINGORANCE, J.; TAMAMES, J.; VICENTE, M. **Genomic channeling in bacterial cell division.** *J Mol Recognit.* 17: 481-487, 2004.

MORAN, N. A. **Microbial minimalism: Genome reduction in bacterial pathogens.** *Cell* 108: 583-586, 2002.

MOSYAK, L., ZHANG, Y., GLASFELD, E., HANEY, S., STAHL, M., SEEHRA, J., and SOMERS, W. S. **The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography.** *EMBO J.* 19: 3179–3191, 2000.

MOTTA, M. C. M.; SOLÉ-CAVA, A. M.; FARIA-E-SILVA, P. M.; SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. **Morphological and biochemical characterization of the trypanosomatids *Crithidia desouzai* and *Herpetomonas anglusteri*.** *Can. J. Zool.* 69: 571-577, 1991.

MOTTA, M. C. M.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; DE SOUZA, W.; FONTOURA, D. F.; FERREIRA, L. C. S. **Detection of penicillin-binding proteins in the endosymbiont 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.

MOTTA, M.C.M.; DE SOUZA, W.; THIRY, M. **Ultrastructural detection of DNA and RNA in Trypanosomatids: cytochemical and immunocytological study.** FEMS Microbiol. Letters 221: 17-23, 2003.

MUKHERJEE, A.; DAI, K.; LUTKENHAUS, J. ***Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein.** Proc. Natl Acad. Sci. USA 90: 1053–1057, 1993.

MUKHERJEE, A.; LUTKENHAUS, J. **Guanine nucleotide dependent assembly of FtsZ into filaments.** J. Bacteriol. 176: 2754–2758, 1994.

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.

NISHIDA, K.; TAKAHARA, M.; MIYAGISHIMA, S.; KUROIWA, H.; MATSUZAKI, M.; KUROIWA, T. **Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga.** Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2146-2156, 2003.

NOGALES, E.; DOWNING, K. H.; AMOS, L. A.; LOWE, J. **Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases.** Nat. Struct. Biol. 5: 451-458, 1998.

ODA, L. M.; ALVIANO, C. S.; SILVA-FILHO, F. C.; ANGLUSTER, J.; ROITMAN, I; DE SOUZA, W. 1984. **Surface anionic groups in symbionte-bearing and symbiont-free strains of *Crithidia deanei*.** J. Protozool. 31: 131-134, 1984.

OSTERYOUNG, K. W. **Organelle fission.** Crossing the evolutionary divide. Plant Physiol. 123: 1213-1216, 2000.

OSTERYOUNG, K. W.; NUNNARI, J. **The division of endosymbiotic organelles.** Science 302: 1698-1704, 2003.

PALMIÉ-PEIXOTO, I. V.; ROCHA, M. R; URBINAZ, J. A.; DE SOUZA, W.; EINICKER-LAMAS, M.; MOTTA, M. C. M. **Effects of sterol biosynthesis inhibitor on endosymbiont-bearing trypanosomatids.** FEMS Microbiol Lett: 255: 33-42, 2006.

PICHOFF, S.; LUTKENHAUS, J. **Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*.** EMBO J 21: 685–693, 2002.

RAMIREZ-ARCOS, S.; GRECO, V.; DOUGLAS, H.; TESSIER, D.; FRAN, D.; SZETO, J.; WANG, J.; DILLON, J. R. **Conserved glycines in the C terminus of MinC proteins are implicated in their functionality as cell division inhibitors.** J. Bacteriol. 186: 2841-2855, 2004.

RAMOS, D.; DUCAT, T.; CHENG, J.; ENG, N. F.; DILLON, J. A.; GOTO, N. K. **Conformation of the cell division regulator MinE: evidence for interactions between the topological specificity and anti-MinCD domains.** *Biochemistry* 45: 4593-601, 2006.

RAYCHAUDHURI, D.; PARK, J. T. ***Escherichia coli* cell-division gene *ftsZ* encodes a novel GTP-binding protein.** *Nature* 359: 251–254, 1992.

ROST, B.; FARISELLI, P.; CASADIO, R. **Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy.** *Protein Science*, 7:1704-1718, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSHC, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, N.Y. USA, 1989.

SYN C. K. C.; SWARUP, S. **A scalable protocol for the isolation of large-sized genomic DNA within an hour from several bacteria.** *Analytical Biochemistry* 278: 86-90, 2002.

SHIH, L. Y.; FU, X.; KING, G. F.; LE, T.; ROTHFIELD, L. **Division site placement in *E. coli*: mutations that prevent formation of the MinE ring lead to loss the normal midcell arrest of growth of polar MinD membrane domains.** *EMBO J.* 21: 3347-3357, 2002.

SHLOMAI, J. **The assembly of kinetoplast DNA.** *Parasitol. Today* 10:341-346, 1994.

SILVA, F. J.; LATORRE, A.; MOYA, A. **Why are the genomes of endosymbiotic bacteria so stable?** *Trends Genet.* 19: 176-180, 2003.

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 Letters* 41:137-141, 1989.

SPENCER, R.; CROSS, G. A. M. **Purification and properties of nucleic acids from unusual cytoplasmic organelles on the flagellate protozoan *Crithidia oncopelti*.** *Biochim. Biophys. Acta.* 390: 141-154, 1975.

STRICKER, J.; MADDOX, P.; SALMON, E. D.; ERICKSON, H. P. **Rapid assembly dynamics of the *Escherichia coli* FtsZ-ring demonstrated by fluorescence recovery after photobleaching.** *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3171–3175, 2002.

SZETO, T. H.; ROWLAND, S. L.; ROTHFIELD, L. I.; KING, G. F. **Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 15693-15698, 2002.

TAMAMES, J. **Evolution of gene order conservation in prokaryotes.** Genome Biology 2: 0020.1–0020.11, 2001.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** Proc Natl Acad Sci USA. 76: 4350-4354, 1979.

WANG, X.; LUTKENHAUS, J. **Characterization of the *ftsZ* gene from *Mycoplasma pulmonis*, an organism lacking a cell wall.** J Bacteriol 178: 2314-2319, 1996.

WARREN, L.G. **Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*, Chagas.** I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasitol. 46: 529-539, 1960.

WU, L. J.; ERRINGTON, J. ***Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division.** Science 264:572-575, 1994.

WU, L. J.; LEWIS, P. J.; ALLMANSBERGER, R.; HAUSER, P. M.; ERRINGTON, J. **A conjugation-like mechanism for prespore chromosome partitioning during sporulation in *Bacillus subtilis*.** Genes Dev. 9:1316-1326, 1995.

WEISS D. S. **Bacterial cell division and the septal ring.** Mol Microbiol 54(3): 588-97, 2004.

YU, X-C.; WEIHE, E. K.; MARGOLIN, W. **Role of the C-terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation.** J Bacteriol 180: 6424–6428, 1998.

ZHOU, H.; SCHULZE, R.; COX, S.; SAEZ, C.; HU, Z.; LUTKENHAUS, J. **Analysis of MinD mutations reveals residues required for MinE stimulation of the MinD ATPase and residue required for MinC interaction.** Journal of Bacteriology. 187: 629-638, 2005.